

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462661

研究課題名(和文) 網膜・視神経変性疾患におけるアクアポリンの関わり

研究課題名(英文) Role of aquaporin in retinal and optic nerve degenerative disorders

研究代表者

中村 誠 (NAKAMURA, Makoto)

神戸大学・医学研究科・教授

研究者番号：80273788

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ラット視神経に抗アクアポリン4(AQP4)抗体陽性視神経炎患者の血清を暴露することで、実験的視神経脊髄炎(NMO)モデルを構築し、ヒト免疫グロブリン投与が網膜神経節細胞(RGC)死を有意に抑制できる事を示した。抗AQP4抗体陽性ならびに陰性視神経炎患者では網膜神経組織への障害様式が異なる事を示した。アクアポリン9チャンネルによる乳酸輸送がRGCの生存にとって重要であることを示した。

研究成果の概要(英文)：An experimental neuromyelitis optica (NMO) model was established by exposing the rat optic nerve to sera from patients with anti-aquaporin 4 (AQP4) antibody-positive optic neuritis. Intravenous humanized immunoglobulin G substantially reduced the retinal ganglion cell (RGC) death. We demonstrated that the way how the AQP4 antibody positive optic neuritis damages the retinal tissue was different from the AQP4 antibody negative cases. We showed lactate transport through aquaporin 9 channel to be critical for the RGC survival.

研究分野：眼科学

キーワード：視神経脊髄炎 緑内障 網膜神経節細胞 アクアポリン ヒト免疫グロブリン 光干渉断層計

1. 研究開始当初の背景

視神経脊髄炎(NMO)による視神経炎は、アクアポリン(AQP)4自己抗体、補体、血液脳関門破綻の三者が関与して重篤な視神経変性を来すが、簡便なモデル動物がなく、薬物治療スクリーニングを行うのが困難であった。また、AQP4抗体陰性の視神経炎による網膜神経節細胞障害の様式との違いも不明であった。緑内障や視神経挫滅によって網膜神経節細胞(RGC)のAQP9発現量が減弱する。AQP9は乳酸などの神経細胞のエネルギー基質の輸送を担うため、視神経変性疾患ではAQP9発現減弱によるエネルギー供給不全が生じている可能性があった。しかし、RGCにおいてAQP9が乳酸輸送を司っているか、その阻害がRGC死を引き起こすのかは不明であった。

2. 研究の目的

簡便なNMOモデル動物を作成し、ヒト免疫グロブリン静脈投与(IVIG)がRGC死を抑制するかどうかを検討すること。抗AQP4抗体陽性ならびに陰性視神経炎における網膜構造と視機能障害の相関性を比較し、抗AQP4抗体の網膜神経組織障害様式を解明すること。また、AQP9発現がRGCにおいて乳酸輸送を司っているか、その阻害がエネルギー基質不全を生じてRGC死を誘発するか検証すること。これらを通じて、AQPファミリーが視神経変性疾患にどのように関与しているかを明らかにすること。

3. 研究の方法

ラット視神経の髄鞘を切開し、抗AQP4抗体陽性NMO関連疾患視神経炎患者血清を暴露する。対照には正常血清、抗AQP4抗体陰性視神経炎患者血清を用いた。フルオロゴールドによる逆行性RGC染色でRGC数をカウントし、視神経のニューロフィラメント(NF)とマイクログリア細胞数を定量した。一群では暴露前後にヒト化免疫グロブリンを尾静脈投与し、その保護効果を検証した。

発症後6カ月以上経過した抗AQP4抗体陽性視神経炎患者12名20眼と陰性患者13名15眼間で、光干渉断層計(OCT)で計測した視神経乳頭周囲網膜神経線維層(cpRNFL)と網膜神経節細胞複合体(GCC)、ならびに視力とハンフリー視野の平均偏差(MD)を比較するとともに、構造・機能相関の違いを検証した。

培養RGCを用いて培養液中のグルコースを乳酸に置換し、AQP9をRNA干渉で抑制した。RGCの生存はLive/Dead assayで、細胞内の活性酸素産生はCM-H2DCFDA蛍光量で検討した。対照にはscramble正常siRNAを導入したものをを用いた。

4. 研究成果

抗AQP4抗体陽性NMO患者血清を暴露したラット視神経は、陰性患者や正常血清を暴露

した群に比較し、2週間後、4週間後の時点で、RGC数と視神経のNF量は有意に減少し、マイクログリア数は有意に上昇した。すなわち簡便なNMO関連視神経炎モデルが作成できた。IVIGにより、このモデルにおいてRGC数とNF量減少は有意に抑制された。IVIGがNMOのRGC変性を抑制する可能性を実験的に示すことに初めて成功した。

抗AQP4抗体陽性視神経炎患者は陰性患者に比し、有意に視力、MDは悪かったが、cpRNFLやGCCに差はなかった。前者は、機能と構造変化に有意な相関関係を示したが、後者は示さなかった。抗AQP4抗体はRGCそのものを障害するのに対して、陰性の視神経炎患者は細胞外マトリックスのリモデリングを来すが、RGCそのものの脱落は軽度であることを示した。

AQP9発現を抑制しなければ、RGCはグルコースないしL型乳酸存在下で同程度の生存率を示したが、無糖ないしD型乳酸環境下では死亡率が有意に増加した。さらにAQP9発現を抑制すると、L型乳酸存在下でも細胞死は増加し、活性酸素産生量も有意に増加した。RGCにおいてはAQP9がエネルギー基質としての乳酸輸送を司り、その発現低下により様々な病態においてRGC死が誘導される可能性を示した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計20件)

Kaori Ueda, Yuki Morizane, Fumio Shiraga, Keigo Shikishima, Hitoshi Ishikawa, Masato Wakakura, Makoto Nakamura. Nationwide epidemiological survey of Leber hereditary optic neuropathy in Japan. J Epidemiol. 査読有, 2017 pii: S0917-5040(17)30074-6. doi:10.1016/j.je.2017.02.001.

Yoshiko Matsumoto, Sotaro Mori, Kaori Ueda, Takuji Kurimoto, Akiyasu Kanamori, Yuko Yamada, Ichiro Nakashima, Makoto Nakamura. Impact of the anti-aquaporin-4 autoantibody on inner retinal structure, function and structure-function associations in Japanese patients with optic neuritis. PLoS One. 査読有, 2017; 12(2):e0171880. doi:10.1371/journal.pone.0171880.

Sho Nobuyoshi, Akiyasu Kanamori, Yoshiko Matsumoto, Makoto Nakamura. Rescue effects of intravenous immunoglobulin on optic nerve degeneration in a rat model of neuromyelitis optica. Jpn J Ophthalmol. 査読有, 2016; 60(5):419-423.

Kaori Ueda, Akiyasu Kanamori, Azusa

Akashi, Mari Tomioka, Yuki Kawaka, Makoto Nakamura. Effects of Axial Length and Age on Circumpapillary Retinal Nerve Fiber Layer and Inner Macular Parameters Measured by 3 Types of SD-OCT Instruments. J Glaucoma. 査読有, 2016;25(4):383-389.

Kori Ueda, Akiyasu Kanamori, Azusa Akashi, Yoshiko Matsumoto, Yuko Yamada, Makoto Nakamura. Evaluation of the distribution pattern of the circumpapillary retinal nerve fibre layer from the nasal hemiretina. Br J Ophthalmol. 査読有, 2015 99 (10): 1419-1423.

Azusa Akashi, Akiko Miki, Akiyasu Kanamori, Makoto Nakamura. Aquaporin 9 expression is required for l-lactate to maintain retinal neuronal survival. Neurosci Lett. 査読有, 2015; 589: 185-190.

Akiko Miki, Akiyasu Kanamori, Makoto Nakamura, Yoshiko Matsumoto, Junji Mizokami, Akira Negi. The expression of syntrophin is down-regulated in the optic nerve after axonal injury. Exp Eye Res. 査読有, 2014;129:38-47.

Azusa Akashi, Akiyasu Kanamori, Kaori Ueda, Yoshiko Matsumoto, Yuko Yamada, Makoto Nakamura. The detection of macular analysis by SD-OCT for optic chiasmal compression neuropathy and nasotemporal overlap. Invest Ophthalmol Vis Sci. 査読有, 2014; 55(7):4667-4672.

Makoto Nakamura, Kei Kato, Seiko Kamata, Kumiko Ishikawa, Takayuki Nagai. Effect of refractive errors on multifocal VEP responses and standard automated perimetry tests in a single population. Doc Ophthalmol. 査読有, 2014;128(3):179-189.

Yoshiko Matsumoto, Akiyasu Kanamori, Makoto Nakamura, Akira Negi. Rat chronic glaucoma model induced by intracameral injection of microbeads suspended in sodium sulfate-sodium hyaluronate. Jpn J Ophthalmol. 査読有, 2014;58(3):290-297.

〔学会発表〕(計 30 件)

中村 誠. 視神経・視路疾患と視野障害. 第 70 回日本臨床眼科学会. シンポジウム 11. 眼疾患と視野障害. 2016 年 11 月 5 日、京都国際会議場(京都)

中村 誠: アクアポリンの網膜・視神経変性への関与(特別講演). 第 121 回京都眼科学会. 2015 年 6 月 14 日、芝蘭会館(京都)

Makoto Nakamura. Structure and

function: Why is the correlation not high? WGC Course Imaging for glaucoma diagnosis and monitoring: New idea from Asia. 第 6 回 World Glaucoma Congress. 2015 年 6 月 8 日、香港

Makoto Nakamura. Usefulness and Limitations of Application of Optical Coherence Tomography in Neuro-Ophthalmology. Asian Neuroophthalmology Society Symposium. 第 30 回 APAO. 2015 年 4 月 3 日、広州(中華人民共和国)

Makoto Nakamura. Role of aquaporin 9 in retinal ganglion cell death in glaucoma. Asia-ARVO symposium 1. 2015 年 2 月 16 日、パシフィコ横浜(横浜) 中村 誠. 視神経炎の診断と治療. Up to date(教育セミナー). 第 52 回日本神経眼科学会. 12 月 13 日、幕張メッセ(千葉)

〔図書〕(計 19 件)

中村 誠. 医学書院. Leber 遺伝性視神経症. 三村 治、谷原秀信編、眼科臨床エキスパート. 知っておきたい神経眼科診療. 2016; 98-103.

中村 誠. 中山書店. 中枢神経(). 大鹿哲郎編、専門医のための眼科診療クオリファイ 30. 眼の発生と解剖・機能. 2016; 373-392.

中村 誠. 医学書院. 特発性視神経炎. 金澤一郎、永井良三編. 今日診断指針. 2015; 1687-1688.

中村 誠. メジカルビュー社. 正常眼圧緑内障. 概論. 木内良明編、緑内障診療クローズアップ. 2014; 180-183.

中村 誠. メジカルビュー社. 視野 緑内障と間違えやすい視野異常. 敷島敬悟編、神経眼科診断クローズアップ. 2014; 164-169.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://kobe-med-ganka.com/index.php>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 誠 (NAKAMURA, Makoto)

神戸大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：80273788

(2) 研究分担者

山田裕子 (YAMADA, Yuko)

神戸大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：00359861

金森章泰 (KANAMORI, Akiyasu)

神戸大学・医学部附属病院・非常勤講師

研究者番号：10444572

三木明子 (MIKI, Akiko)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10726988

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()