

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06041

研究課題名(和文) 緑内障モデル動物におけるGPNMBの発現解析と治療への試み

研究課題名(英文) Expression analysis and approach for treatment of GPNMB in glaucoma model animals

研究代表者

面高 宗子 (Kazuko, Omodaka)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80569583

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：緑内障モデルであるマウス軸索挫滅で、RT-PCR法、蛍光色素の逆行性染色法、ウェスタンブロッティング法により、網膜神経節細胞の特異的マーカーの発現をみると経時的に減少していた。緑内障モデル動物の網膜における網羅解析で発現が上昇していた、緑内障においても神経保護機能を有する可能性があると考えられるGlycoprotein nonmetastatic melanoma protein Bについて軸索挫滅4日後をピークに有意なタンパク質の発現上昇が認められた。軸索挫滅時における網膜神経節細胞の詳細な障害パターン、緑内障の分子病態の解明および薬効評価実験における基礎的なデータが得られた。

研究成果の概要(英文)：Expression of specific markers of retinal ganglion cells decreased with time by RT-PCR method, retrograde staining method of fluorescent, western blotting method with mouse optic nerve crush, which is a glaucoma model. Glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B, which is thought to have neuroprotective function in glaucoma, which expression has been elevated due to coverage analysis in the retina of glaucoma model animals, shows significant protein expression at 4 days after nerve crush was decreased. A detailed disorder pattern of retinal ganglion cells during optic nerve crush, basic elucidation of molecular pathology of glaucoma, and basic data on experiments for evaluating pharmacological effect were obtained.

研究分野：緑内障

キーワード：緑内障 網膜神経節細胞障害 軸索障害 GPNMB 神経保護

## 1. 研究開始当初の背景

緑内障は網膜神経節細胞が障害される眼科疾患であり、進行性の視野欠損と網膜神経節細胞死および視神経軸索の萎縮を特徴とし、我が国の中途失明原因のおよそ25%を占めている。しかしながら、本疾患の病態進行過程においては不明な点が多い。現在、緑内障の治療法として眼圧を低下させる目的で眼圧降下薬が使用されている。しかし、十分な眼圧下降が得られても、視野進行が進む患者も多く存在する。特にアジアでは、眼圧非依存的に視野欠損が進行する正常眼圧緑内障の割合が多く、その病態解明と治療法探索は急務である。

緑内障の主な病態は、視神経乳頭深部に位置する篩状板における軸索障害である。我々はヒト生体眼で、まだ視野異常を呈していない前緑内障段階でも、篩状板の有意な菲薄化が見られることを証明し、緑内障病態における軸索障害の重要性を報告した (Omodaka K et al. PLoS one. 2015)。そこで、緑内障病態を反映したモデルとして、軸索挫滅モデルを作製し、軸索障害時における網膜内の遺伝子発現変動を次世代シーケンサーによる RNA シークエンス法、及び CAGE 法により遺伝子発現の網羅的解析を行った。その発現変動した分子群をシグナル経路解析により更に重要性を検討し報告している (Yasuda et al. PLoS One. 2014, Yasuda et al. BMC Genomics. 2014)。その結果、ラットの視神経切断時において Glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B (GPNMB) の遺伝子発現が網膜内で有意に上昇していることを発見した。GPNMB は Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) モデル動物である SOD1 ミュータントマウスを用いたマ

イクロアレイ解析により同定された因子で、タイプ 膜貫通タンパク質あり Osteoactivin とも呼ばれている。GPNMB の発現量は ALS モデル動物において週齢に依存して上昇しており、GPNMB の発現低下は細胞死を誘導すること、また組み換え GPNMB タンパク質や GPNMB 過剰発現マウスの実験結果から、GPNMB は神経保護因子として機能することが報告されている (Tanaka H et al. Sci Rep. 2012)。図 1 に ALS の運動ニューロン変性における GPNMB の関与について図示する。

しかしながら、GPNMB の網膜内での発現に関する報告は未だなく、またその神経保護機構の詳細についても明らかにされていない。申請者は、網羅解析の結果から緑内障モデル動物の網膜において GPNMB の発現が上昇することを見いだしており、この因子が ALS だけではなく緑内障においても神経保護機能を有する可能性があると考えた。

## 2. 研究の目的

GPNMB が網膜においても神経保護効果を持つとの仮説の下、網膜障害時における GPNMB の発現パターンおよび網膜神経節細胞に対する神経保護効果の検証ならびにその分子機構の解明を目的とした。我々は創薬基盤整備によりハイスループットの創薬研究施設を有しており、本研究によって緑内障治療薬の標的因子が同定された場合は速やかにトランスレーショナルリサーチにつなげることが可能な研究環境である。本研究による成果を緑内障治療薬開発の足掛かりとするのが最終的な目標となる。

## 3. 研究の方法

### (1) 緑内障モデル動物の作製と網膜神

## 経節細胞障害の評価

ヒト緑内障病態の本態として、視神経を束ねている篩状板部での軸索絞扼が主たる原因の一つと考えられている。その病態を模倣する動物モデルとして、視神経軸索挫滅が一般的に用いられている。これは正常眼圧緑内障モデルとして知られており、当研究施設でもマウスおよびラットの視神経挫滅または切断を用いた視神経障害による緑内障モデル動物による研究報告が多くなされている。本邦における正常眼圧緑内障は欧米に比べてその比率が高いことから、軸索障害による緑内障モデル動物を用いた分子病態の解析は、本邦における緑内障患者の病態解明に重要であると考えられる。

本実験には 8-12 週令の C57BL/6J マウス ( ) を使用した。ケタミン・キシラジンの混合による全身麻酔下において、顕微鏡下で結膜および上眼瞼を切開し、視神経を露出させたのちピンセットで 5 秒間絞扼した。その後、抗生剤を塗布して保温プレート上で覚醒させた。網膜神経節細胞障害の評価法には、網膜神経節細胞に特異的に存在する *Brn3*, *Thy1*, *Nefh* に加え、近年報告された新たな特異的マーカーである *Rbpms* の遺伝子発現量を qRT-PCR により確認する方法を用いた。また、RBPMs のタンパク質発現をウェスタンブロッティングおよび免疫染色法にて確認した。上記評価法に加えて、視神経が投射される中脳上丘に 2%フルオロゴールドを 1  $\mu$ l 投与し、網膜神経節細胞を逆行性に染色した。フルオロゴールド投与 7 日後に視神経挫滅をおこない、さらにその 7 日後に眼球を摘出して網膜伸展標本を作製し、蛍光顕微鏡により撮影をおこなうことで緑内障モデル動物における網膜神経節細胞死を観察した。

## (2) 網膜神経節細胞障害時における GPNMB の発現解析

前述の緑内障モデル動物を用いて、網膜神経節細胞障害後の網膜内における GPNMB の発現および局在の確認を試みた。遺伝子発現を qRT-PCR 法、タンパク質発現をウェスタンブロッティング法、網膜組織内におけるタンパク質局在を確認するため、免疫組織化学を行った。これらの結果を網膜神経節細胞死の時期と比較することにより、GPNMB の神経保護への関連を推測した。

### 4. 研究成果

#### (1) 緑内障モデル動物の作製と網膜神経節細胞障害の評価

正常眼圧緑内障モデルによる網膜神経節細胞の障害を評価するため、視神経軸索挫滅後に眼球摘出し、網膜組織をサンプルとして RNA 抽出を行い、網膜神経節細胞特異的な遺伝子の発現量を qRT-PCR により測定した。RNA 発現変化は網膜神経節細胞に特異的に存在する *Thy1*, *Nefh*, *Brn3a*, *Brn3b*, *Brn3c* に加え、近年報告された新たな特異的マーカーである *Rbpms* の遺伝子発現量を測定した。無処置、軸索障害後 2, 4, 7 日後の網膜を回収し、RNA 抽出、cDNA 合成の後にリアルタイム PCR を行った。その結果、*Thy1*, *Nefh*, *Brn3a*, *Brn3b*, *Brn3c* および *Rbpms* の発現は軸索障害後に経時的に減少していた。RBPMs によるウェスタンブロッティングの結果も qRT-PCR の結果と同様に軸索障害後 2, 4, 7 日後に減少が確認されたが、その減少は qRT-PCR に比較して緩やかであり、ウェスタンブロッティングに比べて qRT-PCR は網膜神経節細胞の障害を鋭敏に捉えていることが示唆された。さらに、軸索障害後 2, 4, 7 日後に眼球を摘出して凍結切片を作成し、抗 RBPMs 抗体

による免疫染色を行ったところ、軸索挫滅2日後ではRBPMS陽性細胞の減少はほとんど見られなかったが、軸索挫滅4日後では無処置群の約6割、軸索挫滅7日後では無処置群の約4割まで減少しており、網膜神経節細胞が減少していることを確認した。さらに、フルオロゴールドを用いた逆行性染色による網膜神経節細胞数の評価においても、軸索挫滅7日後では無処置群の約3割まで減少していた。上記結果より、複数の評価系において網膜神経節細胞の障害が誘導されていることを確認できたこれらの結果から、本実験において用いたマウス視神経挫滅により経時的なRGCの減少が示唆され、緑内障モデル動物の作製とRGC障害の変化を確認できた。

## (2) 網膜神経節細胞障害時におけるGPNMBの発現解析

上記の緑内障モデル動物を用いて、軸索挫滅2日後の網膜内におけるGPNMBの発現評価を試みた。軸索挫滅2日後はこれまでの網羅解析の結果においてGPNMBのmRNA増加が認められている時期である。ウェスタンブロッティング法および免疫組織化学によりGPNMBの網膜内タンパク質発現および局在を検討したが、いずれの手法においてもGPNMBのタンパク質発現を検出することができなかった。この原因として、RNA発現は検出できるがタンパク質発現が検出できないほど微量である、ウェスタンブロッティング法および免疫組織化学の実験条件が最適ではない、もしくは使用した試薬がworkしていない、軸索挫滅2日後のタイムコースはGPNMBタンパク質検出に最適ではない、などの理由が考えられる。上記の について検証するため、

GPNMBのタンパク質発現を検討する予備実験としてマウス軸索挫滅により誘導されるGPNMBが高発現される時期を調べるため、軸索挫滅後のマウス網膜を継時的に摘出し、GPNMBのmRNA発現レベルをRT-PCR法により検証した。その結果、軸索挫滅2日後の網膜内GPNMBは未処置眼に比べて約4倍 ( $p=0.03$ )、軸索挫滅4日後では約5.5倍 ( $p=0.006$ )、軸索挫滅7日後では約2倍 ( $p=0.03$ ) の有意な上昇が認められた。軸索挫滅7日後にGPNMB発現レベルが軸索挫滅2日後、軸索挫滅4日後に比較して低いレベルであった理由として、軸索挫滅7日後では網膜神経節細胞が変性、減少することを反映している可能性が示唆された。また、GPNMBのmRNA発現レベルは軸索挫滅4日後にピークであったことから、網膜内GPNMBのタンパク質発現レベルを検討するには軸索挫滅4日後が最適であると考えられるため、今後検討する。また、軸索挫滅4日後は網膜神経節細胞の細胞死が有意に上昇する時期であることが当研究室の津田らの報告から明らかとなっており (Tsuda S et al. *Exp Eye Res.* 2016)、GPNMBがその細胞死を抑制するために代償的に発現している可能性が考えられた。

本研究期間では、目標としたGPNMBの神経保護効果を評価する実験にまで到達することができなかった。一方で、軸索挫滅時における網膜神経節細胞の詳細な障害パターンのデータを得ることができた。このデータは緑内障の分子病態の解明および薬効評価実験における基礎的なデータとして重要であり、本研究の貴重な研究成果と考えている。

引用文献

**Omodaka K**, Horii T, Takahashi S,

Kikawa T, Matsumoto A, Shiga Y, Maruyama K, Yuasa T, Akiba M, Nakazawa T : 3D evaluation of the lamina cribrosa with swept-source optical coherence tomography in normal tension glaucoma. PLoS One 10: e0122347, 2015.

Yasuda M, Tanaka Y, Ryu M, Tsuda S, Nakazawa T. : RNA sequence reveals mouse retinal transcriptome changes early after axonal injury. PLoS One 9: 10: e0122347, 2014.

Yasuda M, Tanaka Y, Nishiguchi KM, Ryu M, Tsuda S, Maruyama K, Nakazawa T. : Retinal transcriptome profiling at transcription start sites: a cap analysis of gene expression early after axonal injury. BMC Genomics. 2014; 15: 982.

Tanaka H, Shimazawa M, Kimura M, Takata M, Tsuruma K, Yamada M, Takahashi H, Hozumi I, Niwa J, Iguchi Y, Nikawa T, Sobue G, Inuzuka T, Hara H. : The potential of GPNMB as novel neuroprotective factor in amyotrophic lateral sclerosis. Sci Rep. 2012; 2: 573.

Tsuda S, Tanaka Y, Kunikata H, Yokoyama Y, Yasuda M, Ito A, Nakazawa T.: Real-time imaging of RGC death with a cell-impermeable nucleic acid dyeing compound after optic nerve crush in a murine model. Exp Eye Res. 2016. 179-88.

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等 該当無し

6 . 研究組織  
(1)研究代表者  
面高 宗子 (OMODAKA, Kazuko)  
東北大学・医学系研究科・助教  
研究者番号 : 80569583