

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590112

研究課題名(和文) 網膜における神経 グリア 血管連関成立機序の解析と新規緑内障治療薬開発への応用

研究課題名(英文) Mechanisms of neuronal-glial-vascular interactions in the retina and the application for development of anti-glaucoma drugs

研究代表者

中原 努 (Nakahara, Tsutomu)

北里大学・薬学部・准教授

研究者番号：10296519

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：ラットの実験的緑内障モデル(NMDA硝子体内投与網膜傷害モデル)を用いて、網膜における神経 グリア 血管間の相互作用の解析を行った。本モデルの網膜では、神経細胞の脱落のみならず、白血球の浸潤、ミクログリアの活性化、血管傷害も生じることが示された。網膜神経傷害と炎症性応答は、血管傷害に先行して起こった。これらの変化は、マクロファージ遊走阻止因子と mammalian target of rapamycin (mTOR) の抑制薬により抑制された。従って、両分子は網膜における神経 グリア 血管連関の調節因子として作用しており、新たな網膜神経傷害抑制法の標的となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to clarify the mechanisms of neuronal-glial-vascular interactions in the retina using a rat model of retinal degeneration induced by an intravitreal injection of NMDA. In this model, loss of neuronal cells, accumulation of leukocytes, activation of microglia, and vascular injury were observed after NMDA treatment. Neuronal cell loss and microglia activation preceded vascular injury following NMDA treatment. Inhibitors of macrophage migration inhibitory factor (MIF) and mammalian target of rapamycin (mTOR) attenuated these NMDA-induced responses. Therefore, compounds acting on these molecules may have the potential to correct the neuronal-glial-vascular interaction and ultimately be used for the treatment of glaucoma.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：薬理学 血管生物学 網膜神経 グリア細胞 網膜血管

1. 研究開始当初の背景

緑内障と糖尿病網膜症は、後天性失明や視力低下の原因として大きな割合を占める、社会的な問題となっている疾患である。両疾患の発症と進行には網膜循環障害が深く関与しているため、網膜循環の正常化こそが視覚障害の進行を阻止する上で最優先されるべき治療法と言っても過言ではないが、現在のところ、網膜循環を正常化する有効な手段は存在しない。その原因として、網膜循環調節機構および網膜血管の恒常性維持機構が十分に解明されていない点を挙げることができる。申請者らは、これまでに *in vivo* 網膜循環評価法、網膜血管イメージング法等、小動物を対象とした網膜循環・網膜血管に関する研究を行うための実験技術を開発し、基礎生理・薬理的検討を行ってきた。本研究において、緑内障モデル(網膜神経障害モデル)動物を用いて、網膜血管の構造・機能維持における網膜神経細胞とグリア細胞の役割、と網膜における神経細胞 グリア細胞 血管構成細胞間の相互作用の分子基盤を詳細に解析することにより、網膜血管の恒常性維持機構に関する新知見が得られるものと考えられた。

2. 研究の目的

本研究の究極の目的は、網膜循環の正常化に基づく緑内障の新規予防・進行抑制戦略を提案することである。その実現のために、研究期間内に(1)緑内障モデルラットにおいて、網膜神経障害の進行に伴い観察される網膜毛細血管脱落および網膜血管反応性異常にミクログリアがいかに関与するか、(2)前記(1)で明らかにされたミクログリアの役割を担う分子群と網膜血管の構造・機能維持における意義、そして、それらの成果を踏まえ、(3)緑内障モデルラットにおける薬物による網膜循環障害の発症抑制および網膜神経障害の進行抑制に対する有効性、の3点を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

ラットの実験的緑内障モデル(NMDA 硝子体内投与網膜傷害モデル)を使用した。(1)麻酔したラットの硝子体内に NMDA (200 mol) を投与した 6 時間、1 日、2 日および 7 日後に網膜実質におけるミクログリアの形態と数の変化、白血球の数を指標として、ミクログリアの活性化ならびに白血球の浸潤の程度と神経/血管傷害の進行の様子を経時的に観察した。(2)グリア細胞が遊離する分子ならびにグリア細胞の機能調節に関わる分子として、それぞれ、マクロファージ遊走阻止因子 (macrophage migration inhibitory factor; MIF) および mammalian target of rapamycin (mTOR) について、網膜傷害(神経傷害および血管傷害)における意義を、免疫組織化学的手法と各因子の作用抑制薬の NMDA 投与後に生じる神経と血管の変化に対する効果について検討した。また、(3)網膜血管に作用して、網膜循環を改善する作用が見出された β_3 アドレナリン受容体刺激薬 CL316243 の NMDA 誘発網膜神経傷害に対する効果についても検討を行った。

4. 研究成果

(1) NMDA の硝子体内投与後の網膜における神経細胞・グリア細胞・血管構成細胞の経時変化

ミクログリアの形態と数の変化は、NMDA 硝子体内投与 6 時間後には明らかでなかったが、1 日後には静止状態にあるミクログリアの特徴であるラミファイド型から活性化状態にあるミクログリアの特徴であるアメーバ型への形態変化が顕著になった。そしてミクログリアの数は正常に比べて約 2 倍高値となった。2 日後にはそれらの変化はさらに増大したが、7 日後では低下していた。白血球浸潤の経時変化は、ミクログリアで観察された経時変化とほぼ同様であった。また、白血球とミクログリアの各細胞マーカーを

用いた二重染色によって、白血球がミクログリアに分化する様子も観察された。神経細胞に関しては、6 時間後で視神経節細胞のアポトーシスが観察されるようになり、12 時間から 24 時間でピークとなった。そして視神経節細胞の脱落は 2 日後で有意となり、7 日後にはさらに進行した。一方、血管内皮細胞の有意な脱落は、それらの変化に遅れて生じ 7 日後で観察されるようになった。このように、NMDA 投与後、先ず神経傷害が生じ、次いで白血球の浸潤、ミクログリアの活性化が起こり、血管構成細胞へ傷害が及ぶことが示された。従って、神経細胞傷害、白血球の浸潤、グリア細胞の活性化が、血管構成細胞の生存に影響を与える可能性が考えられた。

(2) グリア細胞が遊離する分子ならびにグリア細胞の機能調節に関わる分子の網膜傷害における意義

マクロファージ遊走阻止因子 (macrophage migration inhibitory factor; MIF) の網膜傷害における意義

MIF は、マクロファージの遊走を抑制し傷害部位にマクロファージを留める役割を担う因子として発見されたが、最近の研究により、免疫応答、細胞の分化増殖にも関与することが明らかにされている。先ず初めに、正常ラット網膜における MIF の発現分布について検討を行ったところ、グリア細胞 (アストロサイト、ミュラー細胞) に存在していることが明らかになった。そこで、NMDA 硝子体内投与後に生じる神経傷害、ミクログリアの活性化および白血球の浸潤に対する MIF 阻害薬 ISO-1 の効果について検討を行い、ISO-1 が、NMDA 硝子体内投与後に生じる変化のすべてを有意に抑制することが見出された。一方、NMDA 処置後の MIF 発現には大きな変化が見られず、アストロサイトにおいて若干発現量が増加する傾向が認められたのみであった。詳細な機序は不明であ

るが、網膜傷害時にグリア細胞が MIF の産生・遊離量を調節することによって神経細胞の生存に関与している可能性が考えられた。また、MIF 阻害薬のグルタミン酸興奮毒性が関与する網膜神経傷害に対する治療薬としての可能性も期待された。

Mammalian target of rapamycin (mTOR) 経路の網膜傷害における意義

mTOR は細胞増殖・生存に重要な役割を演じている分子であるが、これまでにその阻害薬であるラパマイシンがハンチントン病やパーキンソン病などの脳疾患モデルおよび加齢黄斑変性症などの網膜疾患モデルにおいて神経保護作用を示すことが報告されている。そこで、ラパマイシンの NMDA 硝子体内投与後に生じる網膜傷害に及ぼす影響について検討を行った。そして、NMDA 処置後に観察される、視神経節細胞のアポトーシスと脱落および内網状層の菲薄化は、ラパマイシンにより有意に抑制されることが示された。また mTOR 経路の活性化の指標として mTOR の下流シグナル分子である S6 リボソームタンパク質のリン酸化について免疫組織化学的に検討したところ、NMDA 処置は、視神経節細胞、ミクログリア、ミュラー細胞において mTOR を活性化することが明らかになった。これらの細胞における mTOR 経路の活性化はラパマイシンにより著しく抑制された。さらに、ラパマイシンは、ミュラー細胞における ERK 経路を活性化すること、ERK 阻害薬 U0126 がラパマイシンの神経保護作用を消失させることから、ラパマイシンは NMDA によるミュラー細胞における mTOR シグナルの抑制を介して、あるいは、直接 ERK を活性化することによって神経保護作用を示しているものと考えられた。また、ラパマイシンは、NMDA 処置後に生じる白血球の浸潤とミクログリアの活性化を抑制すること、血管傷害に対して

抑制作用を示すことも明らかになった。

以上より、mTOR 阻害薬であるラパマイシンが NMDA 誘発網膜傷害に対して保護作用を示すことが明らかになった。そして、その作用点がグリア細胞（アストロサイトおよびミユラー細胞）である可能性が示された。

（3）網膜循環改善に基づく神経保護作用の可能性

我々は、 β_3 アドレナリン受容体刺激薬がラット網膜血管を拡張させることを見出した。そこで、 β_3 アドレナリン受容体刺激薬 CL316243 が NMDA 誘発網膜神経傷害に対して保護作用を示すか否かについて検討を行った。そして、NMDA の硝子体内投与後 15 分以降 120 分までの間に CL316243 を硝子体内に投与すると、NMDA 処置により生じる網膜神経傷害が軽減されることが示された。 β_3 アドレナリン受容体刺激薬は、全身投与した際、血圧・心拍数にほとんど影響を及ぼさず網膜血管を拡張することから、心血管系に対する副作用の小さい網膜循環改善薬として期待できるが、さらに網膜傷害の進行を抑制する可能性も示された。今後、 β_3 アドレナリン受容体の網膜内発現分布を明らかにすることが重要であるが、 β_3 アドレナリン受容体の刺激を介する網膜血流量の増加が網膜神経の生存を促している可能性を示唆するものと考えられる。血管機能と神経細胞の生存との関連を示唆する貴重なデータであると考えられた。

総括

本研究によって、網膜神経細胞が傷害されると炎症性の反応（白血球の浸潤やミクログリアの活性化）が生じることが示された。網膜血管傷害は、神経傷害や炎症性応答に遅れて生じることが明らかになった。炎症性細胞は、正常細胞に対して傷害性に作用することが示されている。また網膜血管傷害が生じる

と、網膜神経細胞への血液供給が低下し、更なる網膜神経傷害を招く可能性がある。従って、グリア細胞の機能調節や網膜血管の構造と機能の維持は、緑内障をはじめ、糖尿病網膜症、網膜虚血などの網膜疾患の進行を抑制する上で有用な治療戦略になり得るものと考えられた。

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 8 件)(すべて査読有)

Ichikawa A, Nakahara T, Kurauchi Y, Mori A, Sakamoto K, Ishii K. Rapamycin prevents *N*-methyl-D-aspartate-induced retinal damage through an ERK-dependent mechanism in rats. *J Neurosci Res*. 2014 Jun;92(6):692-702. doi: 10.1002/jnr.23358.

Ueda K, Nakahara T, Akanuma K, Mori A, Sakamoto K, Ishii K. Differential effects of LY294002 and wortmannin on neurons and vascular endothelial cells in the rat retina. *Pharmacol Rep*. 2013;65(4):854-862.

Naruoka T, Nakahara T, Tsuda Y, Kurauchi Y, Mori A, Sakamoto K, Nishihira J, Ishii K. ISO-1, a macrophage migration inhibitory factor antagonist, prevents *N*-methyl-D-aspartate-induced retinal damage. *Eur J Pharmacol*. 2013 Oct 15;718(1-3):138-144. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.08.041.

Nakahara T, Mori A, Kurauchi Y, Sakamoto K, Ishii K. Neurovascular interactions in the retina: physiological and pathological roles. *J Pharmacol Sci*. 2013;123(2):79-84.

<http://dx.doi.org/10.1254/jphs.13R03CP>

Ueda K, Nakahara T, Mori A, Sakamoto K, Ishii K. Protective effects of TGF- β inhibitors in a rat model of NMDA-induced retinal degeneration. *Eur J Pharmacol*. 2013 Jan 15;699(1-3):188-193. doi:

10.1016/j.ejphar.2012.11.054.

Tsuda Y, Nakahara T, Ueda K, Mori A, Sakamoto K, Ishii K. Effect of nafamostat on N-methyl-D-aspartate-induced retinal neuronal and capillary degeneration in rats. Biol Pharm Bull. 2012;35(12):2209-2213. <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.b12-00644>

Oikawa F, Nakahara T, Akanuma K, Ueda K, Mori A, Sakamoto K, Ishii K. Protective effects of the β_3 -adrenoceptor agonist CL316243 against N-methyl-D-aspartate-induced retinal neurotoxicity. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 2012 Nov;385(11):1077-1081. doi: 10.1007/s00210-012-0796-1. <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-012-0796-1>

Mori A, Nakahara T, Sakamoto K, Ishii K. Role of β_3 -adrenoceptors in regulation of retinal vascular tone in rats. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 2011 Dec;384(6):603-608. doi: 10.1007/s00210-011-0682-2. <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-011-0682-2>

〔学会発表〕(計 5 件)

浅野大樹、浅見康之、森 麻美、坂本謙司、中原 努、石井邦雄、ラット網膜において NMDA で誘発される神経傷害および血管傷害に対する成熟度の影響、第 15 回応用薬理シンポジウム年会(東京：コクヨホール) 2013.9.28.

成岡妙子、中原 努、倉内祐樹、森 麻美、坂本謙司、石井邦雄、ラット NMDA 誘発網膜神経傷害に対するマクロファージ遊走阻止因子抑制薬 ISO-1 の効果、第 126 回日本薬理学会関東部会(東京：北里大学薬学部) 2012.7.14.

浅見康之、中原 努、倉内祐樹、森 麻美、坂本謙司、石井邦雄、幼若期および成熟期ラットにおいて観察される視神経傷害に伴う網膜血管傷害、第 126 回日本薬理学会関東部会(東京：北里大学薬学部) 2012.7.14.

中原 努、植田 香、森 麻美、坂本謙司、石井邦雄、ラットにおける TGF- β 阻害薬の NMDA 誘発網膜神経/血管傷害に対する抑制効果、第 32 回日本眼薬理学会学術集会(滋賀：ピアザ淡海) 2012.9.16.

中原 努、赤沼かおり、及川風花、森 麻美、坂本謙司、石井邦雄、アドレナリン受容体刺激薬 CL316243 の網膜神経保護効果、第 85 回日本薬理学会年会(京都：国立京都国際会館) 2012.3.14.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.kitasato-u.ac.jp/molpharm/molpharm/TOP.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中原 努 (NAKAHARA TSUTOMU)

北里大学・薬学部・准教授

研究者番号：10296519

(2)研究分担者

森 麻美 (MORI ASAMI)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：80453504