

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592568

研究課題名(和文) 視神経変性における網膜・視神経のアクアポリンの局在変化と網膜神経節細胞死への関与

研究課題名(英文) The effect of changes in aquaporin localization in the retina and optic nerve on retinal ganglion cell death

研究代表者

中村 誠 (NAKAMURA, Makoto)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80273788

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：生理的条件下の網膜と視神経におけるアクアポリン(AQP)アイソフォーム発現とその局在を同定した。視神経のアストロサイトと網膜神経節細胞(RGC)はAQP9を発現していた。高眼圧や視神経挫滅により、RGCのAQP9発現は細胞死に先行して減少した。培養RGC5細胞のAQP9発現をRNA干渉で抑制すると細胞内活性酸素産生と細胞死が増加した。AQP9によるエネルギー基質としての乳酸輸送がRGCの生存に必要なことが示された。

研究成果の概要(英文)：Expression and localization of aquaporin (AQP) isoforms in the retina and optic nerve in physiological conditions were identified. Astrocytes in the optic nerve and retinal ganglion cells (RGCs) expressed AQP9. Elevated intraocular pressure and optic nerve transection reduced the AQP9 expression in RGCs, which preceded the death of RGCs. When AQP9 expression in cultured RGC5 cells was inhibited by RNA interference, intracellular reactive oxygen species production and cell death were significantly increased. These lines of evidence suggest that transport of lactate, the energy substrate for neurons, via AQP9 is necessary for the survival of RGCs.

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：アクアポリン 網膜神経節細胞 視神経 乳酸 緑内障

1. 研究開始当初の背景

様々な病因が視神経変性を招来するが、機序の不明なものが多い。中枢神経系の白質の途中で、網膜神経節細胞(RGC)の軸索である視神経は、眼内・眼外のいずれでもアストロサイトグリアにより支持されている。アキアポリン水チャンネルのサブタイプ4(AQP4)は、アストロサイトの終足に発現し、軸索間との水分子の双方向性輸送を調節することにより、活動電位の発生と伝達に重要な役割を担っていることが知られていた。また、AQP9はアキアグリセロポリンに属し、中枢神経系のエネルギー基質と考えられている乳酸の輸送に関与する可能性が指摘されつつある。我々は、AQP9が視神経ならびに網膜神経節細胞(RGC)細胞体において発現していることを見出していた。また、近年、抗AQP4抗体陽性視神経炎が新たな疾患概念として認知された。しかしながら、AQPと視神経変性との関わりの詳細は不明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、AQPと視神経変性疾患との関係を明らかにすることである。とりわけ、AQP4と9に焦点を当て、抗AQP4抗体の視神経軸索変性とAQP9のRGC生存における役割を検討した。

3. 研究の方法

ラット視神経挫滅(ONT)モデルを用いて、逆行性軸索変性を起こし、RGC死を誘導した。網膜伸展標本の逆行性軸索輸送色素によるRGC染色により、経時的なRGC喪失数をカウントした。RGCのAQP9発現変化を免疫染色、Western blot等で検討した。培養RGC5細胞死を血清除去により誘導した。RNA干渉法でAQP9発現を抑制し、細胞死、活性酸素産生、NAD/NADH比への影響を検証した。

抗AQP4抗体陽性視神経炎と陰性視神経炎患者血清をラット視神経に暴露した。暴露部位とそれ以外の視神経のglial fibrillary acidic protein(GFAP)、neurofilament、ならびにAQP4の発現ならびに炎症細胞浸潤を経時的に免疫染色、western blot、RT-PCRで検証した。RGC死の定量は上記と同様逆行性染色で行った。

4. 研究成果

ONTにより、1週間後にはRGC数は有意に減少した。神経節細胞層におけるNeuN陽性神経細胞におけるAQP9の発現は、これに先行してONT3日後から低下していた。網膜におけるAQP9発現は遺伝子レベルでも蛋白レベルでもONT3日後から有意に低下していた。RGC5細胞死は血清除去により有意に増加した。AQP9をRNA干渉法で抑制すると、コントロールに比べ、細胞死数、細胞内活性酸素産生量、NAD+/NADH比は有意に増加していた。すなわち、エネルギー基質としての乳酸を

AQP9がミトコンドリア内外へ輸送し、RGCの生存に関与している可能性を示した。

抗AQP4抗体陽性視神経炎患者血清で暴露されたラット視神経では、暴露部位のAQP4とGFAPの発現が有意に低下し、CD5と11陽性の炎症細胞が有意に増加した。また、暴露部位を越えて、RGC数とneurofilamentの減少が見られた。すなわち、抗AQP4抗体陽性視神経炎患者血清は、暴露部位限局的なアストロサイトの変性と炎症細胞浸潤を惹起し、逆行性にRGCの軸索変性と細胞死を引き起こすことを明らかにした。

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)

Yoshiko Matsumoto, Akiyasu Kanamori, Makoto Nakamura, Toshiyuki Takahashi, Ichiro Nakashima, Akira Negi. Sera from patients with seropositive neuromyelitis optica spectral disorders causes the degeneration of rodent optic nerve. *Exp Eye Res* 査読有, 2014, 119: 61-69. DOI: 10.1016/j.exer.2013.12.010.

Akiko Miki, Akiyasu Kanamori, Akira Negi, Maiko Naka, Makoto Nakamura. The loss of aquaporin 9 expression adversely affects the survival of retinal ganglion cells. *Am J Pathol* 査読有, 2013, 182: 1727-1739. DOI: 10.1016/j.ajpath.2013.01.027.

Saya Nakano, Akiyasu Kanamori, Makoto Nakamura, Kenichi Mizukawa, Akira Negi. Paraneoplastic optic neuropathy associated with cerebellar choroid meningioma. *Eye* 査読有, 2013, 27: 1220-1221. DOI: 10.1038/eye.2013.150.

中村 誠. 緑内障性視神経症への挑戦: 新しい病態論の提唱と他覚的機能解析方法の改良. *日眼会誌* 査読有, 2012, 116: 298-346. URL:

<http://www.nichigan.or.jp/member/journal/nggz/index.jsp>

Makoto Nakamura, Kumiko Ishikawa-Tabuchi, Akiyasu Kanamori, Yuko Yamada, Akira Negi. Better performance of RTVue than Cirrus spectral-domain optical coherence tomography in detecting band atrophy of the optic nerve. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 査読有, 2012, 250:1499-507. DOI: 10.1017/s00417-012-2095-4.

Makoto Nakamura, Maiko Naka, Yasuko Tatsumi, Azusa Nagai-Kusuhara, Akiyasu Kanamori, Yuko Yamada, Akira Negi. Filtering bleb structure

associated with long-term intraocular pressure control after amniotic membrane-assisted trabeculectomy. *Curr Eye Res* 査読有, 2012;37: 239-250. DOI: 10.3109/02713683.2011.635403. 中村 誠. 視神経炎に抗 AQP4 抗体を検査すべきか? 治療法は変わるか? あたらしい眼科 査読無, 2012, 29: 736-742. URL: <http://www.medical-aoi.co.jp> Masahide Fukuda, Maiko Naka, Junji Mizokami, Akira Negi, Makoto Nakamura. Diabetes induces expression of aquaporin-0 in the retinal nerve fibers of spontaneously diabetic Torii rats. *Exp Eye Res* 査読有, 2011, 91: 195-201. DOI: 10.1016/j.exer.2011.01.001 Junji Mizokami, Akiyasu Kanamori, Akira Negi, Makoto Nakamura. A preliminary study of reduced expression of aquaporin-9 in the optic nerve of primate and human eyes with glaucoma. *Curr Eye Res* 査読有, 2011, 36: 1064-1067. DOI: 10.3109/02713683.2011.611610 Makoto Nakamura, Kumiko Ishikawa, Takayuki Nagai, Akira Negi. Receiver-operating characteristic analysis of multifocal VEPs to diagnose and quantify glaucomatous functional damage. *Doc Ophthalmol* 査読, 2011, 123: 93-108. DOI: 10.1007/s10633-011-9285-y.

[学会発表](計 15 件)

Yoshiko Matsumoto, Akiyasu Kanamori, Makoto Nakamura, Ichiro Nakashima, Akira Negi. Impact of plasma from patients with neuromyelitis optica spectrum disorders on the optic nerve degeneration in rats. Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting .2013年5月6日, シアトル.
Akiko Miki, Akiyasu Kanamori, Makoto Nakamura, Yoshiko Matsumoto, Junji Mizokami, Akira Negi. Syntaphilin is expressed in astrocytes in optic nerve and is down-regulated in optic nerve after axonal injury. Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting .2013年5月5日, シアトル.
金森章泰, 他. 視神経脊髄炎関連ラット神経炎モデルの作製. 第 117 回日本眼科学会総会. 2013年4月4日, 東京
Makoto Nakamura. Anti-aquaporin-4 antibody-positive optic neuritis. *American Academy of Ophthalmology*.

2012年11月11日, シカゴ.
Makoto Nakamura. Objective Functional assessment in Glaucoma. 27 回 Asia-Pacific Academy of Ophthalmology Congress. 2012年4月13日, 釜山, 韓国
Makoto Nakamura. Bleb structure associated with long-term IOP control after amniotic membrane-assisted trabeculectomy. *English Glaucoma Academy*. 2011年6月12日, Gyeongju, 韓国
中村 誠. 評議員会指名講演 3 . 緑内障性視神経症への挑戦 . その基礎と臨床における三つの仮説の提唱 . 第 115 回日本眼科学会総会 . 2011年5月14日, 東京

[図書](計 5 件)

中村 誠. 専門医のための眼科診療クオリファイ . 18. 眼底 OCT のすべて . 中山書店, 2013, 337.
中村 誠: 専門医のための眼科診療クオリファイ . 11. 緑内障薬物治療ガイド . 中山書店, 2012, 289

[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

金森章泰 (KANAMORI, Akiyasu)
神戸大学・医学部附属病院・講師

研究者番号： 10444572

根木 昭 (NEGI, Akira)
神戸大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号： 00189359

(3)連携研究者
()

研究者番号：