

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月26日現在

機関番号：13501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659810

研究課題名（和文）MANネットワーク解析による緑内障分子病態の解明

研究課題名（英文）Elucidation of cause of glaucoma by a MAN-network analysis

研究代表者

小泉 修一 (KOIZUMI SCHUICHI)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授

研究者番号：10280752

研究成果の概要（和文）：視神経グリア細胞（ミュラー細胞と視神経末アストロサイト）が視神経節細胞（RGC）突起伸長に果たす役割を明らかにした。視神経グリア細胞は、ATP等ヌクレオチドを放出することによりRGCと連絡を取り（MANネットワーク）、突起を伸展させていた。この突起伸展の責任受容体はP2Y6受容体、細胞内シグナルにはAktが関与していた。視神経グリア細胞は、RGCの突起伸展やそのサポートにより、RGC機能を制御していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Effects of retinal glial cells (Muller cells and retinal astrocytes) on retinal ganglion neurons (RGCs) were investigated. Retinal glia, by releasing ATP or nucleotides, communicated with RGCs (MAN-network) to elongate the neurites. Responsible P2 receptor and intracellular signal for the elongation was P2Y6 receptor and Akt, respectively. Retinal glia had an important role in regulation of several RGCs' functions including their elongation etc.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：眼細胞生物学・緑内障

キーワード：緑内障

1. 研究開始当初の背景

緑内障は40歳以上の20人に1人が罹患している頻度の高い眼疾患で、その患者数は本邦で400万人、全世界では7,000万人に達し、現在、先進国では失明原因の第一位を占める重篤な疾患である。眼圧の上昇が主な病因であるが、最近の疫学調査では『正常眼圧緑内障』の割合が非常に高く、特に本邦では緑内障患者の約3分の2が正常眼圧緑内障であることが明らかとなった。また、進行した緑内

障症例では、眼圧を下降させても病状の進行が停止しない例も存在する。従って、これまでの眼圧下降以外の治療法が必要とされているが、有効性及び安全性が確認されている眼圧非依存性の緑内障治療法はなく、真の病因解明及び新規治療方法開発が強く求められている。そこで、グリア細胞-神経細胞の機能連関を研究してきた小泉（代表）と、緑内障治療・研究の専門家である柏木（分担）

の共同研究により、視神経グリアを切り口とした新規・緑内障治療戦略の開発を計画するに至った。

2. 研究の目的

緑内障の病変として、RGCの軸索機能低下、損傷、軸索流の障害が認められる。本研究計画では、視神経グリア細胞（ミューラー細胞及びアストロサイト）とRGC間にコミュニケーションが存在すること（MANネットワーク）、特に視神経グリア細胞からのシグナルによりRGC機能が制御されている、との作業仮説を提唱し、それを検証する。到達目標は、以下の2点、(1) RGCと視神経グリア細胞間コミュニケーションの有無を明らかにする、(2) (1)によるコミュニケーションによるRGCの機能調節様式及びメカニズムを明らかにする、である。

3. 研究の方法

中枢神経系におけるMANネットワークでは、グリア細胞が放出するATP等ヌクレオチドが、グリア-神経細胞間コミュニケーションを媒介する分子として重要である。従って、眼においても、先ず細胞外ヌクレオチドに注目して検討を行う。

RGCの培養法、視神経グリア細胞の培養方法は、既報に従った（Kashiwagi et al., *Invest Ophthalmol Vis Sci*.2004）。

視神経グリア細胞が放出するヌクレオチド等の液性因子放出は、fura2法によるCa²⁺イメージング法により解析する。放出された因子を認識する受容体及びそのサブクラスについては、fluo4を用いた共焦点レーザー顕微鏡によるCa²⁺イメージング法による機能的な解析及び免疫組織学的及びWestern blotting法による生化学的な手法により明らかにする。

グリア性因子によるRGC機能制御に関して

は、先ずRGCの突起伸長作用に注目する。RGCの突起伸長は、RGCの明視野像を取得し、マニュアルで突起長を計測した。

4. 研究成果

(1) 図1で示す様に、視神経グリア細胞は、Ca²⁺waveと呼ばれる現象を自発的に呈した。これは、ATP等ヌクレオチド分解酵素であるapyrase添加（図右）、またP2受容体拮抗薬suraminにより消失したことから、ATP/P2受容体依存的であることが明らかとなった。また、luciferine-lucifrase法により、視神経グリア細胞からATPが放出されていることも明らかとなった。従って、視神経グリア細胞はATP等ヌクレオチドを放出し、これがオートクラインシグナルとしてグリア細胞自身の機能を制御すると共に、パラクラインシグナルとしてRGCに作用する可能性が示唆された。

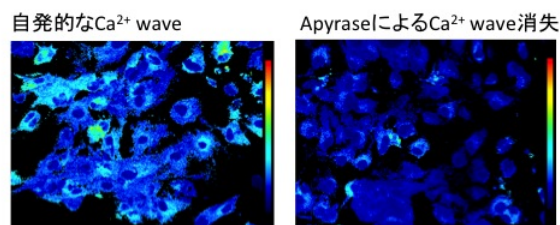


図1 視神経グリア細胞のATP/P2受容体依存的なCa²⁺wave

自発的Ca²⁺wave（左）はヌクレオチド分解酵素apyraseにより消失（右）

(2) ATPは濃度依存的にRGCの突起伸長を惹起した。

細胞外ATP刺激により、濃度依存的なRGC突起を伸長が認められた(図2BCD)。

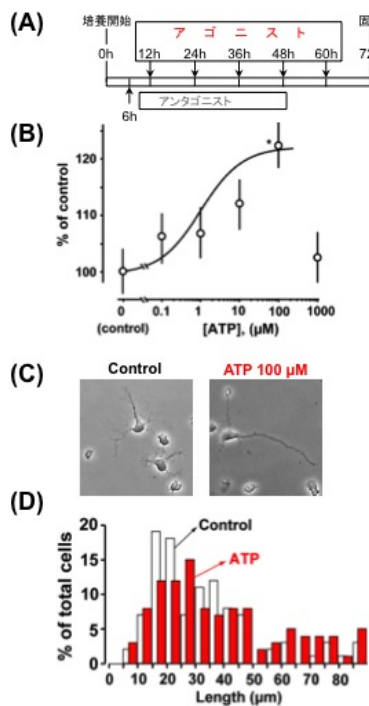


図2 ATPによるRGCの突起伸展作用
(A)スケジュール。(B)ATPによる濃度依存的な突起伸展作用。(C)ATP(100 μM)添加後のRGCの明視野像。(D)ATPにより惹起された突起長のヒストグラム。

(3) RGCの突起伸展に關する責任受容体はP2Y6受容体であった。

薬理的な解析により、RGCの突起伸展を引き起こすアゴニストはATP/UDPであった。また、suramin, PPADS, reactive blue2 (RB2) 及び MRS2578 が、これらアゴニストによるRGC突起伸長作用を抑制した。これらの結果から、P2Y6受容体が責任受容体であることが明らかとなった。また、ATPによる強い突起伸展作用から、P2Y6受容体以外のATP受容体の関与も完全には否定できない。そこでP2Y6受容体欠損マウスのRGCを用いて、UDPによる突起伸長作用を検討した。P2Y6受容体アゴニストUDP刺激による突起伸長は、P2Y6受容体欠損マウスでは統計学的に有意に抑制されていた(図3)。

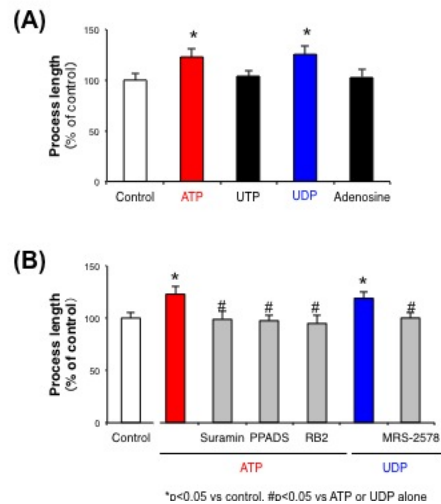


図3 RGCの突起伸展作用に關する責任受容体

(A)各種アゴニストの作用。(B)ATP及びUDPにより惹起される突起伸展作用に対する、P2受容体拮抗薬(suramin, PPADS, reactive blue2 (RB2))及びP2Y6受容体拮抗薬(MRS-2578)の作用。

(4) RGCはP2Y6受容体タンパクを発現していた。

Ca²⁺イメージング法とWestern blotting法により、RGCにP2Y6受容体が発現していること、また機能していることを明らかとした。図4(A)で示す様に、RGCにP2Y6受容体アゴニストUDPを添加すると、顕著な細胞内Ca²⁺濃度上昇が認められた。これは、広範なP2受容体アゴニストATPによる作用よりも大きかった(B)。さらに、RGCにおけるP2Y6受容体蛋白の存在も明らかとなった。P2Y6蛋白質は、RGCだけでなく、視神経グリア細胞にも存在していた(図4C)。以上より、視神経グリア細胞は、ATP/UDPを放出し、これによりRGCに存在するP2Y6受容体を刺激し、突起伸長作用を呈していることが明らかとなった。

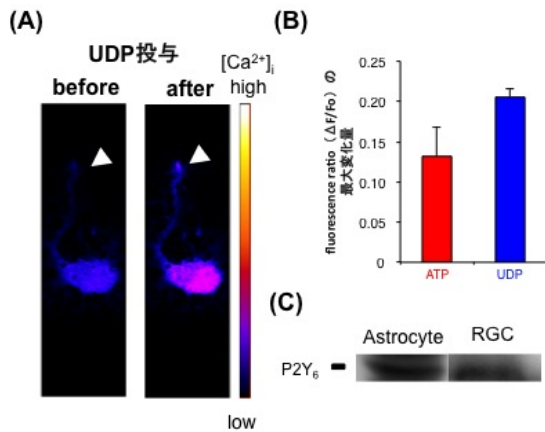


図4 RGCのP2Y6受容体

(A)UDP 刺激により惹起される RGC の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇。(B)UDP 及び ATP により惹起された Ca^{2+} 濃度上昇のまとめ。(C)Western blotting による RGC 及びアストロサイトの P2Y6 受容体の確認。

(5) RGC-視神経グリア細胞共培養系では RGC の突起伸長が亢進し、これは ATP/UDP 分解酵素により退縮した。

最後に、視神経グリア細胞が、ATP/UDP 等のヌクレオチド放出により、RGC の突起を伸長させるか否かについての検討を行った。図5 (A) で示す様に、視神経グリア細胞と RGC を半透膜で仕切って播種し、視神経グリア細胞からの液性因子が RGC に到達出来るような条件で、RGC の突起伸長作用を観察した。(B)のように、グリア細胞存在下では、RGC は顕著な突起伸長作用を呈したが、ヌクレオチド分解酵素 *apyrase* の添加により、この作用はほぼ消失した。また、このような抑制作用は P2Y6 受容体選択的拮抗薬である MRS-2578 でも認められた。以上、視神経グリア細胞から放出される内在性 ATP/UDP により、RGC は突起を伸長させること、またこのシグナルの消失は、突起退縮に繋がることが明らかとなった。

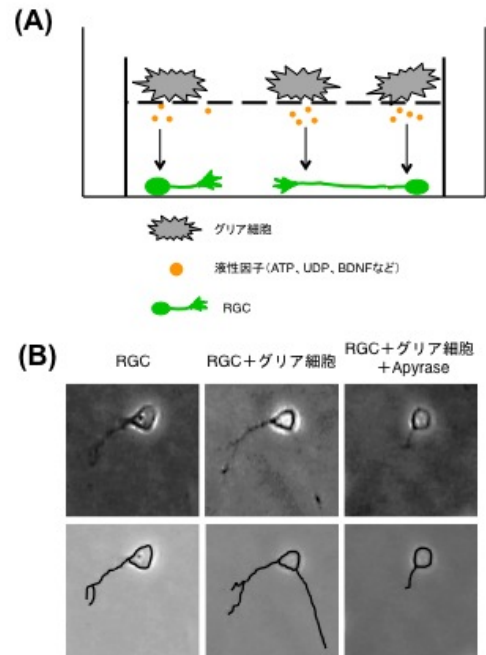


図5 RGCと視神経グリア細胞の共培養系

(A)共培養系の模式図。視神経グリア細胞由来の液性因子は、半透膜を介して RGC に到達できる。(B)視神経グリア細胞は、細胞外 ATP/UDP 依存的に RGC の突起を伸展させた。

以上、視神経グリア細胞は、ATP/UDP を介したグリア伝達により、RGC の突起伸長亢進作用を有することが明らかとなった。このグリア伝達物質によるパラクライン様制御が、RGC の軸索変性の抑制、軸索流の改善に繋がる可能性が示唆された。また、このシグナルの消失により、RGC の突起退縮が認められたことから、緑内障の分子病態に繋がる RGC の軸索機能異常に、視神経グリア伝達の異常が関係している可能性も示唆された。

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3件)

1. Noguchi, Y., Shinozaki, Y., Fujishita, K., Shibata, K., Imura, Y., Morizawa, Y., Gachet, C. and Koizumi, S. Astrocytes

protect neurons against methylmercury via ATP/P2Y₁ receptor-mediated pathways in astrocytes. **PLoS One**, in press. doi: 10.1371/journal.pone.0057898. 2013 年 査読有

2. Furuya T, Pan Z, Kashiwagi K. Role of retinal glial cell glutamate transporters in retinal ganglion cell survival following stimulation of NMDA receptor. **Curr Eye Res**. 2012 年 Mar;37(3):170-8. doi: 10.3109/02713683.2011.645105 査読有
3. 柏木 賢治 緑内障研究の進歩 より質の高い緑内障診療を目指して **日本眼科学会雑誌** 116 巻 269-267 2012 年 査読有 <http://journal.nichigan.or.jp/PastContent?year=2012&vol=116&number=3&mag=0>

[学会発表] (計 8 件)

1. 篠崎陽一、小泉修一、P2Y₁ receptor negatively regulates astrocytic migration and scar-like structure formation. 第 11 回アジア神経化学会/第 55 回日本神経化学会 合同大会、2012 年 9 月 30 日～10 月 2 日、神戸国際会議場 (神戸市)
2. 篠崎陽一、小泉修一、P2Y₁ 受容体はアストロサイト細胞移動及び瘢痕様構造の形成を負に調節する、第 14 回応用薬理シンポジウム、2012 年 9 月 3 日～4 日、ベルクラシック甲府 (甲府市)
3. 柏木賢治、網膜神経節細胞に対する眼グリア細胞の影響、第 14 回応用薬理シンポジウム、2012 年 9 月 3 日～4 日、ベルクラシック甲府 (甲府市)
4. 篠崎陽一、小泉修一、P2Y₁ receptor blockade enhances astrocytic motility and glial scar formation. Purine2012 2012 年 05 月 31 日、九州大学 (福岡市)
5. 小泉修一、A new role of glial cells in regulation of brain functions. 名古屋大学 GCOE セミナー、2011 年 12 月 1 日、名古屋大学 (名古屋市)
6. 柏木賢治、新たな緑内障診療に向けて、京阪地区眼科勉強会、2011 年 9 月 3 日、森ロイヤルパインズホテル (守口市)
7. 柏木賢治、眼科疾患と薬物治療の特徴、山梨県薬剤師会、2011 年 8 月 20 日、山梨県立文学館 (甲府市)
8. 柏木賢治、より質の高い緑内障診療を目指し、日本眼科学会総会、2011 年 5 月 4 日、東京国際フォーラム (東京都)

[図書] (計 1 件)

1. 柏木賢治、緑内障手術に関する最近の病態理解、金原出版、**眼科**、2011 年、53 (10) P1327-1333

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小泉 修一 (KOIZUMI SCHUICHI)
山梨大学・医学工学総合研究部・教授
研究者番号：10280752

(2) 研究分担者

柏木 賢治 (KASHIWAGI KENJI)
山梨大学・医学工学総合研究部・准教授
研究者番号：30194723

(3) 連携研究者

なし