

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460103

研究課題名(和文) ミュラー細胞による神経 血管連関制御機構の解明と新規緑内障治療戦略開発への応用

研究課題名(英文) Regulatory mechanisms of neurovascular coupling by retinal Muller cells 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・教授

研究者番号：10296519

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000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、ミュラー細胞による神経 血管連関制御機構の解析を行った。そして、1)ミュラー細胞は ERK 経路の活性化を介して網膜の神経と血管に対する保護作用を示すこと、及び2)ミュラー細胞の機能障害は網膜の神経と血管の障害を招き、それは一部、網膜内のグルタミン酸処理能力の低下によることを示した。本研究により、ミュラー細胞は緑内障の進行のみならず発症過程においても保護的な役割を担っていることが明らかになった。またミュラー細胞による「神経 血管連関」の制御機構のより深い理解と緑内障発症及び進行機序の一端が解明された。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to clarify the regulatory mechanisms of neurovascular coupling by retinal Muller cells in the retina using a rat model of retinal degeneration induced by an intravitreal injection of NMDA. The results suggest that 1) activation of the ERK pathway in the Muller cells is involved in protective effects of mTOR inhibitors on neuronal and vascular cells in the retina and 2) dysfunction of Muller cells induces degeneration of neuronal and vascular cells at least in part through the disturbance of glutamate metabolism. These findings expand and update our understanding of the mechanisms of neuronal-glial-vascular interactions in the retina, leading to novel therapeutics and strategies for treating glaucoma.

研究分野：医歯薬学

キーワード：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

緑内障は、糖尿病網膜症とともに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。現在、緑内障薬物治療の中心に「眼圧降下薬」が位置付けられているが、緑内障による視覚障害の進行を完全には阻止できないという事実から、異なる作用機序に基づく治療薬の開発が強く望まれている。

緑内障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、神経細胞を取り巻く環境を改善し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。我々は、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。そして、網膜血管の構造と機能は、血管構成細胞（内皮細胞/平滑筋細胞/周皮細胞）だけでなく、網膜血管周囲に存在する神経細胞やグリア細胞（アストロサイト/ミクログリア/ミュラー細胞）によっても大きく影響を受けることを明らかにしてきた。

ミュラー細胞は、網膜特有のグリア細胞であり、網膜の支柱をなすような形で存在し、グルタミン酸の代謝など網膜の恒常性維持に重要な役割を担うが、神経細胞や視細胞の保護、血液網膜柵の維持に加え、幹細胞としての性質も有するなど、多彩な作用を示すことが明らかにされている。本研究において、緑内障モデル（網膜神経障害モデル）ラットを用いて、ミュラー細胞が、直接、あるいは網膜神経の機能変化を介して間接的に網膜血管の構造・機能維持に関与するか否かを明らかにし、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とその分子基盤を理解することにより、網膜循環の正常化に基づく緑内障（網膜神経障害）の新規予

防・進行抑制戦略を見出す上で重要な手掛り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、網膜における神経グリア 血管連関の成立・維持・破綻の分子機構の解明を通じて、神経細胞以外の多様な細胞群も含めた“網膜の包括的保護”というコンセプトに基づく緑内障の予防・進行抑制戦略開発の新機軸を構築することである。その実現のために、研究期間内に 緑内障モデル（網膜神経障害モデル）ラットの網膜において、ミュラー細胞が神経 血管連関維持にどのような役割を演じているか、ミュラー細胞機能を調節することにより神経グリア 血管連関の破綻を予防する、あるいは回復させる方法、を開発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 nmol）を投与した 2、7 及び 14 日後の網膜に生じる神経/血管障害とミュラー細胞の経時的変化を、それぞれ神経細胞と毛細血管の脱落及びミュラー細胞の特異的マーカー [glutamate transporter (GLAST) 及び glutamine synthetase (GS)] と網膜傷害時にミュラー細胞において発現が上昇する glial fibrillary acidic protein (GFAP) を用いて免疫組織化学的に検討した。

（2）実験的緑内障モデルラットにおいて、網膜のグルタミン酸興奮毒性に対してミュラー細胞が保護的な役割を演じている。その保護作用は mammalian target of rapamycin (mTOR) 阻害薬ラパマイシンによって増強される。本現象の機序について、他の mTOR 阻害薬であるエベロリムス、mTOR 経路の下流分子である S6 キナーゼの阻害薬 PF-4708671、

mTOR 経路に対して抑制的に働く AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) の活性化薬である metformin と AICAR を用いて、NMDA 硝子体内投与後の網膜における神経 / 血管傷害の進行の様子を経時的に観察することにより検討を行った。

(3) Na, K-ATPase 阻害薬である ouabain を硝子体内に投与すると、ミュラー細胞の機能が障害されることを見出し、その結果として生じる網膜神経および血管の変化について詳細な解析を行った。

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・血管内皮細胞の経時変化

NMDA 硝子体内投与後 2 日以内に、網膜の神経節細胞層および内網状層の菲薄化が生じ、続いて血管傷害が生じた。網膜の菲薄化により、ミュラー細胞長は減少したものの、GLAST および GS 発現に顕著な変化は認められなかった。GFAP 発現は NMDA 処置 1 週間以降で大きく上昇することが示された。

(2) Mammalian target of rapamycin (mTOR) 経路とその関連経路の意義

網膜のグルタミン酸興奮毒性に対してミュラー細胞が保護的な役割を演じており、その作用を mTOR 阻害薬であるラパマイシンが増強する。他の mTOR 阻害薬であるエペロリムスも、extracellular signal-regulated kinase (ERK) 経路の活性化を介して NMDA 誘発網膜傷害に対する神経保護作用を示すことが明らかになった。その機序として、ラパマイシンと同様、mTOR 経路の抑制による

ミュラー細胞における ERK 経路の活性化、白血球の浸潤やミクログリアの活性化などの炎症反応の抑制、網膜毛細血管脱落の抑制、が関与する可能性が示された。また mTOR 経路の下流分子である S6 キナ

ーゼの阻害薬 PF-4708671、AMPK の活性化薬であるメトホルミンと AICAR も NMDA 誘発網膜神経傷害を抑制することが示された。緑内障モデルラットの網膜において、ミュラー細胞がグルタミン酸興奮毒性に対して mTOR 経路の活性化を介して保護的な役割を担うことが明らかになった。

(3) ミュラー細胞の機能障害により引き起こされる神経 / 血管傷害

Ouabain 処置 7 及び 14 日後に網膜の表層部と中間部で神経傷害が認められたが、その程度は中間部で大きかった。網膜表層部では、処置 7 及び 14 日ともに血管内皮細胞の脱落が観察されたがその程度は小さかった。一方、網膜中間部の血管は処置 7 日後で脱落し始め、処置 14 日後では更に脱落した。GS 陽性細胞と VEGF (vascular endothelial growth factor) 陽性細胞は減少したが GLAST 陽性細胞には変化が認められなかった。Ouabain による網膜神経傷害は NMDA 受容体拮抗薬により有意に抑制された。従って、ミュラー細胞の機能障害は、網膜内のグルタミン酸処理能力の低下を招き、グルタミン酸興奮毒性に基づく網膜神経細胞死を引き起こすこと、ミュラー細胞における VEGF 発現を低下させることによって網膜毛細血管を脱落することが示唆された。

総括

本研究において、ミュラー細胞の機能障害が緑内障の発症に関与する可能性とその機序が示されたことから、ミュラー細胞は緑内障の進行のみならず発症過程においても保護的な役割を担っていることが明らかになった。ミュラー細胞の機能障害は網膜における神経及び血管の障害を招くという本研究成果は、ミュラー細胞による「神経—血管連関」の制御機構のより深い理解と緑内障発症

及び進行機序の一端の解明をもたらしたものと考えられる。

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7件)

Mori A, Ishikawa E, Amano T, Sakamoto K, Nakahara T. Anti-diabetic drug metformin dilates retinal blood vessels through activation of AMP-activated protein kinase in rats. *Eur J Pharmacol.* 2017 Mar 5;798:66-71. (査読有)

doi: 10.1016/j.ejphar.2017.01.003.

Hayashi I, Aoki Y, Ushikubo H, Asano D, Mori A, Sakamoto K, Nakahara T, Ishii K. Protective effects of PF-4708671 against N-methyl-d-aspartic acid-induced retinal damage in rats. *Fundam Clin Pharmacol.* 2016 Dec;30(6):529-536. (査読有)

doi: 10.1111/fcp.12216.

Nakano A, Nakahara T, Mori A, Ushikubo H, Sakamoto K, Ishii K. Short-term treatment with VEGF receptor inhibitors induces retinopathy of prematurity-like abnormal vascular growth in neonatal rats. *Exp Eye Res.* 2016 Feb;143:120-31. (査読有)

doi: 10.1016/j.exer.2015.10.016.

Hayashi I, Aoki Y, Asano D, Ushikubo H, Mori A, Sakamoto K, Nakahara T, Ishii K. Protective Effects of Everolimus against N-Methyl-D-aspartic Acid-Induced Retinal Damage in Rats. *Biol Pharm Bull.* 2015;38(11):1765-71. (査読有)

doi: 10.1248/bpb.b15-00464.

Nakahara T, Hoshino M, Hoshino S, Mori A, Sakamoto K, Ishii K. Structural and functional changes in retinal vasculature induced by retinal ischemia-reperfusion in rats. *Exp Eye Res.* 2015 Jun;135:134-45.

(査読有)

doi: 10.1016/j.exer.2015.02.020.

Asano D, Nakahara T, Mori A, Sakamoto K, Ishii K. Regression of retinal capillaries following N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity in the neonatal rat retina. *J Neurosci Res.* 2015 Feb;93(2):380-90. (査読有)

doi: 10.1002/jnr.23492.

Aoki Y, Nakahara T, Asano D, Ushikubo H, Mori A, Sakamoto K, Ishii K. Preventive effects of rapamycin on inflammation and capillary degeneration in a rat model of NMDA-induced retinal injury. *Biol Pharm Bull.* 2015;38(2):321-4. (査読有)

doi: 10.1248/bpb.b14-00631.

〔学会発表〕(計6件)

染谷英理子、森 麻美、坂本謙司、石井邦雄、中原 努、ラット網膜においてオピオイド μ 受容体刺激は神経由来の NO 産生を介して血管を拡張させる、第90回日本薬理学会年会(長崎:長崎新聞文化ホール) 2017.03.15

森 麻美、石川衣里子、天野智世、坂本謙司、中原 努、抗糖尿病薬のメトホルミンはラット網膜血管を拡張させる、第90回日本薬理学会年会(長崎:長崎新聞文化ホール) 2017.03.16

中野歩希、中原 努、牛久保裕子、森 麻美、坂本謙司、石井邦雄、新生仔ラット網膜において観察される異常血管形成には視神経節細胞が関与する、日本薬学会第136回年会(横浜:パシフィコ横浜会議センター) 2016.03.27

浅野大樹、青木優人、牛久保裕子、森 麻美、坂本謙司、中原 努、石井邦雄、ラパマイシンは NMDA 誘発網膜障害モデルラットの網膜における炎症と血管傷害を抑制する、第89回日本薬理学会年会(横浜:パシフィコ横浜会議センター)

2016.03.10

牛久保裕子、林郁美、青木優人、浅野大樹、森 麻美、坂本謙司、中原 努、石井邦雄、エベロリムスはラットにおけるNMDA 誘発網膜傷害を抑制する、第 89 回日本薬理学会年会（横浜：パシフィコ横浜会議センター）2016.03.10

森 麻美、牛久保裕子、坂本謙司、中原 努、石井邦雄、網膜における神経細胞を介する循環調節機構、第 133 回日本薬理学会関東部会（柏：柏の葉カンファレンスセンター）2015.10.10

〔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・教授

研究者番号：10296519

(2)研究分担者

森 麻美 (MORIASAMI)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：80453504