

令和元年9月5日現在

機関番号：32723

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08554

研究課題名(和文) 網膜における神経-グリア-血管連関機構解明による網膜疾患治療戦略の新展開

研究課題名(英文) Mechanisms of neuronal-glial-vascular interactions in the retina and the development of novel strategies for treating retinal diseases

研究代表者

石井 邦雄 (ISHII, Kunio)

横浜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：90137993

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：網膜における神経-グリア-血管連関をより深く理解するために、視神経節細胞脱落モデルラットを用いて、神経細胞とグリア細胞の血管構造障害と血管再形成における意義について検討を行った。その結果、1) アストロサイトが既存血管から出芽した新生血管が伸長するための足場を提供すること、そして2) ミュラー細胞が血管成長因子を産生すること、から両グリア細胞が血管の再形成のために重要な役割を担うことが明らかになった。網膜神経傷害時にグリア細胞がどのように網膜血管の恒常性維持に関与するかを示した本研究成果は、グリア細胞機能の制御が網膜疾患の新しい治療戦略になる可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

網膜神経が傷害された際には、一時的に網膜血管への悪影響が認められるが、グリア細胞が神経細胞の役割を補完して、網膜血管の恒常性維持に関与することを明らかにした本研究成果は、網膜における神経-グリア-血管連関のより深い理解をもたらしたとともに、後天性の失明並びに視力低下の主要な原因として、社会問題化している緑内障や網膜症などの網膜疾患に対する治療戦略としてグリア細胞の制御という新しい方向性を示した。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to expand and update our current understanding of the mechanisms of neuronal-glial-vascular interactions in the retina, by using the retinal neuronal cell loss model. In the model, the vasculature is impaired by preventing endothelial cell growth and causing capillary regression. We found that 1) astrocytes produce fibronectin, one of extracellular matrices, which provide a scaffold for revascularization, and 2) Muller cells provide vascular growth factors for driving the angiogenesis associated with revascularization, in the retinal neuronal cell loss model. These findings suggest that glial cells (astrocytes and Muller cells) play an important role in the process of the re-vascularization in the injured retina. Manipulation of glial cell function would be a novel strategy for treating retinal diseases.

研究分野：医歯薬学

キーワード：網膜 微小循環 神経 グリア細胞 血管

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

緑内障及び糖尿病網膜症は、後天性の失明並びに視力低下の主要な原因として、近年、社会問題化している疾患である。両疾患の発症・進行には網膜循環障害が深く関与しているため、網膜循環の正常化による神経細胞の生存環境改善こそが、視覚障害の発症・進行を阻止する上で最優先されるべき予防・治療戦略と考えられる。

我々は、網膜循環を正常化する方法を開発するため、独自の研究手法を駆使して、網膜循環/網膜血管に関する一連の研究を行ってきた。その結果、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が明らかになってきた(引用文献 -)。そして網膜血管周囲に存在する神経細胞やグリア細胞が網膜血管の恒常性維持にどのように関わっているのか、また疾患時に神経-グリア-血管連関がどのように変化するのか、という点を明らかにすることが重要であると考えに至った。

最近、網膜血管の発達初期にある生後 1 週齢の新生仔ラットの硝子体内に *N*-methyl-D-aspartic acid (NMDA) を投与すると、著しい視神経節細胞の脱落と血管の発達障害が観察されるが、その後、成熟期まで成長すると網膜血管網が構築されているとの知見を得た(引用文献)。ラットの網膜では、血管形成に重要な役割を担う vascular endothelial growth factor (VEGF) が視神経節細胞とミュラー細胞に強く発現している。従って、網膜血管の形成には、両細胞が重要な役割を演じているものの、視神経節細胞が傷害された場合には、ミュラー細胞がその役割を補完するようになる可能性が考えられた。この時期に脱落した神経細胞は、成熟期になっても殆ど再生しないので、新生仔期に NMDA を硝子体内投与して視神経節細胞を著しく脱落させたラット(視神経節細胞脱落モデルラット)を用いれば、網膜血管の構造・機能維持における神経細胞とグリア細胞の役割を明確にできると考え、本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

網膜循環の正常化に基づく網膜疾患の新規予防・治療戦略の新しい方向性を見出すために、視神経節細胞脱落モデルラットを用いて、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より深く理解することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 視神経節細胞脱落モデルラットにおける網膜血管の構築過程

NMDA を網膜血管形成過程の初期にある 1 週齢ラットの硝子体内に投与すると、その 7 日後には、著しい視神経節細胞の脱落と網膜血管の発達障害が観察されるが、14 日目以降になると、網膜神経には変化が認められないものの、再び血管が形成され始め、28 日後で形成はほぼ完成する。そこで、NMDA 硝子体内投与後の網膜の構造及び血管の形成過程の詳細を明らかにするため、NMDA 投与 7~28 日後までの網膜グリア細胞(アストロサイト/ミュラー細胞/ミクログリア)の変化について、網膜フラットマウント標本における特異的マーカーの発現変動並びに形態変化を指標として検討した。また小動物眼底撮影用デジタルマイクروسコープを用いて、NMDA 投与 14 日後から 1 週間毎に眼底像を観察した。

(2) 視神経節細胞脱落モデルラットにおける網膜血管の構築機序

血管の新生及び維持に重要な役割を演じている VEGF の意義を明らかにするため、網膜血管が再び形成され始める NMDA 投与 14 日後から VEGF 受容体阻害薬である KRN633 を

2 日間投与し、その翌日 (NMDA 投与 16 日後) に網膜の表層部と深層部における血管を評価した。

網膜内の VEGF 発現分布について、蛍光免疫組織化学的手法により検討した。また VEGF と神経並びにグリア細胞との共染色により発現細胞の同定を行った。

(3) 視神経節細胞脱落モデルラットにおいて構築された網膜血管の構造と機能

血管ネットワーク構造：血管ネットワーク全体の構造と血管内皮細胞及び血管基底膜の形態は、網膜フラットマウント標本の各種特異的マーカーを用いた蛍光免疫組織化学的手法により評価した。

網膜血管拡張機能：観血的に血圧を測定しつつ、各種血管拡張薬を静脈内投与し、小動物眼底撮影用デジタルマイクロスコープを用いて経時的に眼底撮影を行い、画像解析ソフトを用いて眼底写真を処理することにより、網膜血管径の変化について評価した。

4 . 研究成果

(1) 視神経節細胞脱落モデルラットの網膜血管の構築過程

アストロサイトの形態と数をそれぞれ GFAP と Pax2 の免疫染色により検討したところ、NMDA 投与 2 から 14 日後まではアストロサイトの突起伸長と細胞体の肥大化が認められるが、28 日後には対照と同様な形態に戻ることで、その間、アストロサイトの数は変化しないこと、

fibronectin は NMDA 投与 2 日後において、血管基底膜の構成成分として血管に沿って存在するものと網膜実質のアストロサイトが産生するものとして認められること、NMDA 投与 7 及び 14 日後では、毛細血管の脱落に伴い網膜実質において血管基底膜とは異なる fibronectin のネットワークが観察され、その fibronectin のネットワークに沿うように既存血管からの血管新生芽が認められるようになること、21 及び 28 日後では、血管が再形成されるのに伴い網膜実質における fibronectin は認められなくなることを明らかにした。

以上の結果より、視神経節細胞の脱落後に活性化したアストロサイトが産生した fibronectin のネットワークが既存血管から出芽した新生血管の伸長の足場としての役割を担い、網膜血管の再形成に關与する可能性が示された。

(2) 視神経節細胞脱落モデルラットにおける網膜血管の構築機序

網膜血管が再び形成され始める NMDA 投与 14 日後から VEGF 受容体阻害薬である KRN633 を 2 日間投与した、その翌日 (NMDA 投与 16 日後) には、網膜表層部及び表層部から深層部への血管新生は抑制され、表層部及び深層部に新生した血管が脱落すること、NMDA 投与 14 日後において、VEGF を発現する細胞群 (残存した視神経節細胞とミュラー細胞) には変化が認められないものの、網膜の菲薄化による網膜内 VEGF 含量が減少すること、が明らかになった。

以上の結果より、視神経節細胞脱落モデルラットにおいても血管形成に VEGF が大きく關与していることが示された。本モデルラットでは、視神経節細胞が著しく脱落しているため、グリア細胞が産生する VEGF が血管新生に關与する可能性が考えられた。

(3) 視神経節細胞脱落モデルラットにおいて構築された網膜血管の構造と機能

1 週齢のラットに NMDA を硝子体内投与し 14 日後から同一個体の眼底像を 1 週間毎に観察したところ、経時的に網膜細動脈及び細静脈の径が減少し、49 日後 (8 週齢) には、こ

れまで検討を行った各種病態モデルラットでは観察したことがないほどの、網膜細動脈の攣縮が認められるようになった。投与 49 日後に、内皮依存性血管拡張薬である acetylcholine 又は網膜血管において拡張作用を示す adrenaline を投与して拡張機能の評価を試みたところ、モデルラットにおいても、網膜細動脈が拡張する様子が認められたが、著しい血管攣縮のため基礎血管径が算出不可能であり、定量的な評価が困難であった。

以上の結果から、視神経節細胞脱落モデルラットの網膜細動脈及び細静脈では、収縮機能が著しく亢進しており、網膜血流障害の発症リスクが高まっている可能性が考えられた。

(4) 総括

これまでの研究により、網膜において神経は血管の新生及び恒常性維持に重要な役割を担っていることが明らかになっていた。本研究において、網膜神経が傷害され脱落した際には、一時的に毛細血管が脱落する等の血管系への悪影響が認められるが、グリア細胞であるアストロサイトが既存血管から出芽した新生血管の伸長の足場を提供し、ミューラー細胞が血管成長因子を産生することで、血管内皮細胞の生存・増殖・遊走を促進することにより、血管の再形成に重要な役割を演じることが明らかになった。網膜神経傷害時にはグリア細胞が神経細胞の役割を補完して、網膜血管の恒常性維持に関与するという本知見は、網膜における神経—グリア—血管連関のより深い理解をもたらしたとともに、網膜疾患の治療戦略としてグリア細胞の制御という新たなアプローチの提案に繋がるものと考えられる。

< 引用文献 >

- 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;135:134-45.
- Mori A, Hanada M, Sakamoto K, Nakahara T, Ishii K. Impaired retinal vasodilator response to acetylcholine in a rat model of NMDA-induced retinal degeneration. *J Pharmacol Sci.* 2015;127(2):211-6.
- 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;93(2):380-90.
- Asami Y, Nakahara T, Asano D, Kurauchi Y, Mori A, Sakamoto K, Ishii K. Age-dependent changes in the severity of capillary degeneration in rat retina following *N*-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity. *Curr Eye Res.* 2015;40(5):549-53.
- Morita A, Nakahara T, Abe N, Kurauchi Y, Mori A, Sakamoto K, Nagamitsu T, Ishii K. Effects of pre- and post-natal treatment with KRN633, an inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase, on retinal vascular development and patterning in mice. *Exp Eye Res.* 2014;120:127-37.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- Someya E, Mori A, Sakamoto K, Ishii K, Nakahara T. Stimulation of μ -opioid receptors dilates retinal arterioles by neuronal nitric oxide synthase-derived nitric oxide in rats. *Eur J Pharmacol.* 803: 124-129, 2017. Doi: 10.1016/j.ejphar.2017.03.043. 査読有
- Mori A, Sekito A, Sakamoto K, Ishii K, Nakahara T. Stimulation of β_1 - and β_2 -adrenoceptors dilates retinal blood vessels in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 390: 527-533, 2017. Doi: 10.1007/s00210-017-1349-4. 査読有
- Mori A, Higashi K, Wakao S, Sakamoto K, Ishii K, Nakahara T. Probuocol prevents the attenuation of β_2 -adrenoceptor-mediated vasodilation of retinal arterioles in diabetic rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 390: 1247-1253, 2017. Doi: 10.1007/s00210-017-1423-y. 査読有

〔学会発表〕(計 1 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 2017.03.15 長崎新聞文化ホール(長崎県長崎市)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：中原 努

ローマ字氏名：NAKAHARA, Tsutomu

所属研究機関名：北里大学薬学部

部局名：分子薬理学

職名：教授

研究者番号(8桁): 10296519

研究分担者氏名：森 麻美

ローマ字氏名：MORI, Asami

所属研究機関名：北里大学薬学部

部局名：分子薬理学

職名：助教

研究者番号(8桁): 80453504