

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11449

研究課題名(和文) フマル酸ジメチルの抗酸化作用ならびに免疫調節作用を介した神経保護効果

研究課題名(英文) Neuroprotection of retinal ganglion cells mediated by the antioxidative effects and immunomodulative effects of dimethyl fumarate

研究代表者

栗本 拓治 (Kurimoto, Takuji)

神戸大学・医学部附属病院・特定助教

研究者番号：50388815

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：マウス視神経挫滅モデルを用いて、DMF/MMFの網膜神経節細胞(RGC)の生存促進効果を検討したところ、DMF/MMFの両薬剤ともに濃度依存性に生存促進効果が見られ、100mg/kgにおいて効果は最大であった。DMF/MMF投与により、網膜電図のRGCの成分であるpSTRの振幅がvehicle投与群と比較すると有意に振幅上昇が見られた。さらに、DMF/MMF投与により、抗酸化酵素群の一つであるヘム酵素添加酵素(HO-1)の発現も上昇していた。以上の結果から、DMF/MMF投与は、ONCを受けたRGCの機能的・形態的に生存促進させ、Keap1/Nrf2-HO-1の発現上昇を伴っていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果から、DMF/MMFの連日投与は、ONC後のRGCに対して神経保護効果を発揮することが明らかになった。そして、既報から明らかにされているDMF/MMFの抗酸化作用、免疫調整作用のうち、抗酸化酵素の一つであるHO-1の網膜内発現レベルを明らかに亢進させることがわかった。脂溶性エステルであるテクフィデラが多発性硬化症への臨床治験では、顔面紅潮、胃腸障害は高頻度に出現するが、重篤な副作用はほとんどなく、安全性は既に確立されている。様々な視神経変性疾患への臨床応用への可能性を示す貴重な基礎データと考えられ、緑内障をはじめとする視神経疾患の患者数を考慮すると社会的意義も高い。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated the survival-promoting effects of DMF/MMF using the optic nerve crush model in mice. As a result, the daily application of both DMF and MMF dose-dependently enhanced the survival of RGCs 7 days after optic nerve crush, and both DMF and MMF at 100mg/kg concentration were maximum survival-promoting effects. Furthermore, pSTR, the component of the electrical retinogram, which reflects the activity of RGC, was significantly increased by daily application of DMF/MMF at 100mg/kg concentration. The application of DMF/MMF upregulated the retinal expression of HO-1, one of the antioxidant enzymes. From these results, the administration of DMF / MMF promoted functionally and morphologically survival of retinal ganglion cells damaged by the optic nerve crush and was possibly accompanied by the upregulation of antioxidant effects of Keap1/ Nrf2 - HO-1.

研究分野：眼科学

キーワード：網膜神経節細胞 神経保護

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1 研究開始当初の背景

フマル酸ジメチル(Dimethyl fumarate: DMF)とその誘導体であるフマル酸1-メチル (Monomethyl fumarate: MMF)は、自己免疫疾患である慢性皮膚疾患の乾癬や多発性硬化症に対する経口薬として臨床応用され、高い安全性と有効性が確立されている。これまでに、DMF/MMFの薬理作用には、抗酸化作用と免疫調節作用を同時に有していることが明らかとなっている。DMFによる抗酸化作用は、Keap1/Nrf2 (Kelch-like ECH associated protein 1/ NF-E2 related factor 2)システムを介したシグナル経路が関与していることが明らかにされている。MMFは、直接 Keap1 と結合し、Nrf2 の核内移行を促進させ、ヘム酵素添加酵素(HO-1)、NADPH キノン酸化還元酵素(NGO-1)、グルタミルシステイン合成酵素(GCLC)などの抗酸化酵素群を誘導する。抗酸化作用以外に、Keap1/Nrf2 経路、Gタンパク質共役受容体の一つである Hydroxycarboxylic acid receptor 2(HCAR2)を介した免疫調節作用を有することが明らかとなっている。MMFはHCAR2のアゴニストであり、実験的自己免疫性脳脊髄炎モデルにおいて、DMF、MMF投与により好中球浸潤の抑制、神経症状の改善が見られ、Hcar2 遺伝子欠損マウスでは、DMFの神経保護作用は有意に抑制される。他にギランバレーモデルにおいては、DMF投与により浸潤したマクロファージの極性がM1からM2へ転換し、IFN- $\gamma$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-17の炎症性サイトカインの産生抑制、二次的な神経保護効果を発揮する。

眼科領域においては、緑内障、レーベル遺伝性視神経症、虚血性視神経症などの視神経変性疾患モデル動物においても、酸化ストレス、ミトコンドリア機能異常、活性化ミクログリア、マクロファージ、炎症性サイトカインが網膜神経細胞の変性、軸索変性に関与していることが明らかになっている。Keap1/Nrf2 経路の活性化は、視神経挫滅モデル、網膜一過性虚血再灌流モデルにおける網膜神経細胞死への抑制効果を発揮することが明らかとなっている。

### 2 研究目的

本研究目的は、DMF/MMFの抗酸化作用と免疫調節作用に着目し、マウスのONCモデルを用いて、ONC後の網膜神経節細胞(RGC)の生存促進効果を明らかにすることである。

### 3 研究の方法

#### (1)DMF/MMFによるRGCの生存促進効果の検討

DMF/MMFの視神経に対する神経保護効果の検証として、ONCモデルを用いた。ONCは、C57BL/6Jマウスに対してケタミン(100mg/kg)とキシラジン(10mg/kg)の腹腔内注射を行い麻酔し、その後左視神経を露出させ眼球より0.5mm後方の視神経を鑷子にて10秒間把持し、挫滅を施行した。また同日よりDMF(経口投与)、MMF(腹腔内投与)を連日投与し、挫滅後1週目に灌流固定を行い、摘出網膜の伸展標本作製し、網膜神経節細胞(RGC)を標識する抗体としてTuj-1抗体を使用して、マウス網膜1標本あたり視神経乳頭からそれぞれ上・下・耳・鼻側に1mm $\times$ 2mmの計8点において1視野あたり0.145mm<sup>2</sup>画の画角において計測を行った。DMFはそれぞれvehicleのみの0から25, 50, 100, 150 mg/kg、MMFはそれぞれvehicleのみの0から25, 50, 100, 200mg/kgの濃度で投与を行った。

#### (2)DMF/MMFによるRGCの生存促進効果の機能評価

視機能の評価として、一晚暗順応させたマウスを用いて網膜電図(ERG)を行った。DMF/MMF投与群としては図1の実験で有意な神経保護作用を認めたDMF(100mg/kg)、MMF(100 mg/kg)の濃度を採用して実験を行った。対照群として、sham opeのみ施行したマウスとONC後vehicleのみ投与したマウスも評価した。全ての手技は、マウス網膜が感知できない暗赤色灯下で記録を行った。マウスはケタミ

ン(100mg/kg)とキサラジン(10mg/kg)の腹腔内注射を行い麻酔し、散瞳下にて、メイヨー社の動物用 ERG 機器(Bigshot)を使用して記録を行った。37 に設定したマウス用保温マット下に腹臥位で寝かせ、左眼に暗順応検査として 10kHz にて、それぞれ刺激輝度を  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $3 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-5}$  と変化させそれぞれ刺激を行った。各刺激は暗順応検査時には 30 回行い平均加算処理を施行している。暗順応検査の際に得られた陽性暗順応閾値応答(positive cotopic threshold response; pSTR)を評価対象とした。

### (3) Keap1/Nrf2 システムの発現変化ならびに抗酸化酵素群の検討

DMF/MMF が Keap1/Nrf2 - HO-1 経路を介して生存促進作用を発揮しているかを検討した。最大生存促進効果が得られた DMF/MMF 濃度を用いて、ONC 後 7 日間連日投与を行い、Nrf2 と HO-1 の網膜内層の発現をそれぞれ Nrf2 抗体と HO-1 抗体を用いて、免疫組織染色とウエスタンブロッティング(WB)により評価した。WB に関しては、マウス網膜抽出物を細胞成分と核成分に分離し、それぞれの成分を検討した。

## 4 研究成果

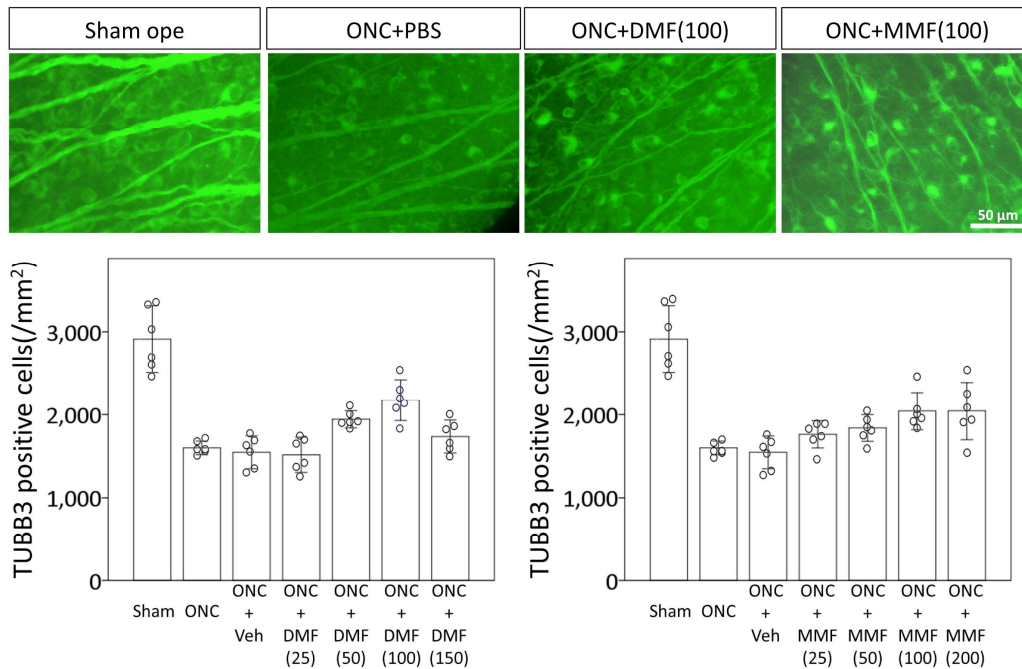


図1

(1) 図1は、それぞれ ONC1 週間後の抗 TUBB3 抗体で染色した RGC 密度を示す。Sham ope 群に比較して ONC 後では、有意に RGC 密度が約半数程度に減少していた(n=6,  $p < 0.0001$ , repeated ANOVA)。しかしながら、DMF/MMF 投与群においては、濃度依存性に RGC 密度が上昇し、DMF は 50mg/kg, 100mg/kg 投与群、MMF は 100mg/kg, 200mg/kg 投与群において、ONC+vehicle 投与群と比較して、有意に RGC 密度が上昇していた (n=6,  $p < 0.05$ , repeated ANOVA)。そして、DMF/MMF とともに、生存促進効果は 100mg/kg 濃度で最大であった。これらの結果から、DMF/MMF 連日投与により、ONC 後の RGC の生存は促進されることが明らかとなった。

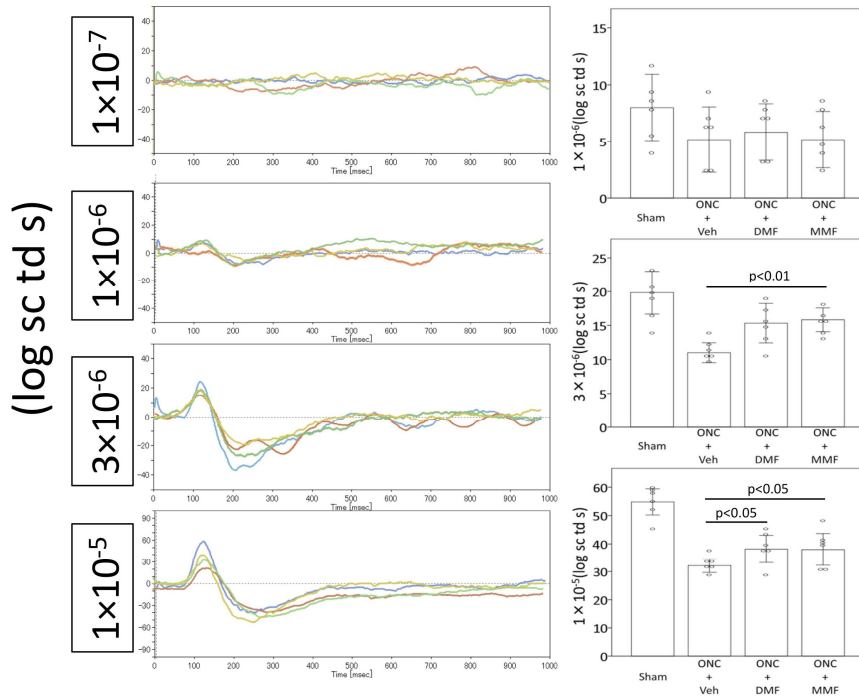


図2

(2) 図2は網膜電図の結果を示す。 $1 \times 10^{-7} \cdot 1 \times 10^{-6}$  ( $\text{cd} \cdot \text{s}/\text{mm}^2$ )の刺激輝度においては、わずかなpSTRが確認できるのみであり、sham ope群、ONC+vehicle投与群、DMF、MMF投与群では有意な振幅の変化は認められなかった。しかしながら、 $3 \times 10^{-6}$  ( $\text{cd} \cdot \text{s}/\text{mm}^2$ )の刺激輝度において、pSTRはONC+vehicle投与群と比較して、MMF投与群では有意にpSTRの振幅は増大していた ( $n=6$ ,  $p<0.01$ , repeated ANOVA)。また  $1 \times 10^{-6}$  ( $\text{cd} \cdot \text{s}/\text{mm}^2$ )の刺激輝度においては、ONC+vehicle投与群と比較してDMF/MMF投与群ともに有意にpSTRの振幅は増大していた ( $n=6$ ,  $p<0.05$ , repeated ANOVA)。以上の結果より、DMF/MMF投与によるONCに対する生存促進効果は、形態的だけでなく機能的にも保持されていたことが明らかとなった。

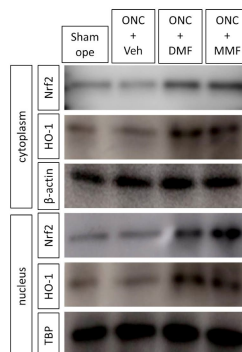
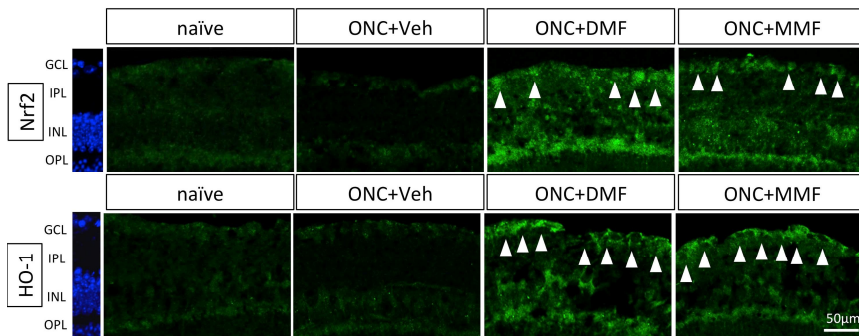


図3

図4

(3) 次に、sham ope群、ONC+vehicle群、ONC+DMF (100mg/kg)投与群、ONC+MMF(100mg/kg)投与

群の Nrf2 と HO-1 の免疫染色(図3)と WB(図4)の結果を示す。DMF, MMF 投与群において、Nrf2・HO-1 の網膜内層においての発現上昇を認め(白矢頭)、また WB においても細胞質成分・核成分ともに Nrf2・HO-1 の発現上昇が見られた。これらから DMF, MMF による RGC の生存促進効果は、Keap1/Nrf-HO-1 経路を介している可能性が示唆された。

本研究結果を踏まえ、他の視神経疾患、網膜疾患モデルを用いて、DMF/MMF の神経保護効果を検討し、難治性網膜視神経疾患の新規治療薬としての可能性を検討する。これまで、国内外ともに DMF/MMF による視神経損傷後の RGC の生存促進効果は報告されていない。今後、主要な学術雑誌に投稿予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Mori Sotaro, Kurimoto Takuji, Ueda Kaori, Enomoto Hiroko, Sakamoto Mari, Keshi Yukako, Yamada Yuko, Nakamura Makoto	4. 巻 9
2. 論文標題 Optic Neuritis Possibly Induced by Anti-PD-L1 Antibody Treatment in a Patient with Non-Small Cell Lung Carcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Case Reports in Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 348 ~ 356
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000491075	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Mori Sotaro, Kurimoto Takuji, Ueda Kaori, Nakamura Makoto	4. 巻 62
2. 論文標題 Short-term effect of additional apheresis on visual acuity changes in patients with steroid-resistant optic neuritis in neuromyelitis optica spectrum disorders	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 525 ~ 530
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10384-018-0602-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Mori Sotaro, Sakamoto Mari, Kurimoto Takuji, Kanamori Akiyasu, Ueda Kaori, Inoue Yukako, Yamada Yuko, Nakamura Makoto	4. 巻 256
2. 論文標題 Effectiveness and safety of sulcus fixation of Baerveldt glaucoma implants in glaucomatous eyes in patients who underwent multiple intraocular surgeries	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 1953 ~ 1960
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00417-018-4044-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sakamoto Mari, Kurimoto Takuji, Mori Sotaro, Ueda Kaori, Keshi Yukako, Yamada Yuko, Azumi Atsushi, Shimon Taro, Nakamura Makoto	4. 巻 12
2. 論文標題 Vasculitis with superior ophthalmic vein thrombosis compatible with neuro-neutrophilic disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 American Journal of Ophthalmology Case Reports	6. 最初と最後の頁 39 ~ 44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajoc.2018.08.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sakamoto Mari, Matsumoto Yoshiko, Mori Sotaro, Ueda Kaori, Inoue Yukako, Kurimoto Takuji, Kanamori Akiyasu, Yamada Yuko, Nakamura Makoto	4. 巻 13
2. 論文標題 Excessive scleral shrinkage, rather than choroidal thickening, is a major contributor to the development of hypotony maculopathy after trabeculectomy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0191862	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsumoto Yoshiko, Mori Sotaro, Ueda Kaori, Kurimoto Takuji, Kanamori Akiyasu, Yamada Yuko, Nakashima Ichiro, Nakamura Makoto	4. 巻 12
2. 論文標題 Impact of the anti-aquaporin-4 autoantibody on inner retinal structure, function and structure-function associations in Japanese patients with optic neuritis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0171880	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kurimoto Takuji, Ueda Kaori, Mori Sotaro, Kamada Seiko, Sakamoto Mari, Yamada-Nakanishi Yuko, Matsumiya Wataru, Nakamura Makoto	4. 巻 9
2. 論文標題 A Single-Arm, Prospective, Exploratory Study to Preliminarily Test Effectiveness and Safety of Skin Electrical Stimulation for Leber Hereditary Optic Neuropathy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 1359 ~ 1359
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm9051359	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Takuji Kurimoto, Sotaro Mori, Akiyasu Kanamori, Seita Wakabayashi, Rie Nakanishi, Mari Sakamoto, Kaori Ueda, Yukako Inoue, Yuko Yamada, Makoto Nakamura
2. 発表標題 The Anatomical Relationship Between Optic Disc-Fovea And Temporal Raphe Axes In Healthy Subjects
3. 学会等名 11th World Glaucoma Congress (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 栗本拓治、盛崇太郎、金森章泰、若林星太、中西理恵、坂本麻里、井上由香子、山田裕子、中村 誠
2. 発表標題 健常眼における視神経乳頭 中心窩線と耳側縫線の解剖学的位置関係の検討
3. 学会等名 第121回日本眼科学会総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	中村 誠  (Nakamura Makoto)  (80273788)	神戸大学・医学研究科・教授    (14501)	