

令和 3 年 4 月 26 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09447

研究課題名(和文) アクアポリノパチーとしての網膜・視神経変性の病態解明

研究課題名(英文) Pathogenesis of neuroretinal degeneration as an aquaporinopathy

研究代表者

中村 誠 (Nakamura, Makoto)

神戸大学・医学研究科・教授

研究者番号：80273788

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：アクアポリン(AQP)9ノックアウト(KO)ならびに野生型(WT)マウスに視神経挫滅を与えた。WT網膜では網膜神経節細胞(RGC)のAQP9発現が低下した。AQP9はmonocarboxylase transporter (MCT)1,2,4と共発現するが、挫滅によりMCT1,4の共発現が消失した。AQP9 KOマウスの方がWTより挫滅によるRGC細胞死数と暗所視閾値電位低下の程度が強かった。AQP9 KO網膜は乳酸濃度が高くなり、挫滅によりGLUT1,3発現が強くなった。AQP9がMCTと協調して乳酸を供給することがストレス下RGCの生存と機能維持に不可欠であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳酸はかつて代謝過程における廃棄物と考えられてきたが、近年、脳科学分野において、グルコース以上に神経細胞に選好されるエネルギー基質である可能性が示されている。今回の研究では、AQP9がMCTと協調して、網膜内層において乳酸をRGCに輸送し、とりわけストレス下において網膜神経節細胞の機能と生存維持に極めて重要な役割を果たしていることを初めて示した。外傷性視神経症や虚血性視神経症のような急性疾患のみならず、代表的な慢性視神経変性疾患である緑内障において、乳酸輸送障害という新たな視点から、その病態メカニズムを解明し、新規治療法を開発するマイルストーンとなる研究成果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Aquaporin (AQP) 9 knockout (KO) and wildtype (WT) mice underwent optic nerve crush (ONC), which reduced AQP9 expression in retinal ganglion cells (RGCs) of WT mice. AQP9 was co-expressed with monocarboxylate transporter (MCT)1,2, and 4 in naive mouse retina, whereas ONC dissociated the interaction of AQP9 with MCTs 1 and 4. The number of RGC death and the magnitude of reduced scotopic threshold response was larger in the AQP9 KO mice compared with the WT mice. Intraretinal lactate concentration was more increased in the AQP9 KO mice, while retinal GLUT1 and 3 expression increased in mice with ONC. These results have demonstrated that lactate supply via AQP9 in concert with MCTs is critical for maintenance of RGC survival and function.

研究分野：眼科学

キーワード：網膜神経節細胞 アクアポリン 乳酸 視神経脊髄炎 緑内障 アストロサイト 暗所視閾値電位

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アкваポリン (AQP) は、分子量約 30kDa の 6 回膜貫通型水チャンネルである。哺乳類では 13 種類のアイソフォームが同定され、ファミリーを形成している。原則として水分子を選択的に透過させるが、乳酸などの monocarboxylate を透過させるものもあり、これを aquaglyceroporin と呼ぶ。近年、緑内障、糖尿病網膜症、視神経脊髄炎 (NMO) など、網膜・視神経変性を引き起こす様々な病態において AQP 分子の発現変化が生じることが分かってきた。

緑内障は我が国の成人中途失明原因の第一位の視神経変性疾患であるが、発症・進行機序は未だ不明である。我々は、緑内障眼では視神経アストロサイトならびに網膜神経節細胞 (RGC) における AQP9 発現が低下すること、強制的に AQP9 発現を抑制された RGC においては、乳酸含有培養液中で細胞内活性酸素産生が増大し、細胞死に陥ることを見出していた。これらのことは、網膜において aquaglyceroporin に属する AQP9 が、単に水輸送を司るのみならず、エネルギー基質としての monocarboxylate、とりわけ乳酸を輸送する機能を有し、緑内障ではその機能が低下することで RGC 死を招来する可能性を示唆する。また培養 RGC 株は、培養液にグルコースがなくとも、同じモル数の炭素を含む乳酸が含まれていれば、生存を維持するが、siRNA で AQP9 発現を抑制すると、活性酸素産生が上昇して、細胞死が増加することも見出していた。しかしながら、*in vivo* における AQP9 の RGC 生死や機能に及ぼす役割は未検討であった。

NMO における視神経変性は、AQP4 自己抗体、補体、血液脳関門破綻の三者が関与して成立する。基本的には視神経のアストロサイトが主たる標的であるが、網膜に存在する Müller 細胞も AQP4 を発現しているので、NMO では網膜障害も primary に生じているという報告もある。我々は、げっ歯類視神経に NMO 患者血清を暴露することで視神経アストロサイトにおける AQP4 発現の減少と逆行性 RGC 死を誘導するモデルを構築し、同モデルに免疫グロブリンの静脈内投与 (IVIg) を行うことで RGC 死を抑制できることを示していた。しかし、抗 AQP4 抗体陽性ヒト患者において IVIg が有効であるかどうかは検証されていなかった。さらに、光干渉断層計を用いた臨床研究において、AQP4 抗体陽性視神経炎患者と陰性患者の間で網膜神経線維の菲薄化に差はないにもかかわらず、前者はこの構造変化と視機能変化に有意な相関があるのに対して、後者は構造変化と無関係に視機能予後は良好であることを見出していた。一方、我が国において視神経炎患者の中にどの程度抗 AQP4 抗体陽性例が存在するかは不明であった。NMO の急性期において早期の血液浄化療法の介入が良好な予後と関連すること、ならびに再発抑制に免疫抑制剤が有効であることが知られていたが、どちらも脳神経内科的研究が中心で、標的も脊髄炎が主であり、視神経炎に対してこれらの効果があるのかは確定的ではなかった。

2. 研究の目的

遺伝子改変動物を用いて、monocarboxylate の輸送体としての AQP9 が RGC の生死に及ぼす影響を *in vivo* で明らかにし、網膜・視神経変性疾患の病態の一端を解明すること。特に網膜内層における AQP9 の乳酸輸送を介した神経保護効果を明らかにすること。

抗 AQP4 抗体陽性患者における急性期治療としての IVIg の有効性と安全性を検証すること。また血液浄化療法の抗 AQP4 抗体陽性視神経炎患者急性期の予後に与える影響を検討するとともに、免疫抑制剤の視神経炎再発抑制の影響を明らかにすること。

3. 研究の方法

Aqp9 ノックアウト (KO) マウスと野生型 (WT) マウスに視神経挫滅を与え、一週後の網膜 AQP9、monocarboxylate transporter (MCT) 1,2,4 発現変化、網膜神経節細胞 (RGC) 数、網膜内グルコース・乳酸濃度を、暗所視閾値電位 (STR) 変化を調べた。具体的解析手法としては、上丘への Fluoro-Gold 注入による RGC の逆行性標識を行った後、網膜伸展標本を作製し、単位面積当たりの RGC 数をカウントした。また、網膜伸展標本に対する α -tubulin 免疫染色を行い、免疫染色性を保つ細胞数をカウントした。網膜組織切片の RBPMs、GFAP、 α -tubulin と AQP9 ならびに monocarboxylate transporter (MCT) 1,2,4 の免疫染色を行い、共染色による細胞の同定と共発現の有無を行った。網膜内グルコース・乳酸測定は colorimetric assay で行った。RGC の機能解析には、オーバーナイトの暗順応後、体温を調節しながら、小動物用全視野光刺激装置を用いて、微弱光刺激により誘発される STR を記録した。網膜外層に異常がないかはより強い刺激光で通常の a 波、b 波を記録して、その振幅低下がないことを確認した。一部のマウスには、MCT2 の阻害薬である 4-CIN を硝子体注射し、Aqp9 欠損と合わせて RGC における乳酸の取り込みを完全に阻害した。

ステロイドパルスに抵抗する難治視神経炎患者 32 例を IVIg 投与群とステロイドパルス投与群に無作為に割り付け、二週後の視力ならびにハンフリー視野平均偏差 (MD) の改善程度を比較した。

全国 33 施設の多施設共同研究において、531 例の視神経炎患者の血清に含まれる抗 AQP4 抗体ならびに抗ミエリンオリゴ糖蛋白 (MOG) 抗体陽性患者数を cell-based assay で調査した。また抗体の有無による患者背景を抽出した。

2010 ~ 2017 年に血液浄化療法を行ったステロイドパルス療法抵抗性抗 AQP4 抗体陽性視神経炎患者連続 9 例 15 眼の視機能予後を後ろ向きに検討した。また、寛解維持療法として免疫抑制剤を使用している抗 AQP4 抗体陽性 (11 例) ないし抗 MOG 抗体陽性 (3 例) 視神経炎患者の免疫抑制剤投与前後の視神経炎年再発率と経口ステロイド内服量の変化を後ろ向きに検討した。

4. 研究成果

正常では、MCT1,2,4はAQP9と免疫沈降し、共発現していた。視神経挫滅により、WT網膜のAQP9発現が低下し、AQP9とMCT1,4の共発現が消失した。Aqp9 KOマウスの方がWTよりも単位面積当たりRGC細胞数ならびにSTRは有意に減少した。MCT2阻害薬、4-CINの硝子体投与により、視神経挫滅によるRGC細胞密度減少ならびにSTR減少がAqp9 KOマウスのそれと同程度となった。また網膜内乳酸濃度は、Aqp9 KOマウスならびに4-CIN投与WTマウスで有意に無処置WTマウスより減少し、網膜内グルコース濃度はAqp9 KOマウスでは視神経挫滅の有無にかかわらずWTより有意に増加した。GLUT1発現はAqp9 KOマウスで、GLUT3発現は視神経挫滅網膜で有意に増加した。免疫染色でAQP9はWTのRGCとastrocyteに発現しており、Aqp9 KOマウスではその発現は著明に減弱していた。またMCT1,2,4免疫染色性は神経節細胞層のAQP9発現細胞と共同在を示した。以上の結果から、乳酸はAQP9ならびにMCTによりアストロサイトRGC間で輸送され、RGC生存と機能維持に重要な役割を果たしており、RGCはグルコースよりも乳酸をエネルギー基質として選好しており、ストレス下で、その利用環境が変わるとグルコースを代用利用する可能性が示された。AQP9がMCTと協調してRGCのエネルギー基質として乳酸輸送に携わっていることを初めて証明したと考える(Mori S, Nakamura M, et al. Mol Neurobiol 2020; 57(11):4530-4548)。

IVIg投与群とステロイドパルス投与群で、2週後の視力変化に有意差はなかったが、logMAR換算で0.3以上の改善を示す割合は、IVIg群で75%であったのに対し、ステロイドパルス群で31.3%であった(P=0.0032)。また、MDも前者が9.3dB改善したのに対し、後者は3.2dBの改善であり(P=0.03)、IVIgが抗AQP4抗体陽性患者が大多数を占める本試験で急性期の視機能予後に有効であることを示した。また、重篤な有害事象は見られなかった(Mimura O, Nakamura M, et al., Jpn J Ophthalmol 2021; 65(1):122-132)。

531患者中12%が抗AQP4抗体陽性、10%が抗MOG抗体陽性、77%が両抗体陰性であった。1例のみ両抗体陽性であった。抗AQP4抗体陽性例は84%が女性、抗MOG抗体陽性例は51%が女性、両陰性例は64%が女性であり、抗AQP4抗体陽性例は圧倒的に女性が多かった。抗AQP4抗体陽性例は40歳代以降に多く、抗MOG抗体陽性例は若年と中高年の二相性、両陰性例は概ね均一な発症年齢分布を示した。年齢と抗体の有無が視機能予後と有意な関係があった(Ishikawa H, Nakamura M, et al. Ophthalmology 2019; 126(10): 1385-1398)。

急性期に血液浄化療法を施行した15眼中12眼(80%)においてlogMAR換算で0.3以上の視力改善を見た。その大半が1年後にも良好な視力を保ち、早期の血液浄化療法が視神経脊髄炎患者の視機能回復に有効であることを報告した(Mori S, Nakamura M, et al., Jpn J Ophthalmol. 2018;62(4):525-530)。寛解期に副腎皮質ホルモンに加えて9例でアザチオプリン、2例でミコフェノール酸モフェチルを服用していた。年再発率が服用開始前後で0.33から0へ、プレドニン内服量が17.8から5.8mgへ有意に減少していた。(Mori S, Nakamura M, et al., J Ophthalmol 2020:8871146)。

～ は我が国における抗AQP4抗体陽性視神経炎の臨床像、急性期のIVIgならびに血液浄化療法の視機能改善への有効性、ならびに寛解期の免疫抑制剤併用の再発抑制効果と全身副作用の多いステロイド使用量を減量できる効果を示し、NMOによる視神経炎の病態理解と治療指針の確立に重要なエビデンスを与えたと思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Katsuyama A, Kusahara S, Asahara SI, Nakai SI, Mori S, Matsumiya W, Miki A, Kurimoto T, Imai H, Kido Y, Ogawa W, Nakamura M.	4. 巻 8
2. 論文標題 En face slab optical coherence tomography imaging successfully monitors progressive degenerative changes in the innermost layer of the diabetic retina.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMJ Open Diabetes Res Care	6. 最初と最後の頁 e001120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/bmjdr-2019-001120.	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, Mori Sotaro, Ueda Kaori, Kurimoto Takuji, Kusahara Sentaro, Yamada-Nakanishi Yuko, Nakamura Makoto	4. 巻 60
2. 論文標題 En Face Slab Images Visualize Nerve Fibers With Residual Visual Sensitivity in Significantly Thinned Macular Areas of Advanced Glaucomatous Eyes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Investigative Ophthalmology & Visual Science	6. 最初と最後の頁 2811 ~ 2811
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/iovs.18-25910	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mori Sotaro, Kurimoto Takuji, Kanamori Akiyasu, Sakamoto Mari, Ueda Kaori, Yamada-Nakanishi Yuko, Nakamura Makoto	4. 巻 60
2. 論文標題 Discordance of Disc-Fovea Raphe Angles Determined by Optical Coherence Tomography and MP-3 Microperimetry in Eyes With a Glaucomatous Hemifield Defect	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Investigative Ophthalmology & Visual Science	6. 最初と最後の頁 1403 ~ 1403
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/iovs.18-26354	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mimura Osamu, Ishikawa Hitoshi, Kezuka Takeshi, Shikishima Keigo, Suzuki Tone, Nakamura Makoto, Chuman Hideki, Inoue Kenji, Kimura Akiko, Yamagami Akiko, Mihoya Maki, Nakao Yuzo	4. 巻 65
2. 論文標題 Intravenous immunoglobulin treatment for steroid-resistant optic neuritis: a multicenter, double-blind, randomized, controlled phase III study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 122 ~ 132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10384-020-00790-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mori Sotaro, Kurimoto Takuji, Maeda Hidetaka, Nakamura Makoto	4. 巻 22
2. 論文標題 Dimethyl Fumarate Promotes the Survival of Retinal Ganglion Cells after Optic Nerve Injury, Possibly through the Nrf2/HO-1 Pathway	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 297 ~ 297
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22010297	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, Murai Yusuke, Ueda Kaori, Sakamoto Mari, Chihara Norio, Yamada-Nakanishi Yuko, Nakamura Makoto	4. 巻 2020
2. 論文標題 Efficacy for the Annual Relapse Rate after the Immunosuppressive Therapy in Patients Associated with Anti-AQP4 or Anti-MOG Antibody-Positive Optic Neuritis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2020/8871146	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, Miki Akiko, Maeda Hidetaka, Kusuhara Sentaro, Nakamura Makoto	4. 巻 57
2. 論文標題 Aqp9 Gene Deletion Enhances Retinal Ganglion Cell (RGC) Death and Dysfunction Induced by Optic Nerve Crush: Evidence that Aquaporin 9 Acts as an Astrocyte-to-Neuron Lactate Shuttle in Concert with Monocarboxylate Transporters To Support RGC Function and Survival	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Neurobiology	6. 最初と最後の頁 4530 ~ 4548
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12035-020-02030-0	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 -

1. 著者名 Ishikawa Hitoshi, Kezuka Takeshi, Nakamura Makoto, Mimura Osamu, Ishikawa Hitoshi, et al.	4. 巻 126
2. 論文標題 Epidemiologic and Clinical Characteristics of Optic Neuritis in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 1385 ~ 1398
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ophtha.2019.04.042	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mori Sotaro, Kurimoto Takuji, Kanamori Akiyasu, Sakamoto Mari, Ueda Kaori, Yamada-Nakanishi Yuko, Nakamura Makoto	4. 巻 60
2. 論文標題 Discordance of Disc-Fovea Raphe Angles Determined by Optical Coherence Tomography and MP-3 Microperimetry in Eyes With a Glaucomatous Hemifield Defect	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Investigative Ophthalmology & Visual Science	6. 最初と最後の頁 1403 ~ 1403
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/iovs.18-26354	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Mori S, Kurimoto T, Miki A, Kusuhara S, Nakamura M
2. 発表標題 Deletion of Aqp9 in mice enhances retinal ganglion cell death after optic nerve injury
3. 学会等名 The association for reseach in vision and ophthalmology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Makoto Nakamura
2. 発表標題 Pathophysiology of neuromyelitis optica and an animal model.
3. 学会等名 第122回日本眼科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 盛崇太郎、栗本拓治、三木明子、楠原仙太郎、中村 誠
2. 発表標題 アクアポリン9遺伝子欠損マウスにおける視神経挫滅後の網膜神経細胞死
3. 学会等名 第122回日本眼科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sotaro Mori, Mari Sakamoto, Takuji Kurimoto, Kaori Ueda, Yuko Nakanishi, Makoto Nakamura
2. 発表標題 Agreement of a nasal step border by a microperimeter with a temporal raphe by optical coherence tomography in glaucoma patients
3. 学会等名 23rd International Visual Field and Imaging Symposium（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村 誠
2. 発表標題 New insight into structure-function relationship in optic nerve disorders
3. 学会等名 第124回日本眼科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村 誠
2. 発表標題 視神経炎診療の最前線！
3. 学会等名 第58回日本神経眼科学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 盛崇太郎
2. 発表標題 Aqp9ノックアウトマウスにおける視神経挫滅後の網膜神経節細胞に対する構造機能障害
3. 学会等名 第24回眼科分子生物学研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 盛 崇太郎、栗本 拓治、三木 明子、前田 秀高、楠原仙太郎、中村 誠
2. 発表標題 視神経挫滅後のアクアポリン9ノックアウトマウスにおける網膜神経節細胞の機能低下と乳酸輸送障害の関係
3. 学会等名 第68回日本臨床視覚電気生理学学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

http://kobe-med-ganka.com/

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	三木 明子 (Miki Akiko) (10726988)	神戸大学・医学部附属病院・助教 (14501)	
研究分担者	松宮 亘 (Matsumiya Wataru) (30707120)	神戸大学・医学研究科・助教 (14501)	
研究分担者	楠原 仙太郎 (Kusuhara Sentaro) (40437463)	神戸大学・医学研究科・講師 (14501)	
研究分担者	栗本 拓治 (Kurimoto Takuji) (50388815)	神戸大学・医学部附属病院・助教 (14501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関