

平成 21年 4月 24日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2008年
 課題番号：19390447
 研究課題名（和文） 正常眼圧緑内障の病態解明と網膜神経節細胞の保護及び軸索再生療法の開発
 研究課題名（英文） Elucidation of the pathogenesis of normal tension glaucoma and the development of its treatment by neuroprotection and axon regeneration
 研究代表者
 原田 高幸（HARADA TAKAYUKI）
 財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・副参事研究員
 研究者番号：90345306

研究成果の概要：網膜に発現するグルタミン酸輸送体の中で、主に Müller グリアに発現する GLAST、あるいは網膜神経節細胞に発現する EAAC1 の欠損マウスが、世界初の正常眼圧緑内障モデル動物になり得ることを報告した。発症メカニズムとしてはグルタミン酸毒性に加えて酸化ストレスの関与が考えられた。さらに interleukin-1 が Müller 細胞によるグルタミン酸の取り込み量を増大させ得ることを見出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2008年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,500,00	4,350,000	18,850,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：正常眼圧緑内障、視神経変性症、神経保護、神経再生

1. 研究開始当初の背景

(1) 緑内障は我が国における失明原因のトップとなっている。本邦における特徴の1つとして正常眼圧緑内障の比率が高いことがあげられるが、詳しい発症メカニズムは解明されていない。正常眼圧緑内障の研究が進まない理由の1つとして、高眼圧タイプの緑内障で良く利用されるような「疾患モデル動物」が存在しないことがあげられる。しかし研究開始当初の状況では、正常眼圧緑内障の疾患モデル動物については、世界的にみても全く報告がない状況であった。

(2) 研究代表者は以前からグルタミン酸輸送体と網膜神経細胞死に関する研究を継続しており、研究開始時点ですでに glutamate/aspartate transporter (GLAST) および excitatory amino acid carrier 1 (EAAC1) という2種類のサブタイプの遺伝子欠損マウスの解析を行っていた。一方、グルタミン酸輸送体の機能を賦活化することが多くの神経変性疾患における細胞保護につながるという仮説があり、緑内障においてもそうした検証が求められる時期に入っていたが、そのような報告はほとんど見られない状況であった。

2. 研究の目的

- (1) 正常眼圧緑内障の疾患モデル動物の確立と発症メカニズムの解析。
- (2) グルタミン酸輸送体の機能を賦活化する薬剤の探索と神経保護効果の検討。

3. 研究の方法

- (1) GLAST および EAAC1 欠損マウスについて約 8 か月間にわたる形態学的観察と電気生理学的な機能検討を行った。また両欠損マウス由来の培養網膜神経節細胞と培養 Müller 細胞を作製し、グルタミン酸輸送体が酸化ストレス耐性に与える影響を検討した。
- (2) Interleukin-1 (IL-1) 投与の前後で培養 Müller 細胞におけるグルタミン酸取り込み量の定量的解析と Na imaging を行った。GLAST および $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase 発現量の変化を RT-PCR, Westernblot, 細胞染色法などによって検討した。また網膜組織片の培養系を確立し、細胞外にグルタミン酸と IL-1 を投与して、神経細胞死の程度を調べた。さらに IL-1 の眼球内投与実験を行った。

4. 研究成果

- (1) GLAST 欠損マウス (図 1) および EAAC1 欠損マウスでは網膜神経節細胞の減少、視神経乳頭の陥凹、視神経線維の減少が見られることを発見した。このような緑内障様の表現型を示しながら、両者はいずれも開放隅角であり、かつ眼圧は正常範囲内であった。

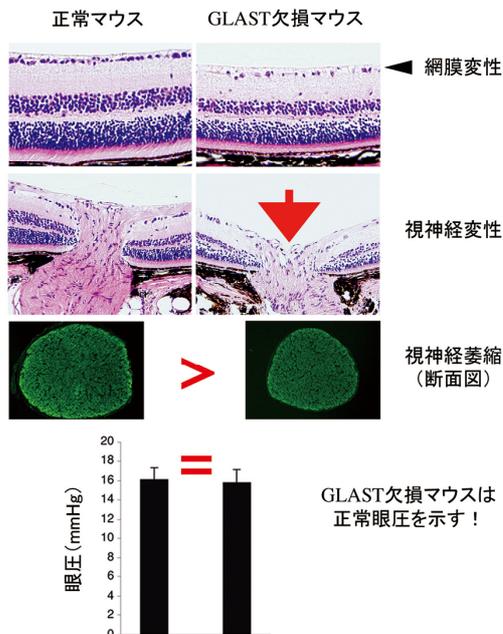


図 1 GLAST 欠損マウスの表現型

- (2) これらのマウスにグルタミン酸受容体の 1 つである NMDA 受容体の阻害剤 memantine を投与すると、一部の網膜神経節細胞が保護されたことから、網膜局所におけるグルタミン酸毒性の関与が考えられた。

- (3) 次に酸化ストレスの指標として、網膜中の脂質ヒドロペルオキシド濃度を測定したところ、GLAST 欠損マウス、EAAC1 欠損マウスの順で濃度上昇が確認された。逆に強力な抗酸化作用をもつグルタチオンに関しては、特に GLAST 欠損マウスの Müller グリア細胞において著しい産生量の減少が認められた。グルタチオンは GLAST によって取り込まれるグルタミン酸をもとに合成されることから、Müller 細胞におけるグルタミン酸取り込み能力の低下は神経毒性を高めるだけでなく、抗酸化作用の減弱にもつながることが想定された。

- (4) GLAST 欠損マウス由来の Müller 細胞と野生型網膜神経節細胞の混合培養細胞に過酸化水素を負荷したところ、共に野生型由来の場合と比較して著しい網膜神経節細胞死の増加が観察された。

- (5) 以上の結果からグルタミン酸輸送体欠損マウスが「世界初の正常眼圧緑内障モデル動物」となり得ることを発表し (Harada et al., *Journal of Clinical Investigation*, 2007)、その成果は新聞 (毎日新聞、読売新聞他) 等でも報道された。この発見は今後の正常眼圧緑内障に対する神経保護薬のスクリーニングや病態解明に極めて有用と考えられる。

- (6) 野生型マウスおよび EAAC1 欠損マウス由来の培養 Müller 細胞におけるグルタミン酸の取り込みは IL-1 の濃度および時間依存的に上昇したが、GLAST 欠損マウスではそうした変化はわずかであった。また前二者ではグルタミン酸投与により、細胞内 Na^+ 濃度の上昇が観察されたが、GLAST 欠損マウスでは細胞内 Na^+ が比較的低濃度に保たれていた。

- (7) IL-1 による GLAST および $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase の発現上昇はみられなかったが、膜分画の Westernblot により $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase の膜移行が促進されていることが確認された。

- (8) 培養網膜組織片におけるグルタミン酸と IL-1 の同時投与では、やはり野生型マウスと EAAC1 欠損マウスで網膜神経節細胞の有意な細胞数の増加を認めたが、GLAST 欠損マウスにおいては無効であった。野生型マウスにおいては IL-1 の眼球内投与も網膜神経節細胞の保護に有効性が認められた。

(9) グルタミン酸は 3 Na⁺および H⁺と細胞内に共輸送されるため、IL-1 は細胞内 Na⁺濃度を抑制することによって、結果的にグルタミン酸の取り込みを増大させたものと考えられる (図 2)。以上の成果はすでに国際的な研究誌において報告した (Namekata et al., *Molecular and Cellular Biology*, 2008)。

(10) 現在は IL-1 を GLAST および EAAC1 欠損マウスの眼球内に投与して *in vivo* における解析を開始しており、プロジェクトは現在も進行中である。我々の確立した正常眼圧緑内障モデル動物を用いることで、新規・既知を問わず、今後も有用な化合物の検索を行っていきたいと考えている。

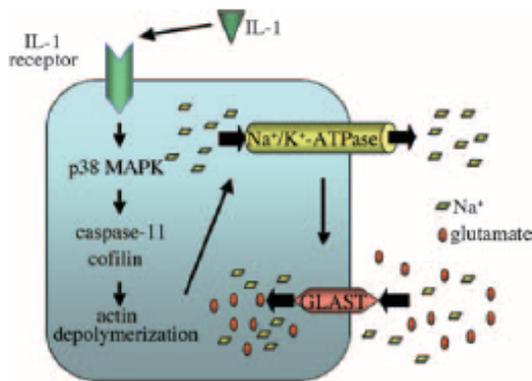


図 2 IL-1 によるグルタミン酸取り込み能力上昇のメカニズム

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 13 件)

1. Namekata, K., Harada, C., Kohyama, K., Matsumoto, Y., and Harada, T. (2008) Interleukin-1 stimulates glutamate uptake in glial cells by accelerating membrane trafficking of Na⁺/K⁺-ATPase via actin depolymerization. *Molecular and Cellular Biology* 28(10), 3273-3280.
2. Sato, T., Fujikado, T., Morimoto, T., Matsushita, K., Harada, T., and Tano, Y. (2008) Effect of electrical stimulation on IGF-1 transcription by L-type calcium channels in cultured retinal Müller cells. *Japanese Journal of Ophthalmology* 52(3), 217-223.
3. Harada, T., Harada, C., Nakamura, K., Quah, H-M.A., Okumura, A., Namekata, K., Saeki, T., Aihara, M., Yoshida, H., Mitani, A., and Tanaka, K. (2007) The

potential role of glutamate transporters in the pathogenesis of normal tension glaucoma. *Journal of Clinical Investigation* 117(7), 1763-1770.

4. Harada, T., Harada, C., and Parada, L.F. (2007) Molecular regulation of visual system development: more than meets the eye. *Genes & Development* 21(4), 367-378.
5. Nakamura, K., Namekata, K., Harada, C., and Harada, T. (2007) Intracellular sortilin expression pattern regulates proNGF-induced naturally occurring cell death during development. *Cell Death and Differentiation* 14(8), 1552-1554.
6. Guo, X., Nakamura, K., Kohyama, K., Harada, C., Behanna, H.A., Watterson, D.M., Matsumoto, Y., and Harada, T. (2007) Inhibition of glial cell activation ameliorates the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroscience Research* 59(4), 457-466.
7. Harada, C., Nakamura, K., Guo, X., Kitaichi, N., Mitamura, Y., Yoshida, K., Ohno, S., Yoshida, H., and Harada, T. (2007) Neuroprotective effect of geranylgeranylacetone against ischemia-induced retinal injury. *Molecular Vision* 13, 1601-1607.
8. Okumura, A., Mitamura, Y., Namekata, K., Nakamura, K., Harada, C., and Harada, T. (2007) Glycated albumin induces activation of activator protein-1 in retinal glial cells. *Japanese Journal of Ophthalmology* 51(3), 236-237.
9. 原田高幸. (2009). 視交叉形成異常とヘパラン硫酸. *日本の眼科* 80(3), 299-302.
10. 原田知加子, 原田高幸. (2009). 緑内障における神経保護研究. *あたらしい眼科* 26(1), 71-72.
11. 原田知加子, 原田高幸. (2008). 正常眼圧緑内障とグルタミン酸輸送体. *あたらしい眼科* 25(12), 1679-1680.
12. 原田高幸, 原田知加子. (2008). 正常眼圧緑内障モデル動物の確立と治療研究への展開. *臨床眼科* 62(5), 637-643.
13. 原田高幸, 原田知加子, 中村和昭, 柯漢明, 奥村彰規, 行方和彦, 佐伯志賜朗, 相原一, 吉田寛, 三谷章, 田中光一. (2008). 正常眼圧緑内障におけるグルタミン酸輸送体の役割. *日眼会誌* 112(4), 412-413.

[学会発表] (計 11 件)

1. 原田高幸. グルタミン酸トランスポーターノックアウトマウスと正常眼圧緑

- 内障モデル. 第 113 回日本眼科学会
総会 教育セミナー「正常眼圧緑内障の
実験モデルと網膜神経節細胞死の基礎
研究」平成 21 年 4 月 17 日 東京都
2. 原田高幸. 正常眼圧緑内障モデル動物
の確立と神経保護・再生療法の探索.
BMB2008 (第 31 回日本分子生物学
学会年会・第 81 回日本生化学会大会合
同大会) シンポジウム 「中枢神経細
胞の再生と変性の分子メカニズム」平
成 20 年 12 月 9 日 神戸ポートアイ
ランド
 3. Takayuki Harada, Chikako Harada,
Kohichi Tanaka. Glutamate transporter
deficient mice as animal models of normal
tension glaucoma. XVIII International
Congress of Eye Research (ICER) Animal
Models of Glaucoma (INVITED) 平成 2
0 年 9 月 25 日 北京 (中国)
 4. 原田高幸, 原田知加子. 正常眼圧緑内障
モデル動物の確立と治療研究への展開.
第 19 回日本緑内障学会 シンポジウ
ム「緑内障治療の未来」平成 20 年 9
月 13 日 大阪国際会議場
 5. 原田高幸, 吉田 寛, 原田知加子.
ASK1 遺伝子欠損による正常眼圧緑内
障モデル動物の治療研究. 第 112 回
日本眼科学会総会 平成 20 年 4 月 1
7 日 パシフィコ横浜
 6. Takayuki Harada, Chikako Harada,
Kazuaki Nakamura, Kazuhiko Namekata,
Kohichi Tanaka. The potential role of
glutamate transporters in the pathogenesis
of normal tension glaucoma. 37th Annual
Meeting of the Society for Neuroscience,
2007.11.6., San Diego.
 7. Chikako Harada, Kazuaki Nakamura,
Kazuhiko Namekata, Xiaoli Guo, Kohichi
Tanaka, Hidenori Ichijo, Takayuki Harada.
Role of apoptosis signal-regulating kinase
1 in stress-induced neural cell apoptosis.
37th Annual Meeting of the Society for
Neuroscience, 2007.11.6., San Diego.
 8. Kazuhiko Namekata, Chikako Harada,
Takayuki Harada. Interleukin-1 increases
glutamate uptake in Müller glial cells. 37th
Annual Meeting of the Society for
Neuroscience, 2007.11.6., San Diego.
 9. Kazuaki Nakamura, Kazuhiko Namekata,
Chikako Harada, Takayuki Harada.
Intracellular sortilin expression pattern
regulates proNGF-induced naturally
occurring cell death during development.
37th Annual Meeting of the Society for
Neuroscience, 2007.11.4., San Diego.
 10. Xiaoli Guo, Kazuaki Nakamura, Chikako
Harada, Kuniko Kohyama, Heather A.
Behanna, D. Martin Watterson, Yoh

Matsumoto, Takayuki Harada. Inhibition
of glial cell activation ameliorates the
severity of experimental autoimmune
encephalomyelitis. 37th Annual Meeting of
the Society for Neuroscience, 2007.11.7.,
San Diego.

11. 原田高幸, 佐伯 忠賜朗, 相原 一,
原田知加子. 正常眼圧緑内障様の症状
が観察されたグルタミン酸トランスポ
ーターノックアウトマウスの解析. 第
111 回日本眼科学会総会 平成 19
年 4 月 19 日 大阪国際会議場

[図書] (計 1 件)

1. 原田知加子, 原田高幸. (2007). 網膜・視
神経における神経細胞死、神経保護と
は? メジカルビュー社 神経眼科をや
さしく理解するための視覚と眼球運動
のすべて. 72-80.

[その他]

1. 世界初の正常眼圧緑内障モデル動物の開
発 (Journal of Clinical Investigation, 2007)
に関する報道記事 ①2007 年 6 月 22 日
読売新聞朝刊 1 面 ②2007 年 6 月 27 日
毎日新聞朝刊 他、地方紙やインターネ
ットなどに多数掲載
2. ホームページ
[http://www.tmin.ac.jp/research/dept/
10/10.html](http://www.tmin.ac.jp/research/dept/10/10.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 高幸 (HARADA TAKAYUKI)
財団法人東京都医学研究機構・東京都神経
科学総合研究所・副参事研究員
研究者番号 : 90345306

(3) 連携研究者

行方 和彦 (NAMEKATA KAZUHIKO)
財団法人東京都医学研究機構・東京都神経
科学総合研究所・研究員
研究者番号 : 70392355