

平成 22 年 4 月 12 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：19～21

課題番号：19791276

研究課題名（和文）網膜視神経節細胞におけるアンジオテンシン 受容体サブタイプの役割

研究課題名（英文）The role of Angiotensin receptor subtypes in retinal ganglion cell

研究代表者

溝上 志朗（MIZOUE SHIRO）

愛媛大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：80423458

研究成果の概要（和文）：

野生型マウス(C57BL/6J)の網膜神経節細胞にはアンジオテンシンの AT1a 受容体が発現していることが明らかにされた。マウスの硝子体腔内に NMDA を投与することにより、再現性の高い網膜神経節細胞のアポトーシスモデルを作成することが可能であった。アンジオテンシン受容体の AT1a 受容体ノックアウトマウス、および AT2 受容体ノックアウトマウスは、野生型マウスと比較し、NMDA により誘導される網膜神経節細胞死、および網膜内網状層の菲薄化、いずれにおいても統計学的な有意差は認められなかった。

研究成果の概要（英文）：

The AT1a angiotensin II receptor has been shown to be expressed in the retinal ganglion cells of wild type mice (C57BL/6J). Using intravitreal injection of NMDA, we were able to create a highly reproducible model of apoptosis in retinal ganglion cells. To examine the association between apoptosis and the angiotensin system, we compared NMDA-induced retinal ganglion cell damage in AT1a (AT1aKO) and AT2 (AT2KO) receptor knock-out mice with that in wild type mice (C57BL/6J). No significant difference in ganglion cell count or inner plexiform layer (IPL) thickness was observed between the AT1aKO, AT2KO and wild type mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	800,000	0	800,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
2009 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,300,000	450,000	2,750,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：

アンジオテンシン 受容体、網膜神経節細胞、緑内障、アポトーシス、動物モデル

1. 研究開始当初の背景

アンジオテンシン (Ang)は生体の主要な昇圧物質であると共に、細胞の増殖反応や細胞外基質の産生調節などを介して心肥大や動脈硬化などの心血管リモデリングに深く関与していることが明らかになっている。一方、眼組織においても Ang 受容体が存在することはすでに報告されており、すでに我々は眼球結膜組織において Ang の1a型受容体(AT1a)と2型受容体(AT2)が創傷治癒反応において拮抗的に作用していることを明らかにしている。(Mizoue S, et al, 2006)

さらに最近では Ang による受容体サブタイプの刺激が神経組織における細胞死、分化、および再生にも関与している可能性が報告されている。AT1a ノックアウトマウスは、中大脳動脈閉塞モデルにおいて野生型マウスよりも虚血巣の縮小と penumbra の増大を認めることが報告され (Walther T, et al, 2002)、その機序として、Ang が AT1a を介して傷害脳組織における酸化ストレスを増強させることが想定されている。さらに愛媛大学医学部医化学・心血管生物学分野の堀内らのグループは、AT2 ノックアウトマウスでは逆に野生型マウスより梗塞巣が大きくなることを報告したが、その機序として、野生型では、ubiquitin-conjugating enzyme の1つで、胎生期の神経成長を調節し神経の分化を促進するとされる (Hofsaess U, et al, 2003) MMS2 の梗塞巣における発現増強が認められるのに対し、AT2 ノックアウトマウスでは認められないことを確認し、AT2 を介したシグナルが神経保護、神経修復、神経再生などに直接関与している可能性があることを指摘している。

一方、眼科領域における主要疾患である緑内障は、有病率が40歳以上の5.0%と非常に

高い。なかでも欧米人と比して日本人に多い正常眼圧緑内障は、十分な眼圧下降療法を行っても網膜神経節細胞死の進行の抑制は困難である。この結果として、社会的失明に至る例が少なからず存在することは極めて憂慮すべき問題であり、そのような症例に対する神経節細胞の保護・再生療法の確立は急務と言える。また緑内障による視神経節細胞死はアポトーシスであるという説が有力であり (Kerrigan, et al, 1997, Okisaka, et al, 1997)、NMDA によって誘導される網膜神経節細胞のアポトーシスがマウス緑内障モデル(Dreyer, et al, 1998)として有用なことが報告されている。しかし、その分子細胞レベルにおける詳細な機序に関しては不明な点が多い。

網膜神経節細胞のアポトーシスのメカニズムを探る点において、先に述べた堀内らの仮説は魅力的である。しかしながら、網膜神経節細胞における Ang 受容体サブタイプの役割についてはこれまでほとんど解明されていない。わずかに、1998年に Lucius らにより AT2 刺激が神経節細胞の再生を促進させたとの報告がある程度で、その詳細な機序の解明や、緑内障で認められる神経節細胞のアポトーシスに対する作用などについての報告は我々が知る限りではない。

そこで我々は、Ang の AT2 を介したシグナル伝達が視神経節細胞のアポトーシスに対して神経保護的に作用するのではないかと考え、この仮説を検証するために以下の実験を計画した。

2. 研究の目的

(1) 野生型マウス(C57BL/6J)の網膜、特に

神経節細胞組織におけるAng 受容体サブタイプの局在を、免疫組織学的手法により明らかにする。

- (2) Ang 受容体サブタイプの網膜神経節細胞のアポトーシスに対する役割を明らかにするために、コントロールマウス、AT1a、およびAT2受容体ノックアウトマウスを用いて、硝子体腔内にNMDAを注入することによって網膜神経節細胞のアポトーシスモデルを作製し、それぞれのマウスにおける神経節細胞死の差異について検討する。
- (3) 網膜神経節細胞アポトーシスに対するAT1a阻害薬、AT2阻害薬の薬理作用を動物モデルにより検討し、Ang のAT2を介した刺激により抗アポトーシス作用が発現するか否かを検討する。

3. 研究の方法

(1)網膜神経節細胞におけるアンジオテンシン 受容体サブタイプの局在の検討

10-12 週 齢 の 野 生 型 マウス (C57BL/6J)の眼球を摘出し、パラホルム固定、パラフィン包埋した後に、眼球組織切片を作成、ヘマトキシリンエオジン(HE)染色、および、抗AT1a抗体、抗AT2抗体を用いた蛍光二重免疫組織染色法により局在を検討した。

(2)網膜神経節細胞アポトーシスモデルの作成

10-12 週 齢 の 野 生 型 マウス

(C57BL/6J)の硝子体腔内にマイクロシリンジポンプ(伊藤製作所、日本)に装着した33G針により、角膜輪部より0.1ミリ後方から眼球内に刺入後、硝子体腔内に30nmolのNMDAを3μl注入した。投与6h、12h、1d、3d、7d、14d経過後に眼球を摘出し、パラホルム固定、パラフィン包埋を施し、組織切片を作成、HE染色およびtunel染色を行った。組織標本は、視神経乳頭、角膜頂点が含まれる切片が得られているものを任意に選択した。内網状層(IPL)厚の測定部位は、網膜鋸状縁から視神経乳頭中央部の中間部分(図1)で、神経節細胞数については同部位を中心とする長さ250μmの範囲をカウントした。(図2)

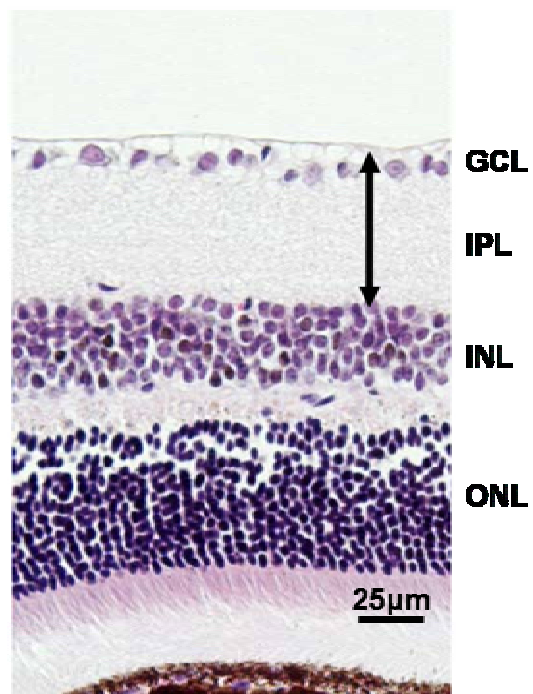


図1 網膜 HE 染色 矢印は IPL 厚測定部位

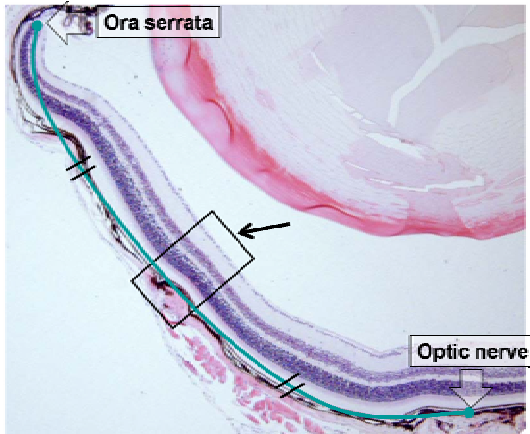


図2 網膜 HE 染色 矢印は神経節細胞数測定エリア

(3)AT1a 受容体(AT1a)KO マウス、AT2 受容体(AT2)KO マウスを用いた網膜神経節細胞アポトーシスモデル

10-12 週齢の野生型、および AT1aKO マウス、AT2KO マウスを用いて、実験2の方法でアポトーシスモデルを作成し、その差異について検討した。

4 . 研究成果

(1) 網膜神経節細胞層におけるアンジオテンシン 受容体の発現

AT1a 抗体、及び抗 AT2 抗体、両受容体ともに、面積組織染色において、網膜神経節細胞に発現が認められた。また、網膜血管壁組織には、AT1a 受容体の強発現が確認された。

(2) 網膜神経節細胞アポトーシスモデルの作成

網膜神経節細胞数変化

網膜神経節細胞数は、投与前が 22.8 ± 2.5 (平均 \pm 標準偏差) であり、投与後 24h より減少傾向

を認め、7 日後に 13.0 ± 2.9 と有意に減少、14 日後も持続した。

内網状層厚変化

内網状層厚は、投与前が $42.5 \pm 6.5 \mu\text{m}$ であり、投与 3 日後より菲薄化傾向を認め、7 日目に $26.2 \pm 6.3 \mu\text{m}$ と有意な菲薄化を認め、14 日後も持続した。

アポトーシス細胞の発現

TUNEL 染色陽性細胞は、神経節細胞層、および外顆粒層に認められ、その発現のピークは NMDA 投与後 24 h であった。(図 3、4)

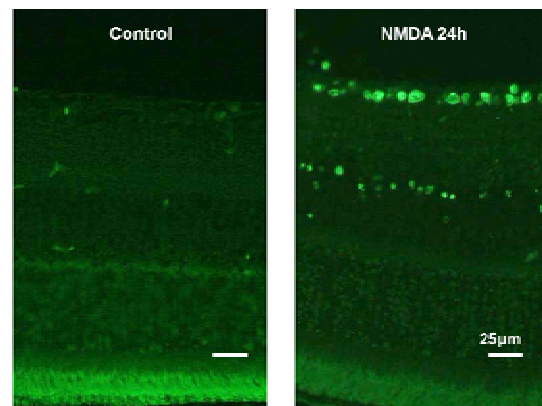


図3 NMDA 投与 24 h 後の TUNEL 陽性細胞
左側は非投与

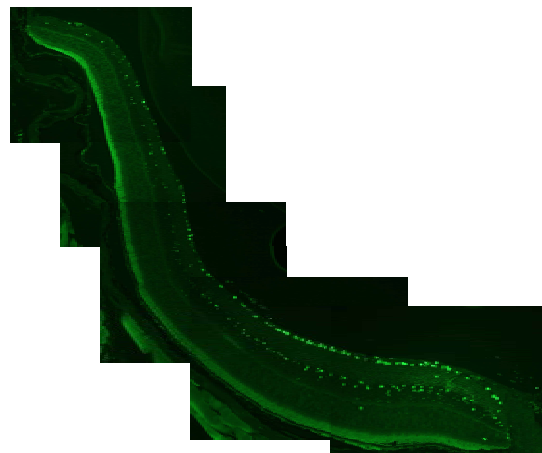


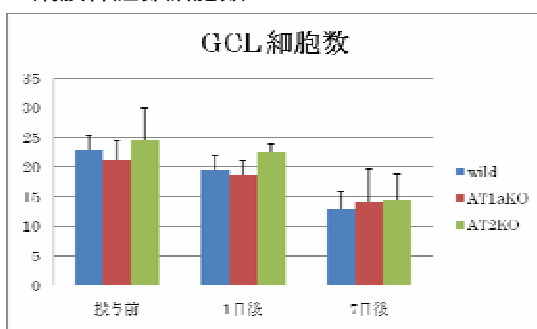
図4 網膜 TUNEL 陽性細胞の分布

以上の実験結果より、本モデルは再現性高く網膜神経節細胞のアポトーシスを惹起可能であることが明らかにされ、今後の実験にこのモデルを用いることの妥当性が示された。

(3)AT1a 受容体(AT1a)KO マウス、AT2 受容体(AT2)KO マウスにおける網膜神経節細胞アポトーシス

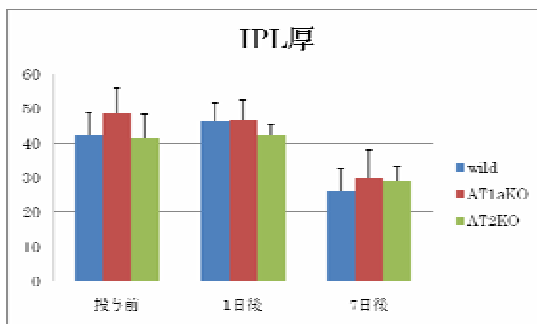
AT1aKO マウス、AT2KO マウスを用いて、実験2の方法にてアポトーシスモデルを作成し、その差異を検討した。対象には野生型(C57BL/6J)マウスを用いた。

網膜神経節細胞数



網膜神経節細胞数は、投与前、1 日後、7 日目のすべての測定ポイントにおいて、AT1aKO マウス、AT2KO マウス、及び野生型マウスに有意差を認めなかった。

内網状層 (IPL) 厚変化



IPL 厚についても、投与前、1 日後、7 日目のすべての測定ポイントにおいて、AT1aKO マウス、AT2KO マウス、及び野生型マウスに有意差を認めなかった。

結果の総括

NMDA を硝子体腔内に注入することにより、再現性の高い網膜神経節細胞アポトーシスモデルを作成することが可能であった。

AT1a 受容体、AT2 受容体ノックアウトマウスを用いてアポトーシスモデルを作成したが、網膜神経節細胞層、および内網状層厚は、野生型と比較して、統計学的有意差を認めなかった。

・アンジオテンシン 受容体ノックアウトマウスにおいて差異が認められなかった原因について

今回我々が用いたアポトーシスモデルは NMDA を硝子体腔内に注入することで作成されるが、網膜虚血再灌流モデルなど、他と比較して、網膜神経節細胞に与えるダメージが比較的大きく、投与後に惹起される炎症反応も強力であった可能性があり、モデルの妥当性についてのさらなる検討が必要と思われた。

緑内障における網膜神経節細胞はアポトーシスによることは明らかにされているが、本来慢性進行性である本疾患における細胞死を動物モデルにより再現することは極めて困難である。しかし最近、NF- κ B のサブユニットの一つである p50 ノックアウトマウスが月例依存的に網膜神経細胞死をきたし、正常眼圧緑内障モデルとしての特性を有することが明らかにされている。将来的にはこの

ようなモデルにアンジオテンシン 受容体作用薬を長期投与して、より病態に近い形の実験系を確立する必要性が感じられた。

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)

[学会発表](計2件)

1) 溝上志朗、兵頭涼子、木村泰朗、鈴村弘隆、吉川啓司
乳頭黄斑線維束領域の視野障害と網膜神経線維層欠損
第20回日本緑内障学会(宜野湾市)
11/13-15,2009

2) 溝上志朗、鈴村隆弘、木村泰朗、吉川啓司
緑内障における乳頭黄斑線維束(PMB)領域の視野異常
第113回日本眼科学会総会(東京) 4/16-19, 2009.

[図書](計3件)

1) 溝上志朗
目標眼圧の意義と管理
Frontiers in Glaucoma vol.9 No.2
132-134p.2008

2) 溝上志朗
緑内障点眼薬 選択のポイント
続発緑内障への薬剤選択
あたらしい眼科 25(6):805-809p,2008

3) 溝上志朗

中期緑内障の点眼治療は何かからどう使う?

あたらしい眼科 25(臨時増刊号 緑内障 Now!):
129-131p.2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者

溝上 志朗 (MIZOUE SHIRO)

愛媛大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号: 80423458