

令和 3 年 4 月 12 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18847

研究課題名(和文) 網膜神経節細胞におけるIL-6/sIL-6とアデノシンシグナルの相互作用の意義

研究課題名(英文) Significance of interaction between IL-6 / sIL-6 and adenosine signal in retinal ganglion cell

研究代表者

中島 圭一 (Nakashima, Kei-Ichi)

熊本大学・病院・特任助教

研究者番号：90836339

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：緑内障において、RGCの細胞体が生存していれば、軸索の再生を誘導することで視野障害の進行を抑制できる可能性がある。本研究は、炎症性サイトカインの一つであるInterleukin (IL)-6に注目し、軸索伸長・再生のメカニズム、アデノシン受容体との相関関係を解明していくことである。我々は本研究機関中に生後8日のラットより採取した純度の高い網膜神経節細胞(RGC)にIL-6と可用性IL-6(sIL-6)を添加することによりRGC軸索伸長が促進されることを明らかにした。また、アデノシン受容体A3受容体アンタゴニストであるMRS1191でRGC軸索伸長が促進されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

緑内障は本邦において中途失明原因の第1位であり、緑内障の克服はQuality of Lifeの改善のみならず、社会経済的にも重要である。現在、緑内障の治療方針は眼圧下降であるが、眼圧は良好であるにも関わらず視野障害が進行する症例が存在し、緑内障の本態である網膜神経節細胞(RGC)へアプローチする治療の確立が急務である。緑内障において、RGCの細胞体が生存していれば、軸索の再生を誘導することで視野障害の進行を抑制できる可能性がある。本研究期間中にいくつかのサイトカインがRGCの軸索伸長を促進することを明らかにした。本研究が進めば、RGCにアプローチする新たな治療確立への手助けとなる。

研究成果の概要(英文)：If the RGC cell body is alive, it may be possible to suppress the progression of visual field impairment by inducing axon regeneration in the eye with glaucoma. This study purpose is to elucidate the mechanism of axon elongation and regeneration by interaction between interleukin (IL) -6, which is one of the inflammatory cytokines and adenosine receptors. We elucidated that RGC axon elongation is promoted by adding IL-6 and soluble IL-6 (sIL-6) to high-purity retinal ganglion cells (RGC) collected from 8-day-old rats in our institute. We also elucidated that MRS1191, which is adenosine receptor A3 receptor antagonist, promotes RGC axon elongation.

研究分野：緑内障

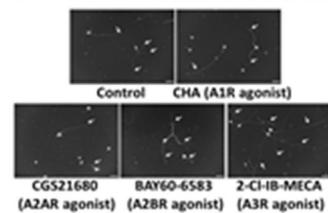
キーワード：網膜神経節細胞 緑内障 インターロイキン-6 可用性インターロイキン-6 アデノシン受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

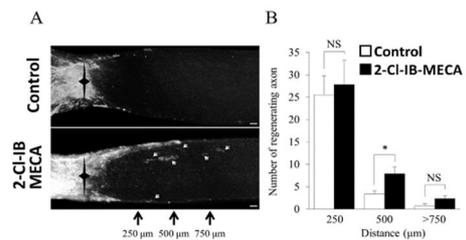
緑内障は本邦において中途失明原因の第1位であり、緑内障の克服は Quality of Life の改善のみならず、社会経済的にも重要である。緑内障眼では網膜神経節細胞 (retinal ganglion cell; RGC) が減少しており、猿眼圧上昇モデルで RGC のアポトーシスが誘導されたことから (Quigley et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995)、眼圧依存性に RGC 障害が生じると考えられていた。しかし、正常眼圧緑内障など眼圧非依存性に視野障害が進行する症例や、数回に及ぶ手術でも眼圧下降が得られないなど、治療に難渋する症例も少なくない。そこで、近年眼圧下降治療以外の新たな治療として、神経保護を目的とした薬剤の開発が模索されているが臨床的に効果が確認されたものは未だない。著しい眼圧上昇では RGC の細胞死が誘導されるが、緑内障や外傷性視神経症では、軸索の絞扼・断裂などによる機械的な軸索輸送障害などにより二次的に RGC の細胞死が誘導されると考えられている (Fu et al. *J Neurosci.* 2012)。そこで、残存する RGC を活性化し軸索伸長や再生を誘導することで視野改善効果を持つ画期的な薬剤の開発が可能ではないかと考えている。軸索の伸長には神経栄養因子 (Sawai et al. *J Neurosci.* 1996) や軸索再生阻害因子等 (Park et al. *Science.* 2008) が関連する。RGC の軸索伸長メカニズムの解明に取り組んでおり、RGC におけるグルタミン酸誘導細胞死において、カルシウム依存的に apolipoprotein E containing lipoproteins (E-LPs) が RGC に保護的に働くことを我々は明らかにした (Hayashi et al. *J Biol Chem.* 2012)。さらに我々はアデノシン受容体の軸索伸長にお

図1 各アデノシンレセプター刺激による神経突起伸長効果



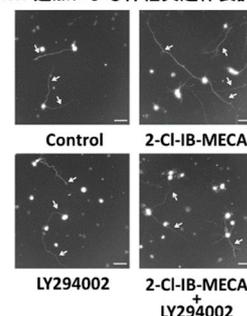
ける役割について解析を行った。アデノシン受容体は G タンパク質共役型受容体で、ヒトでは4つのサブタイプ (A1R・A2AR・A2BR・A3R) があり、A2A 受容体拮抗薬は変性疾患であるアルツハイマー病の治療薬である。各アデノシン受容体アゴニストで RGC を刺激し、軸索伸長について解析を行ったところ、A3R 刺激が神経突起伸長に重要であることが分かった (図1: ラット RGC 培養において軸索突起 (矢印) が A3R アゴニストである 2-CI-IB-MECA で促進している。Nakashima et al. *Exp Eye Res.* 2018) in vivo 視神経挫滅モデルにおいても 2-CI-IB-MECA 投与により挫滅神経断端より軸索再生が促進されることを明らかにした (図2、Nakashima et al. *Exp Eye Res.* 2018)。

図2 視神経挫滅モデルにおける軸索伸長評価



視神経挫滅モデルは二次的な RGC の細胞死誘導であり、この結果は A3R アゴニストが新たな緑内障治療の候補となりうることを示唆している。当研究室では、最近、免疫細胞である T 細胞やマクロファージによって分泌される IL-6 が線維柱帯細胞の TGF- β シグナルに関連することを見出した (Inoue-Mochita et al. *J Biol Chem.* 2018)。IL-6 と可溶性 IL-6 受容体 (soluble IL-6 receptor, sIL-6R) の複合体が神経保護、軸索再生を促進することが近年報告されている (Fischer. *Eye.* 2017)。IL-6 は IL-6 受容体刺激後、Janus Kinase (JAK) の活性化を介し、phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)-Akt/Protein kinase B の活性化を介して mammalian target of rapamycin (mTOR) の核内移行を誘導し Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) の転写を活性化する。PTEN ノックアウトマウスでは、Akt-mTOR 経路は活性化しており、IL-6/sIL-6R 刺激は軸索伸長を促進させる。つまり Akt-mTOR 経路アクティブな状態下では IL-6/sIL-6R の軸索伸長作用は増強していると考えられる。我々は A3R 刺激が Akt を活性化させ、Akt 阻害薬 (LY294002) が A3R agonist による軸索伸長を阻害することを見出しており (図3、Nakashima et al. *Exp Eye Res.* 2018) アデノシン受容体刺激による Akt の活性化は IL-6/sIL-6R の神経再生の効率化および再生能向上に寄与するのではないかと考え本研究を着想した。

図3 Akt inhibitor 追加による神経突起伸長評価



2. 研究の目的

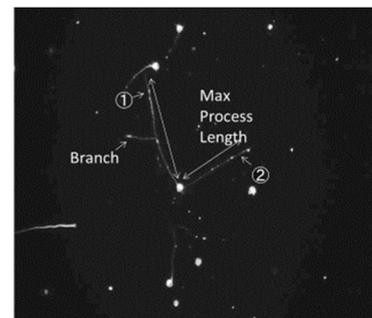
眼圧下降以外の新たな緑内障治療として神経保護・再生が期待されている。本研究の目的は当研究室で確立されている RGC 単離と軸索再生の手法を用いて (Nakashima, et al. *Exp Eye Res.* 2018; Tsutsumi, et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2016) 軸索伸長のメカニズムを解明し、新たな神経保護作用を持つ緑内障の新規治療薬を開発することであり、現在臨床応用されていない神経保護・再生治療確立への先駆けとなるべき点に独自性と創造性がある。また、当研究室は薬剤スクリーニングが十分可能な量の RGC を単離する

方法が確立しており、各種刺激による RGC 伸長の効果、刺激因子の相互作用・細胞毒性の評価、既存薬剤の RGC への応用など、様々なスクリーニングなども可能である。特に、今回我々が計画している IL-6-JAK/STAT3 経路とアデノシンレセプターの相互作用による網膜神経保護効果や再生は検証されておらず、独創的であると考えている。さらに、IL-6 受容体ならびに sIL-6R に対する阻害抗体はすでにリウマチ治療薬として臨床応用されている。RGC に対するこれらの受容体阻害の影響を検討することで、緑内障治療への適応拡大も視野に入ると考えられる。また、本研究における結果は緑内障のみならず、脳神経分野においても中枢神経・脊髄変性疾患に対する病態理解や治療薬開発につながる可能性も高い。

3. 研究の方法

生後 8 日の Sprague Dawley (SD) ラットの摘出眼の網膜をパパイソで処理し、mixed retinal cells を抗マクロファージ抗体でコートした細胞培養ディッシュに播種し培養する。RGC が含まれる浮遊細胞を回収し次に抗 Thy1 抗体をコートしたディッシュに播種することで純度の高い RGC を単離する (2 step-immunopanning 法、Barres, et al. *Neuron*, 1988)。神経突起は抗 3-tubulin 抗体を用いて染色し、IN Cell Analyzer と Developer Toolbox を用いて画像取得、解析を行う。具体的には、細胞体から出ている神経突起長 (図 4、) の平均を平均神経突起長 (+ /神経突起数) とし、各細胞体から出ている最長神経突起 (図 4、) の平均を最長神経突起長として神経突起伸長評価を解析する。まず、播種したラット RGC の培養液中に IL-6/sIL-6R や各アデノシン受容体アンタゴニストなどを添加し、軸索伸長について評価を行った。シグナルの活性化についてはウエスタンブロットにより Akt など評価を行った。

図4
神経突起伸長評価



4. 研究成果

まず、用意できた IL-6/sIL6R が human recombinant なため、rat RGC に対して IL6+sIL6 を添加後に免疫染色を用いて pStat が活性化されるかについて調べた。(図 5: IL-6+sIL-6R 添加群では免疫染色にて pStat が染色されている。) 続いて、単離した RGC に 100ng/ml の IL-6+sIL-6R を溶媒に CNTF あり群となし群に分けて添加、2 日後に軸索伸長を測定した。その結果、平均神経突起長、最長神経突起長共に IL-6+sIL-6R 添加群で有意に軸索伸長が促進された。(図 6、7)

図5 pSTAT3 activation by IL6/sIL6R in rat RGCs

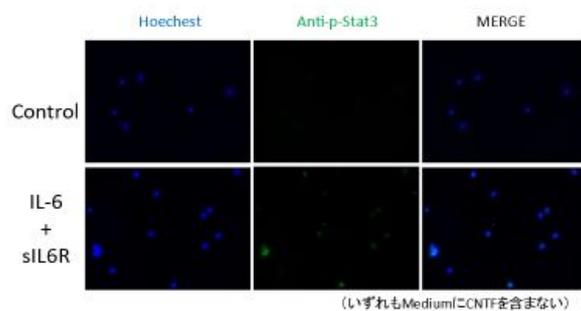


図6 平均神経突起長

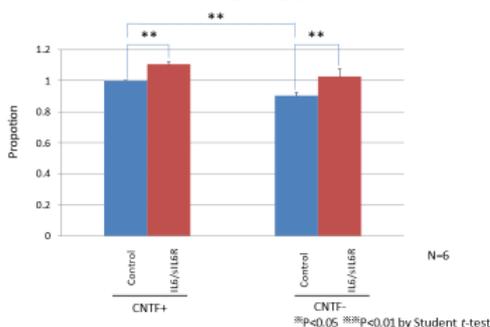
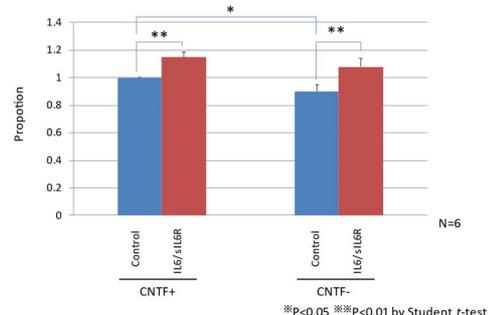
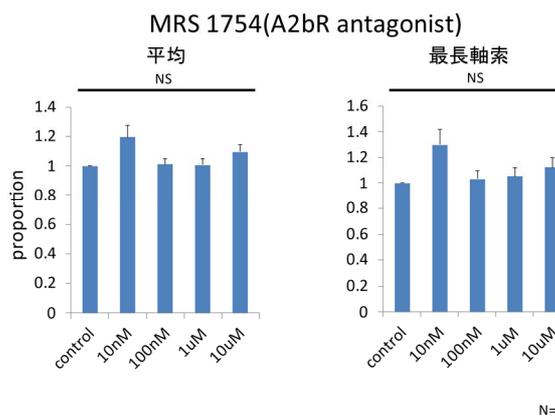
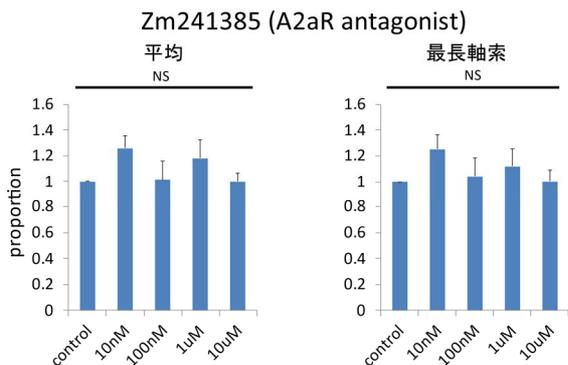
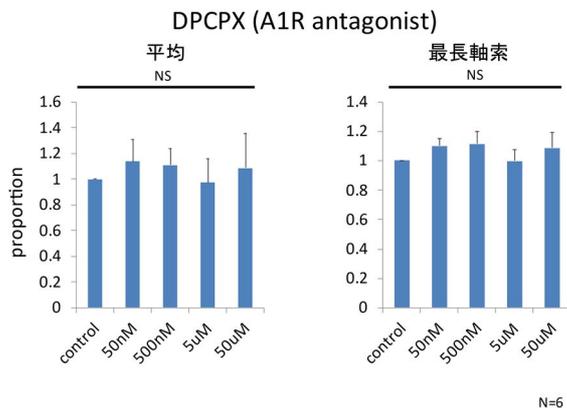


図7 最長神経突起長

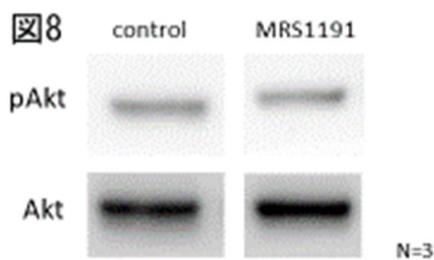
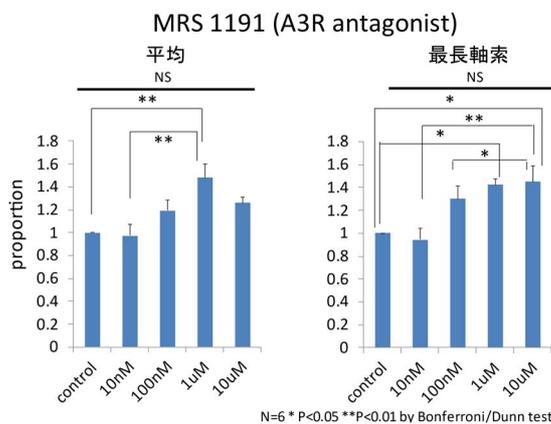


また、単離した RGC に A1R アンタゴニストである DPCPX、A2AR アンタゴニストである Zm241385、A2BR アンタゴニストである MRS1754、A3R アンタゴニストである MRS1191 を添加したところ、MRS1191 で RGC 軸索伸長促進を認めた。

次に、MRS1191 が RGC 軸索伸長を促進させたシグナル経路を調べるため、単離した RGC を 24 時間培養し、培地を Neurobasal



medium に培地交換。6 時間後に 1 μ M の MRS1191 を反応。1 時間後にタンパク回収と Western blot にて AKT、pAKT の活性について調べたが、MRS1191 では pAKT は活性化されないことが示唆された (図 8)。今後は MRS1191 の軸索伸長を促進させたシグナル経路を調べる必要がある。また、各アデノシン受容体アゴニスト、アンタゴニストと IL-6/sIL6R の相互作用が軸伸長におよぼす影響について検証する必要がある。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tsutsumi-Kuroda U, Kojima S, Fukushima A, Nakashima KI, Iwao K, Tanihara H, Inoue T	4. 巻 19
2. 論文標題 Early Bleb Parameters as Long-Term Prognostic Factors for Surgical Success: A Retrospective Observational Study Using Three-Dimensional Anterior-Segment Optical Coherence Tomography	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 155
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12886-019-1159-1	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 該当する

1. 著者名 光田，中島圭一，谷原 秀信，井上 俊洋	4. 巻 36
2. 論文標題 マイクロパルス波経強膜毛様体光凝固術の短期成績.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 あたらしい眼科	6. 最初と最後の頁 1078-1082
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Kiyama Y, Nakashima KI, Inoue T	4. 巻 29
2. 論文標題 A Case of Primary Open-angle Glaucoma With Conjunctival Laceration After Micropulse Transscleral Cyclophotocoagulation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of glaucoma	6. 最初と最後の頁 135-137
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/IJG.0000000000001658	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 該当する

1. 著者名 中西美穂，中島圭一，井上俊洋	4. 巻 37
2. 論文標題 悪性緑内障に対するマイクロパルス経強膜毛様体光凝固術が奏効した1症例	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 あたらしい眼科	6. 最初と最後の頁 1319-1321
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 松村 智世, 中島 圭一, 高橋 枝里, 米村 瞳, 二口 亜希子, 谷原 秀信, 井上 俊洋	4. 巻 125
2. 論文標題 落屑緑内障に対するBaerveldt(R)チューブシャント手術の成績	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本眼科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 107-109
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 中西美穂, 中島圭一, 二口亜希子, 渡邊隆弘, 井上俊洋
2. 発表標題 悪性緑内障に対するマイクロパルス波経強膜毛様体光凝固術が奏功した1症例
3. 学会等名 九州眼科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村田夏実, 小島祥, 中島圭一, 井上俊洋
2. 発表標題 3次元前眼部OCTによるバルベルト緑内障チューブシャント手術後のインプラント被覆部の厚みの解析
3. 学会等名 日本緑内障学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊隆弘, 藤本智和, 中島圭一, 井上俊洋, 真木賢太郎, 島崎敦, 加藤雅智, 谷原秀信
2. 発表標題 ウサギMicroShunt挿入モデルと濾過手術モデルの濾過胞形態と房水中サイトカイン濃度の比較
3. 学会等名 日本緑内障学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 徳永安菜, 中島圭一, 渡邊隆弘, 高橋枝里, 井上俊洋
2. 発表標題 Kahook dual bladeを用いた眼内トラベクトミー切開範囲による手術成績の比較
3. 学会等名 日本緑内障学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木山優, 中島圭一, 井上俊洋
2. 発表標題 マイクロバルス波経強膜毛様体光凝固術後、結膜裂傷を生じた開放隅角緑内障の1症例
3. 学会等名 日本臨床眼科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀田明俊, 中島圭一, 木村顕俊, 小田原敦子, 山中雅恵, 中山周三, 坂井勇太, 中原裕貴, 戸田穂南, 市岡良一, 藤本好, 井上俊洋
2. 発表標題 疑似視野狭窄状態における広角レンズ搭載暗所支援眼鏡のQOVおよびQOL改善効果
3. 学会等名 九州眼科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木村顕俊, 中島圭一, 坂井勇太, 瀧原祐史, 井上俊洋
2. 発表標題 マイクロバルス波経胸膜毛様体光行術後前房フレア値の検討
3. 学会等名 日本眼科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩下昇平, 中島圭一, 井上俊洋
2. 発表標題 カフークデュアルブレードを用いた線維柱帯切開術後に視神経乳頭陥凹縮小を認めた1例
3. 学会等名 日本眼科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小島 摂, 高橋 枝里, 江口 桃佳, 中島 圭一, 井上 俊洋
2. 発表標題 カフークを用いた眼内トラベクトミーにおける術後3ヵ月以内眼圧上昇の危険因子の検討
3. 学会等名 緑内障学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 入江杏菜, 中島圭一, 渡邊隆弘, 高橋枝里, 小島祥, 井上俊洋
2. 発表標題 落屑緑内障のKahook dual bladeを用いたトラベクトミー切開範囲による術後中期成績
3. 学会等名 日本臨床眼科学会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------