

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月10日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592220

研究課題名（和文）グリア病としての緑内障性視神経障害の発症解明と治療法探索

研究課題名（英文）Investigation of role of glial cells in glaucomatous optic neuropathy and searching glial cell-related treatment for glaucoma

研究代表者

柏木 賢治 (KASHIWAGI KENJI)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・准教授

研究者番号：30194723

研究成果の概要（和文）：グルタミン酸の細胞外量を調節するグルタミン酸トランスポーターのサブタイプ別の作用を比較検討し、GLAST が網膜神経節細胞(RGC)保護、GLT-1 が RGC 障害に作用することを見出した。網膜グリア細胞のミュラー細胞が RGC 死保護効果を、視神経グリア細胞のアストロサイトが神経突起伸長の促進作用を示すことを明らかにした。この作用に EGFR, Gabbr2, Agtr1a 遺伝子が RGC 保護に、Id3, Egr1, Gjalp, App, Nr2f2 遺伝子が RGC 障害に関与することを見出した。ex vivo による軸索流の可視化システム、RGC 定量的評価システムの開発を行った。

研究成果の概要（英文）：I clarified the following points; Different glutamate transporters (GLT) were differently involved in glial cell-related effect on RGC. Major GLT, GLAST exerted neuroprotective effect on RGC, while GLT-1 exerted effect on promoting neuritis. Muller cells, major retinal glial cells, showed a protective effect on retinal ganglion cells(RGCs), while astrocytes in optic nerve did promoting effect of neurites. Several mRNAs influenced to RGC survival or neurite elongation were identified as key mRNAs for GLT-involved RGC effects. EGFR, Gabbr2, Agtr1a showed protective effect, while Id3, Egr1, Gjalp, App, Nr2f2 mRNAs were involved in RGC death. I developed an animal model that enables to observe axonal flow of lived rat retina.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：緑内障、グルタミン酸、グルタミン酸トランスポーター、眼グリア細胞、網膜神経節細胞、遺伝子改変マウス

1. 研究開始当初の背景

第一位の後天性失明原因である緑内障の病態には眼圧が最も深く関与しているが眼圧を十分に低下させても進行する症例や眼圧が正常域にあるにもかかわらず緑内障が発症する正常眼圧緑内障が非常に多いことが知られている。これらのことは、眼圧以外の要因が緑内障の発症や進行に関与している可能性を示唆しているが現時点では十分に明らかにされたものはない。

研究代表者はこれまで *in vitro* ならびに *in vivo* の研究系を用い緑内障性 RGC 障害の発症機序と治療法の開発を研究してきた。その中で、緑内障性 RGC の障害の初期反応として神経突起の形態的・生化学的変化が起こる事、軸索伸長のための接着蛋白が減少することを明らかにした。また RGC 自体は外的障害に対して細胞反応性が低く比較的抵抗性があるが RGC を取り巻くグリア細胞はこれら外的障害に対して反応性が高いこと。グリア細胞は外的障害からの RGC 死を抑制すること、グリア細胞の外的障害に対する抵抗性を高めることで RGC 障害が軽減されること、グリア細胞には神経突起の伸長を促進すること。この作用には GSK3 β 、MAPK1、MAPK8 などの一部のキナーゼが関与していることを明らかにした。これら一連の研究から緑内障性神経障害では障害原因に対しグリアが第一義に反応し、その結果 RGC 死を誘導する可能性があり、緑内障はグリア病の一種であると考えに至った。

2. 研究の目的

緑内障におけるグリア細胞の役割を更に明確にするとともに、グリア細胞を介した緑内障性 RGC 死の保護方法さらに検討する。さらに研究代表者らはこれまでの研究で緑内障では RGC 死のみならず外側膝状体を含む高次中枢の障害も起きていることが明らかにしたが、緑内障性視神経障害の再生には、軸索突起の伸長促進、高次ニューロンとのシナプス形成などが必要である、グリア細胞は重要な働きをしているため、本研究期間ではグリア細胞を介した神経軸索伸長促進やシナプス形成促進方法も検討する。

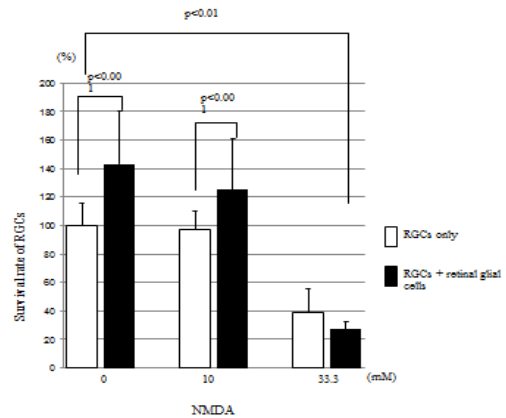
3. 研究の方法

ミュラー細胞もしくはアストロサイトと RGC の共培養系を用い模擬的緑内障負荷を加えた際の網羅的遺伝子発現変化を検討する。各種単離グリア細胞に対し、グルタミン酸トランスポーター遺伝子を siRNA にて障害し RGC と共培養した際の RGC 生存、神経突起伸長変化を比較検討する。単離 RGC に対し上記同様グルタミン酸トランスポーター遺伝子を siRNA にて障害しグリア細胞と共培養した際のグリア細胞の RGC に対する影響を検討する。模擬的緑内障負荷を加えた際の網羅的遺伝子発現変化研究で得られた緑内障性神経障害関連遺伝子のうち、RGC に関連性の高い遺伝子とその機能を検討して関連性の高い因子を推定、この因子を用いて RGC の生存、神経突起伸長変化を検討し、緑内障に関連性の因子の絞込みを行う。

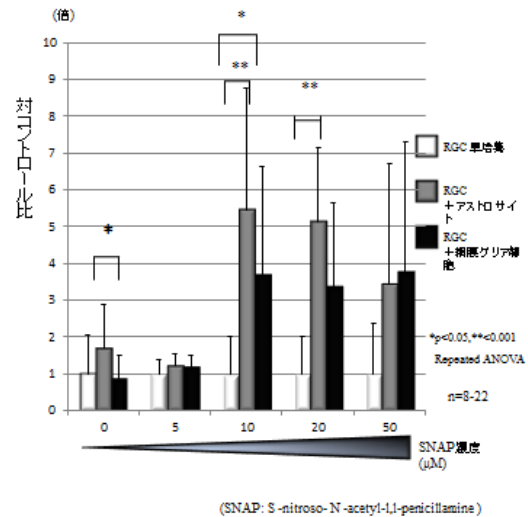
4. 研究成果

網膜の主要なグリア細胞であるミュラー細胞と視神経の主要なグリア細胞であるアストロサイトが網膜神経節細胞(RGC)死に対してどのように作用するかについて RGC の生存、神経突起伸長への関与を中心に検討した。その結果、ミュラー細胞は RGC 死の抑制効果が強いことが判明した(下図)。

網膜グリア細胞のRGCへの作用



共培養による有突起細胞数の変化

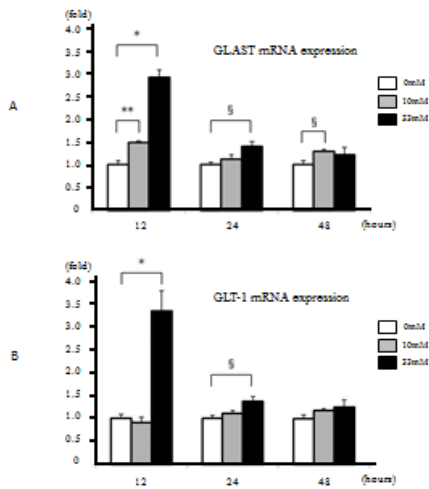


一方、アストロサイトは神経突起伸長の促進作用がミュラー細胞より強いことが明らかになった(上図)。

この作用については興奮性伝達物質であるグルタミン酸の細胞外量を調節するグルタミン酸トランスポーター (GLT) の関与について検討した。NMDA 投与に対して GLT の発現変化を検討したところ、NMDA 負荷後に GLAST や GLT-1 の mRNA が増加した。特に負荷

後の12時間の短時間での増加が著名でGLT-1の発現増加がGLASTより顕著であった(下図)。

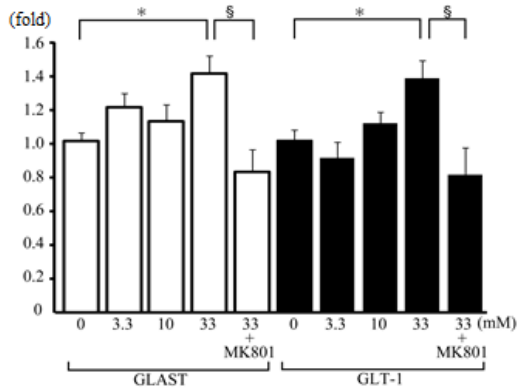
グルタミン酸負荷時のGLAST, GLT-1 mRNAの発現変化



Effects of NMDA loading on GLT mRNA expression at 12, 24 and 48 hours. GLAST or GLT-1 mRNA levels were analyzed in retinal glial cells incubated with 10, 33 mM of NMDA for 12, 24, 48 hours. Amounts of GLAST (A) and GLT-1 (B) mRNA were determined by quantitative real-time PCR with 100 ng of cDNA in triplicate. Relative quantification of gene expression was calculated as a ratio where control expression is 1. All data are expressed as mean \pm SEM (12hours: n=6, 24hours: n=12, 48hours: n=4). * : $p < 0.001$. ** : $p < 0.01$, § : $p < 0.05$.

グルタミン酸受容体阻害剤である、MK-801を負荷するとGLT-mRNAの発現が抑制されたため、GLTの発現増加はグルタミン酸受容体を介したものであることが証明された(下図)。

グルタミン酸受容体阻害剤のGLAST, GLT-1発現増加抑制作用

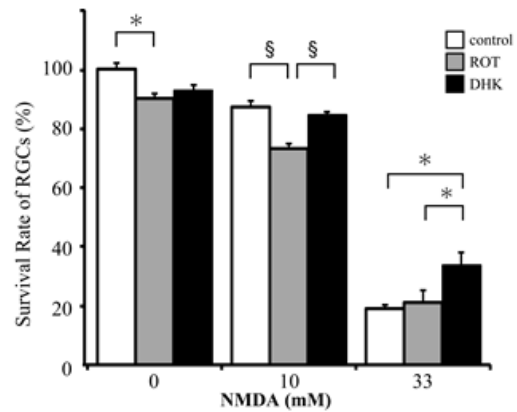


Effects of NMDA loading on GLT mRNA expression with and without MK801 in retinal glial cells. GLAST or GLT-1 mRNA levels were analyzed in retinal glial cells incubated with 3.3, 10, 33 mM of NMDA for 24 hours, with or without MK801 treatment. Amounts of GLAST (white bars) and GLT-1 (black bars) mRNA were determined by quantitative real-time PCR with 100 ng of cDNA in triplicate. Relative quantification of target cDNA was determined by arbitrarily setting the control value from samples without NMDA and MK801 treatment to 1. All data are expressed as mean \pm SEM (n=12). * : $p < 0.05$, § : $p < 0.01$.

主要なGLTであるGLASTとGLT-1のRGCに対する作用を比較するために、それぞれの阻

害剤であるROTとDHKを添加して培養RGCの生存率の変化を検討した。その結果、GLSATの阻害剤であるROTはRGCの生存率を低下させたのに対し、GLT-1の阻害剤であるDHKはRGCの生存率を上昇させた(下図)。

GLIのRGC生存への作用



Effect of GLI inhibitors on RGC survival. Ten μ M of rotenin (ROT) (gray bars) or 100 μ M of dihydrochloric acid (DHC) (black bars) with or without NMDA were pre-incubated with retinal glial cells for 30 minutes. After the pretreatment, the culture medium was replaced and incubated with fresh medium with 0, 10 or 30 mM of NMDA for additional 48 hours. Cell viability were analyzed using quantification of ATP presence in the cells. Survival of cells is presented as a percentage of the absorbance with GLI inhibitors-treated cells divided by that with cells not exposed to NMDA. All data are expressed as the mean \pm SEM (n=12). * : $p < 0.01$, § : $p < 0.001$.

これらの結果からグルタミン酸の過剰投与はグルタミン酸受容体を介してグルタミン酸トランスポーターの発現を変化させること。発現が増加したGLASTは細胞外のグルタミン酸をグリア細胞内に取り込むことによって、細胞外グルタミン酸量を減少させRGCを保護すること。一方、GLT-1は網膜グリア細胞が細胞内に貯留した過剰グルタミン酸を細胞外に放出することでグリア細胞の生存を維持しており、結果的に細胞外に放出されたグルタミン酸がRGCに対して障害的に作用していると考えられた。これらのことはGLTの発現や作用をコントロールすることでRGC保護が期待できることを示している。

RGC に対するグリア細胞の影響を検討したところ、網膜の主要なグリア細胞であるミュラー細胞は RGC 死を軽減するのに対して、視神経の主要なグリア細胞であるアストロサイトは神経突起伸長の促進により効果を示し、グリア細胞による RGC への影響に差があることが判明した。

以上の検討から、GLT の作用について下のテーブルのように総括した。

サブタイプ別GLTの作用の比較

		NMDA		
		0mM	10mM	33mM
A GLT inhibitor(-)	a) RGCs survival with retinal glial cells	↑	↑	↓
	b) GLAST expression (mRNA, protein)		↑	↑
	c) GLT-1 expression (mRNA, protein)		↓	↑
	d) Extracellular glutamate		↓	↓
B GLAST inhibitor(+)	a) RGCs survival with retinal glial cells *	↓	↓	→
	b) Extracellular glutamate *	↑	↑	→
C GLT-1 inhibitor(+)	a) RGC survival with retinal glial cells *	→	→	↑
	b) Extracellular glutamate *	→	→	↓

Change of RGCs survival, GLT expression in retinal glial cells, and extracellular glutamate concentration under NMDA stimulation

A. a) Effects of retinal glial cells on cell viability in RGCs compared to RGCs survival without retinal glial cells. b) and c) shows the expressions of GLAST and GLT-1 in retinal glial cells. d) extracellular glutamate in culture medium from retinal glial cells. B, C. a) RGCs survival with retinal glial cells pretreated with GLT inhibitor compared to the RGCs survival with retinal glial cells preincubated in the absence of GLT inhibitor. b) extracellular glutamate in culture medium from retinal glial cells pretreated with GLT inhibitor

RGC に対する作用の違いを明らかにするために、DNA チップを用いグリア細胞における mRNA の発現の比較を行った。その結果、右のテーブルのような遺伝子群の発現がアストロサイトと網膜グリア細胞間有意に異なることが判明した。現在これらの遺伝子についてそれぞれの作用を検討している。

絞り込み候補遺伝子と発現差

	遺伝子名	アストロサイトの発現度		遺伝子名	アストロサイトの発現度
1	E-cadherin1,2,3	↑	15	Erop4	↑
2	Clu	↑	16	Mak2	↑
3	Gjal1	↑	17	Nes	↑
4	Adm	↑	18	Gclc	↑
5	Apoe	↑	19	Cask	↑
6	Egfr	↑	20	Myo5a	↑
7	Apbb1	↑	21	Hprt1	↑
8	cxcl12	↑	22	Nr2f1	↑
9	Id3	↑	23	Fgfr1	↑
10	S100a4	↑	24	Pgprk	↑
11	Egr1	↑	25	Aspm	↑
12	Nr2f2	↑	26	App	↓
13	Agrfa	↑	27	Cdk3rap3	↓
14	Gatbr2	↑			

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 14 件)

- ① Furuya T, Pan Z, Kashiwagi K. Role of retinal glial cell glutamate transporters in retinal ganglion cell survival following stimulation of NMDA receptor. *Curr Eye Res*. 査読有 2012 Mar;37(3):170-8.
- ② Kashiwagi K. Efficacy and safety of switching to travoprost/timolol fixed-combination therapy from latanoprost monotherapy. *Jpn J Ophthalmol*. 査読有 2012 [Epub ahead of print]
- ③ Andrews J, Chang DS, Jiang Y, He M, Foster PJ, Munoz B, Kashiwagi K, Friedman DS. Comparing approaches to screening for angle closure in older Chinese adults. *Eye (Lond)*. 査読有 2012 Jan;26(1):96-100
- ④ Mabuchi F, Sakurada Y, Kashiwagi K, Yamagata Z, Iijima H, Tsukahara S. Association between genetic variants associated with vertical cup-to-disc ratio and phenotypic features of primary open-angle glaucoma. *Ophthalmology*, 査読有, Vol. 119, 2012, in press.

- ⑤ Pan Z, Furuya T, Kashiwagi K. Longitudinal Changes in Anterior Chamber Configuration in Eyes With Open-Angle Glaucoma and Associated Factors. *J Glaucoma*. 査読有 2012, 21(5):296-301
- ⑥ Mabuchi F, Sakurada Y, Kashiwagi K, Yamagata Z, Iijima H, Tsukahara S. Association between *SRBD1* and *ELOVL5* gene polymorphisms and primary open-angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 査読有, Vol. 52, 2011, 4626-4629.
- ⑦ Tanabe N, Go K, Sakurada Y, Imasawa M, Mabuchi F, Chiba T, Abe K, Kashiwagi K. A remote operating slit lamp microscope system. Development and its utility in ophthalmologic examinations. *Methods Inf Med*. 査読有 2011;50(5):427-34.
- ⑧ Furuya T, Mabuchi F, Chiba T, Kogure S, Tsukahara S, Kashiwagi K. Comparison of the anterior ocular segment measurements using swept-source optical coherent tomography and a scanning peripheral anterior chamber depth analyzer. *Jpn J Ophthalmol*. 査読有 2011 Sep;55(5):472-9.
- ⑨ He MG, Lavanya R, Kashiwagi K, Friedman DS. Single versus sequential testing with scanning peripheral anterior chamber depth analyser, IOLMaster and anterior segment optical coherence tomography for the detection of narrow angles. *Br J Ophthalmol*. 査読有 2011 Oct;95(10):1410-4.
- ⑩ Mabuchi F, Sakurada Y, Kashiwagi K, Yamagata Z, Iijima H, Tsukahara S. Lack of association of common variants on chromosome 2p with primary open-angle glaucoma in the Japanese population. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 査読有, Vol. 107, 2010, E90-91.
- ⑪ Mabuchi F, Sakurada Y, Kashiwagi K, Yamagata Z, Iijima H, Tsukahara S. Estrogen receptor beta gene polymorphism and intraocular pressure elevation in female patients with primary open-angle glaucoma. *Am J Ophthalmol*, 査読有, Vol. 149, 2010, 826-830 e1-2.
- ⑫ Kashiwagi K. Change in trend of newly prescribed anti-glaucoma medications in recent nine years in a Japanese local community. *Open Ophthalmol J*. 査読有 2010 Apr 28;4:7-11.
- ⑬ Mabuchi F, Sakurada Y, Kashiwagi K, Yamagata Z, Iijima H, Tsukahara S. Lack of association between *p53* gene polymorphisms and primary open angle glaucoma in the Japanese population. *Mol Vis*, 査読有, Vol. 15, 2009, 1045-1049.
- ⑭ Kashiwagi K, Tateno Y, Kashiwagi F, Tsukahara S. Changes in anterior chamber depth due to contusion. *Ophthalmic Res*. 査読有 2009;42(4):193-8.
- [学会発表] (計 7 件)
- ① Kashiwagi K, Genetics of Normal-Tension Glaucoma APAO 2012. 4. 15. Busan
- ② 間瀬文彦, 櫻田庸一, 柏木賢治, 山縣然太朗, 飯島裕幸, 塚原重雄 Estrogen receptor beta 遺伝子多型と眼圧の関連について. 日本眼科学会 2012. 4. 6 東京
- ③ Kashiwagi K, How to detect and confirm progression and use it to manage glaucoma Stereoscopic optic disc viewing: Top ten pitfalls in identifying glaucoma damage and progression, WGC 2011, 6. 12. Paris
- ④ Mabuchi F, Sakurada Y, Kashiwagi K, Yamagata Z, Iijima H, Tsukahara S. Gene polymorphisms associated with optic nerve vertical cup-to-disc ratio are risk factors for primary open angle glaucoma. Annual Meeting of American Society of Human Genetics 2011. 10. 14 Montreal
- ⑤ 間瀬文彦, 櫻田庸一, 柏木賢治, 山縣然太朗, 飯島裕幸, 塚原重雄 垂直C/D比に関与する遺伝子多型と原発開放隅角緑内障との関連について. 日本緑内障学会 2011. 9. 24 秋田
- ⑥ Mabuchi F, Sakurada Y, Kashiwagi K, Yamagata Z, Iijima H, Tsukahara S. *SRBD1* gene polymorphism is associated with normal tension and high tension glaucoma. Annual Meeting of American Society of Human Genetics 2010. 11. 5 Washington DC
- ⑦ Mabuchi F, Sakurada Y, Kashiwagi K, Yamagata Z, Iijima H, Tsukahara S. Association of the *LOX1* gene

polymorphism with exfoliation syndrome
after intraocular surgery. World
Glaucoma Congress 2009. 7. 9 Boston

〔図書〕(計4件)

- ① 柏木賢治, 中山書店, 専門医のための眼科診療クオリファイ 2012. 122-132
- ② 柏木賢治, 文光堂, 眼手術学, 6 緑内障、レーザー隅角形成術、2012 : 332-336
- ③ 柏木賢治, 金原出版, 眼科 病態生理(4) 緑内障手術に関する最近の病態理解 2011. 53(10) 1327-1333
- ④ 柏木賢治, メディカル葵, Frontiers in Glaucoma 抗緑内障治療薬の新規処方の変遷, 2011. 41: 52-56

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計1件)
名称: 眼科遠隔診断システム
発明者: 柏木賢治、郷健太郎、伊藤祐貴
権利者: 山梨大学
種類: 実用特許
番号: 2008-284273
出願年月日: 2008. 5. 21
国内外の別: 国内
- 取得状況 (計1件)
名称: 眼科用検査装置
発明者: 柏木賢治、中山淳二
権利者: 山梨大学、タカギセイコー
種類: 実用特許
番号: 4878604
取得年月日: 2011. 12. 9
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等
http://erdb.yamanashi.ac.jp/rdb/A_Display.Scholar?ID=11CB59E63296DFFE
<http://sangaku.yamanashi.ac.jp/SearchResearcher/contents/11CB59E63296DFFE.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柏木 賢治 (KASHIWAGI KENJI)
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・准教授
研究者番号: 30194723

(2) 研究分担者

間渕 文彦 (MABUCHI FUMIHIKO)
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教
研究者番号: 20322125

地場達也 (CHIBA TATSUYA)
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教
研究者番号: 50402061

(3) 連携研究者
なし