

機関番号：34417

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21791723

研究課題名（和文） 緑内障モデルマウスにおける G-CSF の神経保護効果

研究課題名（英文） Neuroprotective Effects of G-CSF on Ischemia-Reperfusion Injury of Retina

研究代表者

南野 桂三 (MINAMINO KEIZO)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：40509585

研究成果の概要（和文）：

G-CSF (Granulocyte Colony-Stimulating Factor) は顆粒球の分化増殖を促進するサイトカインとして知られている。近年、G-CSF が神経系細胞に抗アポトーシス作用をもつ報告されている。今回、組織学的、分子生物学的手法を用いて、G-CSF 投与が網膜虚血再還流モデルラットの網膜神経細胞のアポトーシスを抑制し、神経保護効果を持つことを確認した。その機序の一つとして AKT のリン酸化の関与が考えられた。

研究成果の概要（英文）：

It has been reported that granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) provides neuroprotection in models inducing neuronal cell death. The present study was designed to investigate the effects of G-CSF on neurodegeneration of the inner retinal layer in a rat model of ischemic-reperfusion (I/R) injury. In conclusion, our results demonstrated that the systemic injection of G-CSF can protect retinal ganglion cells (RGC) and inner retinal layers from I/R injury. The effects could be associated with the activation of AKT.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：緑内障の神経保護

科研費の分科・細目：眼科学

キーワード：緑内障、G-CSF、神経保護、アポトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

(1)G-CSF (Granulocyte Colony-Stimulating Factor) は、造血系細胞に働き顆粒球の分化増殖を促進したり、骨髄中の造血幹細胞を末梢へ動員することで知られている。また神経

系細胞に対しても、種々のモデル動物で抗アポトーシス、神経保護作用を有し、機序として G-CSF 受容体を介した直接効果であるという報告が多い。

(2)G-CSF 受容体は中枢神経系や網膜に広く

存在する。

(3)G-CSFは、すでに治療薬として広く使用されており、重大な副作用なく全身投薬が行われている。

## 2. 研究の目的

網膜虚血再還流モデルラットを使用して、G-CSF 全身投与による網膜の神経保護効果を検討した。

## 3. 研究の方法

網膜虚血再還流モデルの作成方法

(1)SD ラット雄 (7~8 週齢) に全身麻酔を施行した (イソフルランによる吸入麻酔を使用)。

(2)眼に鎮痛剤と散瞳剤を点眼した。

(3)前房に生食ボトルとリザーバーと繋がった 30G 針を注入して固定した。

(4)ボトルを 150cm に上げて眼圧を 110mmHg に設定し、眼虚血の状態にした (前眼部、網膜血管の蒼白化にて確認)。

(5)45 分後に針を抜去して虚血を解除した。

(6)抗菌剤の点眼を施行した。

\*sham operation はボトルを上げず、他は同じ操作を施行した。

実験プロトコール

### (1) グループ分類

Sham+saline : sham operation のみの右眼  
I/R + saline : I/R モデル作成 + 生理食塩水の ip

I/R + G-CSF : I/R モデル作成 + G-CSF (100  $\mu$ g/Kg/day の ip)  
\*ip:腹腔内注射

### (2) プロトコール

①モデル作成直前に薬剤を腹腔内投与した。

②モデルを作成した。

\*全てのラットの右眼→sham operation (IOP 正常)

左眼→I/R モデル作成

③翌日から連日 4 日間で腹腔内投与した (生食 or G-CSF)。

④7 日後 (or 1 日後) に麻酔下で屠殺した。

⑤両眼の眼球摘出 →以下の検討を行った。

### (3) 評価項目

①白血球数……7 日後、末梢血 2ml から WBC 数カウントした。

### ②組織

・結膜上方にマーキングして眼球摘出した。

・メタカルン固定、切片作成後、HE 染色した。

・ホルマリン固定、切片作成後、TUNEL、免疫染色した。

・視神経を含む矢状断切片作成した。

・イメージングソフトウェアを使用して組織標本を評価した。

→以下の各検査毎に評価した。

### <HE 染色>

7 日後、視神経乳頭断端から 750~1000  $\mu$ m の範囲の乳頭の上方と下方の網膜各層を 3 回ずつ測定した (各 6 切片)。

i) 測定項目は内網状層~内境界 (IPL-ILM)

内顆粒層 (INL)

外顆粒層 (ONL)

神経節層 (GCL) 中の細胞数

ii) 評価方法は

IPL-ILM/ONL

INL/ONL

GCL 細胞数

### <TUNEL 染色>

1 日後と 7 日後、視神経乳頭断端から 1mm の位置の網膜各層中 200  $\mu$ m の範囲の TUNEL 陽性細胞をカウント乳頭上方と下方の網膜各層を 3 回ずつ測定した (6 切片)。

\*測定網膜層は内顆粒層~神経節細胞層 (INL-GCL)

外顆粒層 (ONL) とした。

### <p-AKT 免疫染色>

7 日後、TUNEL と同部位で p-AKT 陽性細胞の局在を検討した。

\*positive control と negative control も同時に施行した。

### ③ウエスタンブロット

・7 日後、眼球摘出後網膜を単離した。

・各サンプル毎に 10  $\mu$ g の蛋白を抽出、使用した。

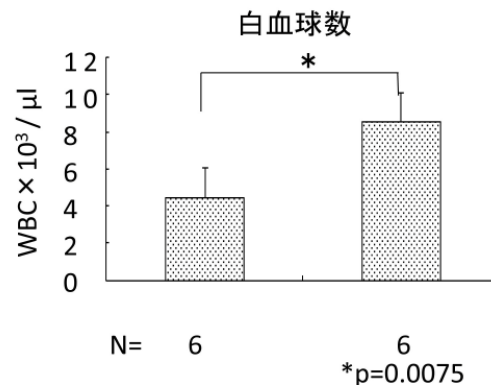
・1 次抗体は、p-AKT, AKT,  $\beta$ -actin を使用した。

・評価方法は p-AKT/AKT、 $\beta$ -actin (コントロール)

\*同じ検査を 3 回施行して確認

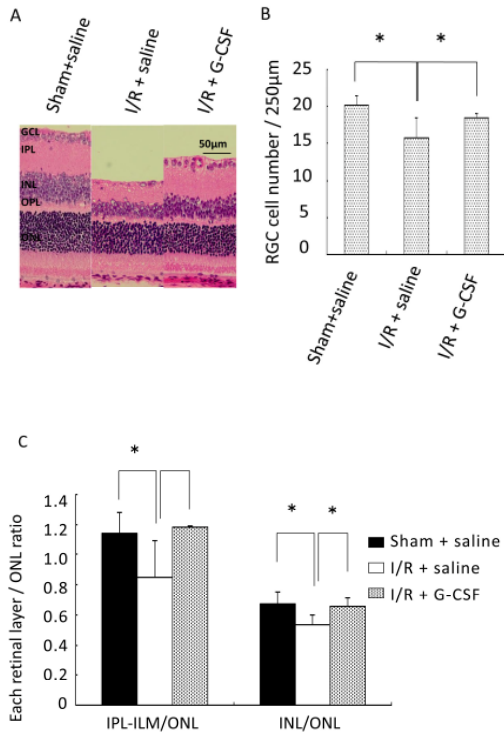
## 4 (1) 研究成果

図 1 末梢血中の白血球数



結果 1 : G-CSF により術 7 日後、末梢血中白血球数は G-CSF 群で有意に増加した。

図2 HE染色後の組織像と評価



結果2 :

A) HE 染色

I/R+saline の I/R モデルのみでは網膜厚の減少を認め、特に網膜内層の厚さが減少しているが、I/R + G-CSF 群では網膜厚が維持されていた。

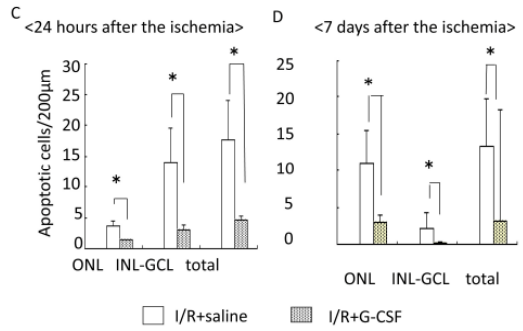
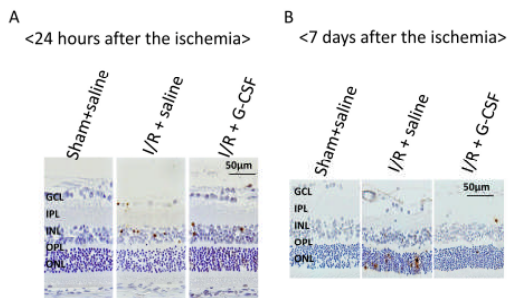
B) 神経節細胞層中の細胞数

I/R+G-CSF 群はコントロール群に比べて有意に多かった。

C) 網膜厚の比率

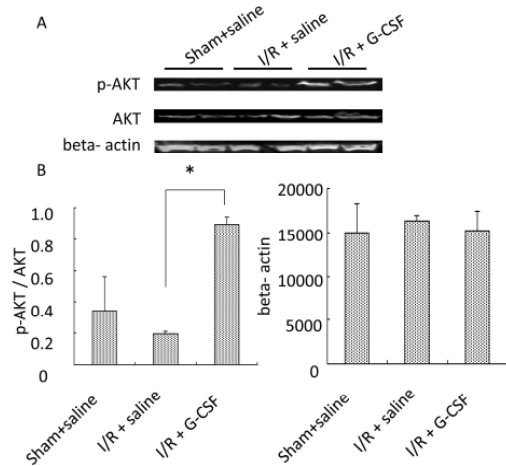
内網状層～内境界膜と内顆粒層の、外顆粒層に対する比率はともに I/R +saline 群に比べて I/R +G-CSF 群では数値が有意に高かった。

図3 TUNEL染色と評価

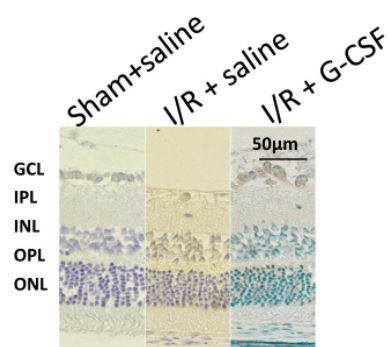


結果3 : TUNEL染色では術24時間後にはTUNEL陽性細胞は主に網膜内層にみられるのに対して、術7日後には主に網膜外層にみられるため、内層と外層にわけてそれぞれ評価を行った。術24時間後の網膜内層、術7日後の網膜外層、ともに有意にI/R + G-CSF 群は少ない結果であった。

図4 ウェスタンブロットと p-AKT免疫染色



C



#### 結果4：

機序として強力な抗アポトーシスである AKT パスウェイの関与を調べるためにウェスタンブロットにて AKT のリン酸化率を調べた。

##### A) ウェスタンブロット

他の群に比較して I/R + G-CSF 群において p-AKT の発現の増強を認めた。

##### B) ウェスタンブロットの定量結果

I/R + G-CSF 群は他の群に比べて約 3 倍の高値を示した。

##### C) p-AKT の免疫染色

陽性細胞の局在をみると、特に I/R + G-CSF 群の神経節細胞層に多くみられた。

#### 4 (2) 研究成果のまとめ

・網膜虚血再還流モデルラットへの G-CSF 全身投与は、組織学的に網膜内層の障害を抑制した。

・網膜虚血再還流モデルラットへの G-CSF 全身投与により、術 1 日目、7 日目の TUNEL 陽性細胞が減少した。

・術 7 日後の網膜での p-AKT の発現が G-CSF 全身投与群では非投与群よりも 3 倍に亢進しており、p-AKT 陽性細胞は主に神経節細胞層に存在していた。

#### 4 (3) 研究成果の考察

網膜虚血再還流モデルラットへの G-CSF 全身投与は、組織学的に網膜障害を抑制し、その機序として、p-AKT を介した抗アポトーシス効果が考えられた。

#### 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)

[雑誌論文] (計 6 件)

(全て査読あり)

- ① 南野桂三, 安藤彰, 竹内正光, 高橋寛二, 小池直子, 小林かおる, 秋岡真砂子, 河合江実, 白紙靖之, 森秀夫, 西村哲哉: 診断に苦慮した Leber 遺伝性視神経症の 1 例. あたらしい眼科, 28: 139-143, 2011

② 松山加耶子, 南野桂三, 安藤彰, 竹内正光, 和田光正, 嶋千絵子, 松岡雅人, 福井智恵子, 桑原敦子, 松山英子, 西村哲哉: Soemmering 輪による続発閉塞隅角緑内障の 1 例. あたらしい眼科, 27: 1603-1606, 2010

③ Tokuyama Y, Adachi Y, Minamino K, Shintaku H, Okigaki M, Hayashi K, Kitajima A, Takaki T, Koike N, Shima C, Imai Y, Shi M, Yanai S, Ikehara S: Abnormal distribution of dendritic cells in (NZW x BXSB)F1 mice. Autoimmunity, 42(5):399-405, 2009

④ Shima C, Adachi Y, Shi M, Imai Y, Okigaki M, Yanai S, Minamino K, Takahashi K, Ikehara S: The combination method using magnetic beads and a magnet helps sustain the number of donor BM cells after intra-BM injection, resulting in rapid hematopoietic recovery. Bone Marrow Transplant, 45(6):993-9, 2009

⑤ Ikeda K, Nakano R, Uraoka M, Nakagawa Y, Koide M, Katsume A, Minamino K, Yamada E, Yamada H, Quertermous T, Matsubara H: Identification of ARIA regulating endothelial apoptosis and angiogenesis by modulating proteasomal degradation of cIAP-1 and cIAP-2.

Proc Natl Acad Sci U S A, 19:106(20):8227-32, 2009

⑥南野桂三, 松岡雅人, 安藤彰, 松山加耶子, 嶋千絵子, 福井智恵子, 桑原敦子, 尾辻剛, 緒方奈保子, 西村哲哉: 選択的レーザー線維柱帯形成術の治療成績. あたらしい眼科, 26:1249-1252, 2009

[学会発表] (計 3 件)

①南野桂三

白内障術後強膜創からの前房水漏出による低眼圧黄斑症の 1 例  
第 34 回日本眼科手術学会総会  
2011 年 1 月 28 日  
京都国際会議場 (京都市左京区)

②南野桂三

ラタノプロストからトラボプロストへの切り替えによる眼圧下降効果  
第 114 回日本眼科学会総会  
2010 年 4 月 15 日  
名古屋国際会議場 (名古屋市熱田区)

③南野桂三

診断に苦慮した Leber 遺伝性視神経症の 1 例  
第 47 回日本神経眼科学会総会  
2009 年 11 月 13 日  
日経ホール (東京都千代田区)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

南野桂三 (MINAMINO KEIZO)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号: 40509585