

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592548

研究課題名(和文) ゲラニルゲラニルアセトンによる正常眼圧緑内障モデル動物の網膜神経節細胞死抑制

研究課題名(英文) Retinal Ganglion Cell Protection in normal tension glaucoma mouse model by Geranylgeranylacetone

研究代表者

新明 康弘 (Shinmei, Yasuhiro)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：00374398

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：正常眼圧緑内障モデルであるグルタミン酸トランスポーター(GLAST)ノックアウトマウスにおいて、ゲラニルゲラニルアセトン(GGA)の神経保護作用を調べた。GGAを投与されたGLASTヘテロマウスでは、非投与群に比較して有意に網膜神経節細胞(RGC)死が抑制された。さらにGGAは用量依存性にRGC死を抑制した。GGAの投与は網膜における熱ショック蛋白(HSP70)産生を増加させ、カスペーゼ9、3活性を抑制した。HSP70はRGCの変性を抑制する、よい治療標的であり、GGAの投与が正常眼圧緑内障の治療に結びつく可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：To investigate the cytoprotective effect of geranylgeranylacetone (GGA) on retinal ganglion cell (RGC) degeneration using a normal tension glaucoma (NTG) mouse model, which lacks glutamate/aspartate transporter (GLAST) and demonstrates spontaneous RGC and optic nerve degeneration without elevated intraocular pressure (IOP). The number of RGC of GLAST<sup>+/-</sup> mice significantly decreased, as compared to that of littermate control mice. RGC loss was suppressed by administration of GGA in a dose-dependent manner. Following GGA administration, HSP70 was significantly up-regulated, and activities of caspase-9 and -3 were suppressed. HSP70 is a favorable target to suppress RGC degeneration, and thus GGA may be applicable for NTG as a promising therapeutics.

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：眼細胞生物学 神経保護

1. 研究開始当初の背景

緑内障では、網膜神経節細胞が何らかの原因によりアポトーシスを起こすことで、慢性進行性の視神経障害が引き起こされる。メラニルメラニルアセトン (GGA) は生体を傷害せずに熱ショック蛋白質を誘導して、神経保護作用を持つ。

2. 研究の目的

GGA による新たな緑内障に対する神経保護治療の可能性を検討する。

3. 研究の方法

正常眼圧緑内障モデル動物であるグルタミン酸トランスポーター (GLAST) の機能異常を持つ遺伝子欠損マウスを用いて、メラニルメラニルアセトン (GGA) の網膜神経節細胞のアポトーシス抑制効果を調べる。

(1) GGA の用量依存性を検討

3 週齢の GLAST+/-マウスを使用  
 GGA 投与群とコントロール群に分ける  
 コントロール群：5%アラビアゴム  
 GGA 投与群：GGA (100, 300, 600mg/Kg/day)

投与方法と期間：生後 3 週目から 5 週目まで連日経口投与

評価項目：網膜神経節細胞数

① 網膜神経節細胞数は一方の鋸状縁から反対側の鋸状縁までの間の組織標本に含まれる神経節細胞をカウントして評価。

② 上丘から蛍光色素を注入して神経節細胞を逆行性に標識し、網膜フラットマウント標本を作製して評価。

(2) GGA の網膜での作用機序を確認するため、HSP70 の誘導が起こっているかと、アポトーシスが抑制されているかを確認するため、HSP70 の免疫染色とカスパーゼ 9、3 活性の測定を行う。

4. 研究成果

(1) GLAST ノックアウトマウスにおいて GGA は用量依存性に網膜神経節細胞死を抑制した。

図 1. GGA 投与後の網膜組織

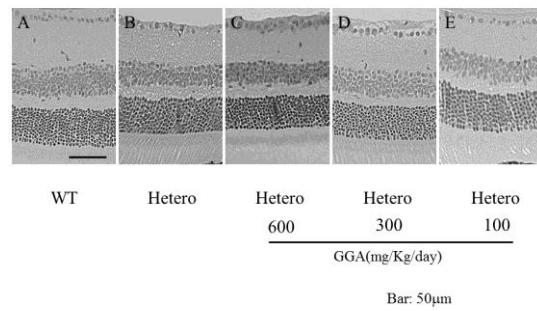


図 2. GGA 投与後の網膜神経節細胞数

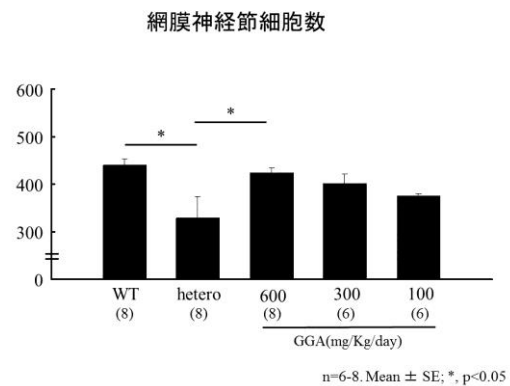


図 3. 網膜神経節細胞の逆行性染色

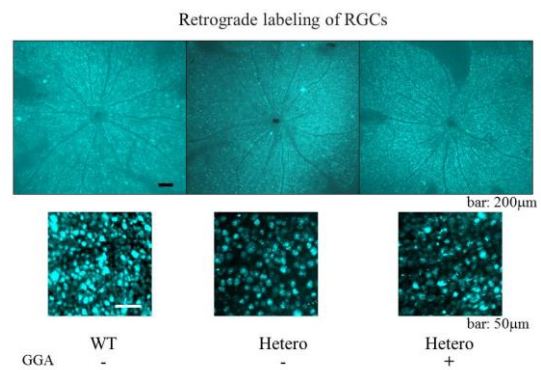
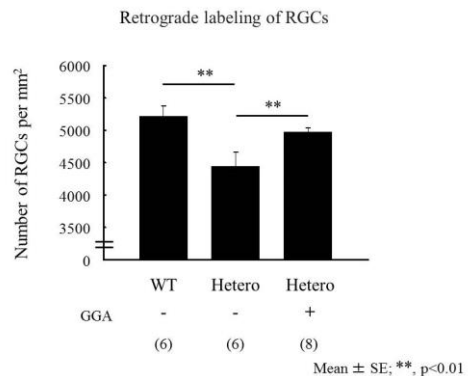


図 4. 逆行性染色によってカウントされた網膜神経節細胞数



網膜組織切片においても、フラットマウントによる逆行性染色による評価においても GGA 投与が網膜神経節細胞死を抑制することが明らかとなった。

- (2) GGA の投与は網膜における HSP70 産生を増加させ、カスパーゼ 9、3 活性を抑制した。

図 5. GGA 投与の網膜 HSP70 免疫染色

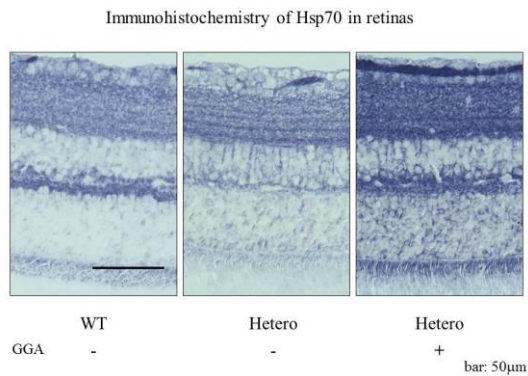
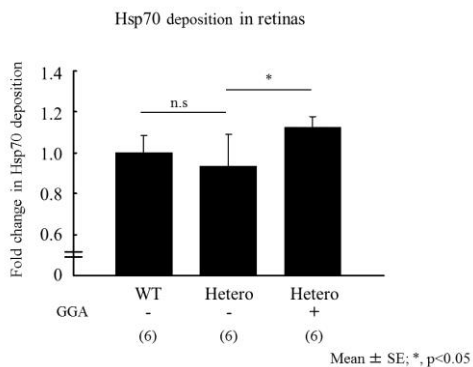


図 6. GGA 投与による HSP70 の誘導



GGA 投与によって網膜においても HSP70 の誘導が起きていることを明らかにした。

図 7. GGA 投与後のカスパーゼ 9 活性

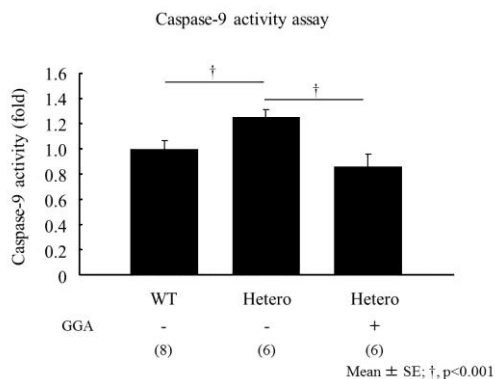
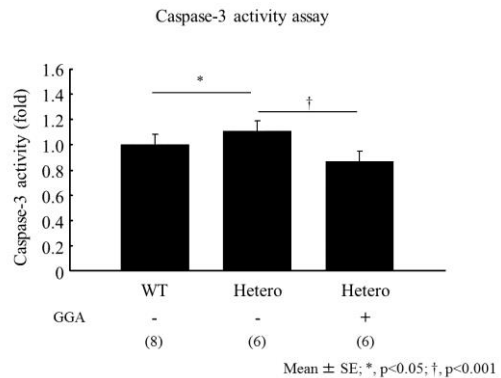


図 8. GGA 投与後のカスパーゼ 3 活性

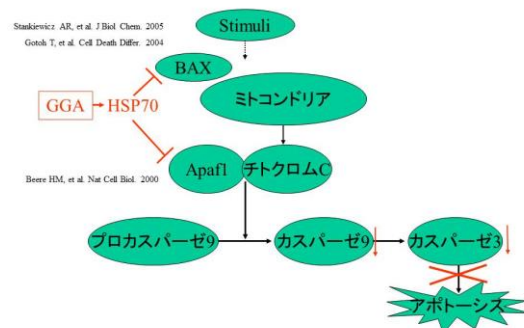


GGA 投与により、カスパーゼ 9、3 活性が抑制されている。

まとめ

- (1) GGA は用量依存性に網膜神経節細胞死を抑制
- (2) GGA は網膜における HSP70 産生を増加させる
- (3) GGA は網膜におけるカスパーゼ 9、3 活性を抑制する

図 9. GGA による網膜神経節細胞死抑制のメカニズム



以上の実験より、今回我々は図 9 に提示するような機構が働き、GGA が緑内障治療薬として有効に働く可能性を明らかにした。

結論

GGA は HSP70 産生を誘導し GLAST 変異マウスにおいて網膜神経節細胞死を抑制しうることが示された。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 1件)

- ① 董 震宇、ガラニルガラニルアセトンによる正常眼圧緑内障モデル動物の網膜神経節細胞死抑制、第5回 Neuroprotective Meeting for Young Researchers (NMYR)、2013年11月23日、大手町ファーストスクエアウエストタワー (東京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新明 康弘 (SHINMEI YASUHIRO)  
北海道大学・北海道大学病院・助教  
研究者番号：00374398

(2) 研究分担者

北市 伸義 (KITAICHI NOBUYOSHI)  
北海道大学・大学院医学研究科・客員教授  
研究者番号：00183898

(3) 連携研究者

なし