

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791974

研究課題名（和文）正常眼圧緑内障モデルマウスを用いた神経保護、網膜再生の研究

研究課題名（英文）Neuroprotective effect and adult optic nerve regeneration of administration of tacrolimus against spontaneous neuropathy in NF-kBp50-deficient mice as a normal tension glaucoma model

研究代表者

中村 朋子（NAKAMURA TOMOKO）

（柳平 朋子）（YANAGIDAIRA TOMOKO）

信州大学・医学部・委嘱講師

研究者番号：90568411

研究成果の概要（和文）：細胞の生死にかかわるとされる NF-kBp50 欠損マウス (KO マウス) は、正常眼圧緑内障 (NTG) モデルマウスともいふべき性質を備えている。アポトーシス関連因子であるカルシニューリン阻害剤であるタクロリムスの網膜神経節細胞 (RGC) 保護、再生について研究を進めた。

年齢依存性に RGC が減少する KO マウスにタクロリムスを長期間腹腔内投与したところ、RGC 数、軸索数の減少は見られず、タクロリムスが神経保護に関与していることが示された。また、タクロリムスを長期投与した KO マウスでは、RGC の増殖が認められた。網膜障害-再生モデルにおいては、bFGF の発現が多く認められた。以上より、NTG モデルマウスを用いた実験によってタクロリムスの神経保護、再生の可能性が示唆され、bFGF がキー物質であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The transcription factor nuclear factor-kappa B (NF-kB)/Rel family may be involved in neuronal cell death and survival. We reported that NF-kBp50-deficient mice exhibit many features resembling human normal tension glaucoma (NTG). Our aim is to elucidate the mechanism of the initiation of NTG. Chronic optic neuropathy was significantly reduced under chronic administration of calcineurin inhibitor Tacrolimus. We have also investigated whether retinal cells have the potential to generate neurons in p50-deficient mice with chronic administration of Tacrolimus. Tacrolimus-treatment markedly promotes the proliferation of bipolar cell-derived retinal progenitors and optic nerve regeneration after damage to or during the degeneration of retinal ganglion cells in p50-deficient mice. These experimental results proposed optic nerve healing and basic fibroblast growth factor (bFGF) expression by the chronic administration of Tacrolimus.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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：正常眼圧緑内障モデルマウス、タクロリムス

### 1. 研究開始当初の背景

緑内障は、視神経乳頭、視野の特徴的変化の少なくとも一つを有し、通常眼圧を十分下降させることにより視神経障害の改善あるいは進行を阻止しうる眼の機能的構造的

異常を特徴とする疾患である。眼圧上昇は視野障害を進行させる重要な因子であるが、正常眼圧緑内障 (NTG) においては、年齢依存性、眼圧非依存性に緑内障性の視神経乳頭変化と視野障害を示す NTG は 40 歳以上の約 4%、日本人の緑内障の約 6 割を占める。眼圧下降

が唯一の治療法であるが、点眼、手術療法により十分な眼圧下降が得られても病状の進行を認める症例も少なくない。眼圧非依存性の因子を解明することは、治療法の発展の一助になる可能性がある。NTGの病態は、網膜神経節細胞(RGC)のアポトーシスであると考えられている。

外部からのストレスに対しての生体防御に重要な役割を担っている転写調節因子、NF- $\kappa$ Bの活性化は、T細胞、B細胞を主とした免疫担当細胞による免疫ネットワーク機構に必須であり、また脳神経細胞の増殖や記憶においても非常に重要である、我々の研究グループでは、NF- $\kappa$ Bp50欠損マウス(KOマウス)を用いて、これら転写調節因子が視神経細胞や電子伝達系においても重要である可能性を立証した。月齢10ヶ月のKOマウスでは、同月齢の野生型マウス(WT)と比較して著しく網膜神経節細胞(RGC)が減少しており、KOマウスにおいて5ヶ月齢以降にRGCアポトーシスが生じていることを明らかにされた。また、月齢10ヶ月のKOマウスでは、顕著な視神経乳頭陥没が組織学的に認められ、視神経全体に細胞の著しい萎縮や膨潤が認められた。WTマウスとKOマウスには眼圧の差が認められなかった。以上より、KOマウスはNTGモデルマウスとして有用であると考えられた。

## 2. 研究の目的

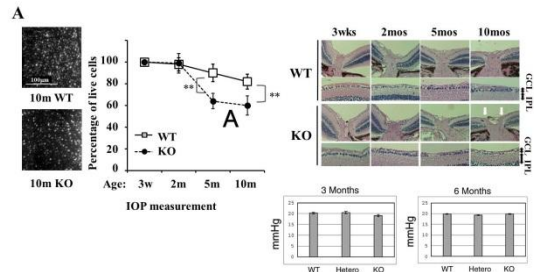
NTGモデルマウスともいふべき性質を備え、NTGの病態や治療において役立つとKOマウスを用いて、神経保護、網膜再生の可能性を研究する。

## 3. 研究の方法

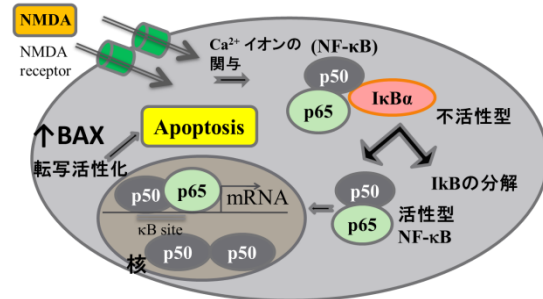
実験的NTGモデルにおいて、N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)によりRGCアポトーシスが起り、NMDAアンタゴニストであるメマンチンによりRGCアポトーシスが阻害されることにより、米国においてメマンチンの臨床試験が行われているが、結果は芳しくない。また、NTG患者に偏頭痛を持つ可能性が高いことより、両疾患において共通のリスクファクターの存在が示唆され、カルシウムブロッカーの治験計画が現在進行中である。我々は、上記の薬剤に加えて、アポトーシスに重要な役割を示すと考えられるカルシニューリンの阻害剤であるタクロリムスに着目した。虚血性疾患における脳神経ダメージは、タクロリムスの投与で著しく軽減されており、タクロリムスは神経保護作用を有すると考えられている。また、カルシニューリンはNF- $\kappa$ Bの活性化を誘導することが報告されている。

以上より、タクロリムスがNTGに有効である可能性を考え、KOマウスに継続的に投与することにより、タクロリムスの網膜神経保護、再生の効果を検討した。

## p50 KOの視神経乳頭、網膜神経節細胞(RGC)の経時的変化

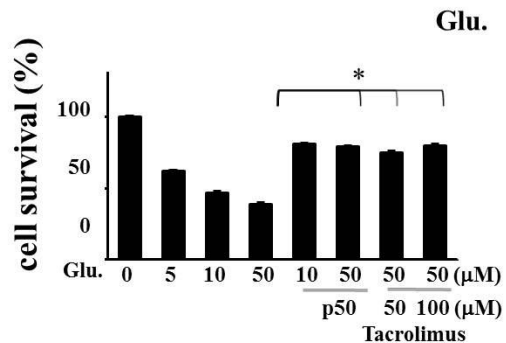


## NF- $\kappa$ Bシグナルカスケード

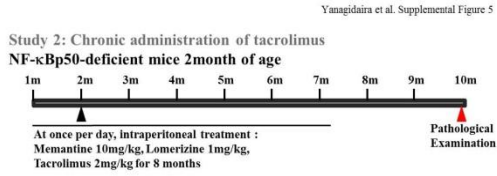


## 4. 研究成果

In vitroの実験として、ラット培養細胞、RGC-5 (a rat ganglion cell line transformed using E1A virus) を使用して、カルシニューリン阻害剤であるタクロリムスのグルタミン酸誘導性RGCアポトーシスに対する役割を検証した。培養RGCにNMDAを投与して実験的緑内障モデルを作りだし、これにタクロリムスを投与した。タクロリムスを投与したRGC細胞では、細胞数が保たれており、タクロリムスの抗アポトーシス効果がin vitroで立証された。

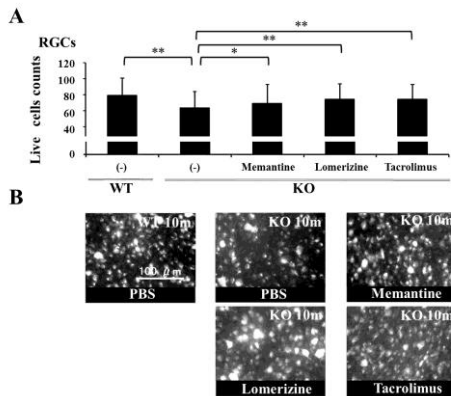


次に、KOマウスにタクロリムスを長期間腹腔内投与し、網膜の状態を検討した。

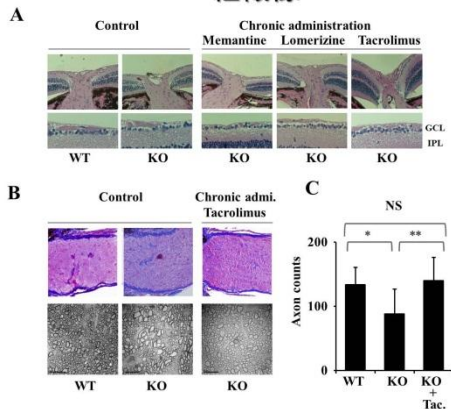


タクロリムスを投与したKOマウスではRGC数、軸索数の減少は見られず、自然経過においてタクロリムスが神経保護に関与していることが示された。

### 結果:RGC数

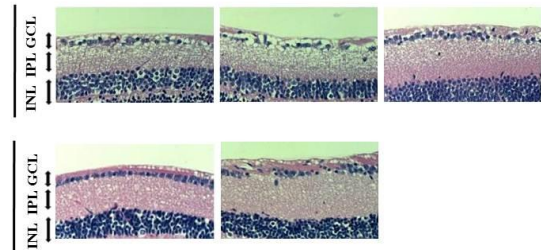
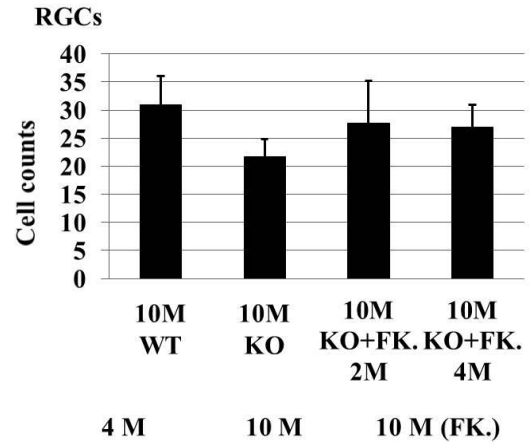


### 組織像

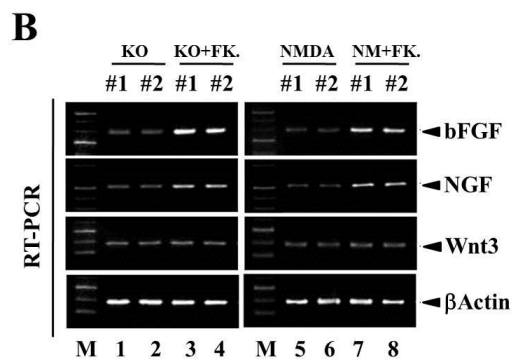


次いで、KOマウスに対するタクロリムスの長期投与が神経再生を促すかどうかについて検討した。2ヶ月齢と4ヶ月齢のKOマウスにタクロリムスを長期投与すると、ある程度RGC

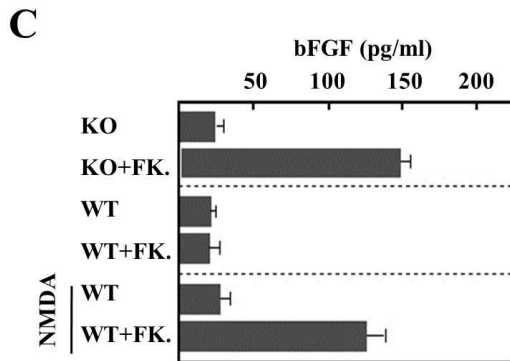
アポトーシスが進行したと思われる月齢4ヶ月よりタクロリムスを投与した月齢10ヶ月のKOマウスでは、同月齢のKOマウスと比較して、RGCの減少が軽度であり、月齢2ヶ月より投与したマウスにも劣らないRGC数を示した。



網膜再生のカギとなる物質を探すため、RT-PCR法で、標的サイトカインのメッセンジャーRNAの発現を検討した。タクロリムスを投与するとbFGF, NGFといった成長因子が発現していることが確認された。



ERISA法で確認すると、やはりbFGFが多く発現していることが確認された。



以上より、NTGモデルマウスを用いた実験によってタクロリムスの神経保護、再生の可能性が示唆され、bFGFがキー物質であることが示唆された。

#### 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 1 件)

- ① Tomoko-Nakamura-Yanagidaira, Yasuko Takahashi, Toshinori Murata, Kenji Sano, and Takuma Hayashi. Development of spontaneous neuropathy in NF-kBp50-deficient mice by calcineurin-signal involving impaired NF-kB activation. *Molecular Vision*. 2011; 17: 2157-2170

[学会発表] (計 1 件)

- ① 中村 朋子  
緑内障と加齢黄斑変性の診断と治療：小県医師会 (招待講演) 2012. 8. 29 上田市

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 朋子 (柳平 朋子) (NAKAMURA TOMOKO)  
信州大学・医学部・委嘱講師  
研究者番号：90568411