

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462764

研究課題名(和文) 視機能再建を目指した新規視神経再生方法の開発

研究課題名(英文) Development of a new therapy to stimulate optic nerve regeneration and reconstruction of the visual function

研究代表者

栗本 拓治 (KURIMOTO, Takuji)

公益財団法人東京都医学総合研究所・運動・感覚システム研究分野・研究員

研究者番号：50388815

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：視神経は一旦損傷されると再生することなく逆行性変性を起こす。しかし視神経損傷後にZy mosanを眼内投与して眼内炎を誘導すると、損傷された視神経線維を再伸長させることができる。このメカニズムはこれまで不明であったが、本研究では好中球から放出されるOncomodulinが軸索再生を促進することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Although neurons are normally unable to regenerate their axons after injury to the central nervous system, proinflammatory agents, such as zymosan, have been shown to cause retinal ganglion cells to regenerate axons through the injured optic nerve. However, the role of molecules and cell populations in mediating this phenomenon remains unclear. We showed that neutrophils, the first responders of the innate immune system, release oncomodulin, which plays a central role in zymosan-induced optic nerve regeneration.

研究分野：眼科学

キーワード：視神経再生 好中球 Oncomodulin

1. 研究開始当初の背景

(1) 視神経は一旦損傷されると再生することなく逆行性変性を起こし、その細胞体である網膜神経節細胞 (RGC) は細胞死に陥る。しかしながら、酵母の細胞壁成分である Zymosan を眼内投与し、眼内炎を惹起させると、損傷された視神経線維を再伸長させることができる。例えば我々は Phosphatase and tensin homolog (PTEN) コンディショナルノックアウトマウス (PTEN CKO) の眼内に Zymosan と cAMP アナログ (CPT-cAMP) を同時投与すると、損傷した視神経が顕著に再生され、挫滅後 6 週目には多数の再生線維が視交叉を越えて、視床まで到達することを報告済みである (Kurimoto et al. *J Neurosci*, 2010)。

(2) この再生過程をより長期に観察すると挫滅後 12 週目においては、再生線維は視神経全長にわたって伸展し、視交叉上核、内側終止核、視蓋オリブ核、上丘の視覚中枢まで到達した。さらに視覚遮断による回避反応、視運動反射、概日リズムの行動レベルにおける機能回復が確認された (de Lima et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012)。これらの研究により、Zymosan による眼炎症、PTEN 遺伝子の抑制、cAMP アナログなどを併用することにより、これまで不可能と思われた視中枢への視神経再生を可能にすることが示された。

(3) さらにこのような眼炎症に伴う視神経再生のメカニズムに関して、眼内に浸潤する活性型マクロファージから産生されるオンコモジュリン (Oncomodulin) がその主要因子であることが報告されている (Yin et al. *Nat Neurosci*, 2006; *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009)。ただし Oncomodulin の眼内発現レベルは、炎症惹起後 24 時間でピークに達すると考えられる。しかし実際には、多くのマクロファージが損傷部位に集積するのはそれよりも後になることから、マクロファージ以外にも Oncomodulin の供給源があるものと想定されてきた。だがその実体は解明されていない状況にあった。

2. 研究の目的

そこで本研究では、視神経損傷時にマクロファージよりも早期に眼内に浸潤する好中球に注目し、同細胞が Oncomodulin の放出や軸索再生に関与する可能性を検討することとした。

3. 研究の方法

(1) Zymosan 投与後に眼内浸潤する好中

球の出現パターンの解析と Ocm 発現レベルの検討。

本実験では、C57/B6 マウスの眼内に Zymosan を投与し、眼内へ浸潤する Gr-1 陽性好中球、F4/80 陽性マクロファージの出現変化を経時的 (投与後 12、24、72 時間後) に組織学的に検討する。またこの結果をフローサイトメトリーを用いて確認する。さらにセルソーターにより Gr-1 陽性好中球、F4/80 陽性マクロファージを回収し、Oncomodulin mRNA の発現レベルを定量的 PCR 法を用いて調べる。

(2) 中和抗体による好中球の眼内浸潤抑制が視神経再生に与える影響の解析。

視神経挫滅の 1 日前に好中球の中和抗体である Ly6G を C57/B6 マウスに静脈投与し、末梢血中の好中球を減少させる (Daley et al. *J Leukoc Biol*, 2008)。その上で視神経挫滅直後に Zymosan (12.5 mg/ml) を眼内投与し、視神経再生に与える影響を GAP-43 抗体による免疫染色などによって検討する。

また Zymosan 投与後 1 日目の網膜内 Oncomodulin 発現レベルの上昇が Ly6G 投与によって抑制されるか、免疫組織染色を用いて調べる。

さらにより直接的に Oncomodulin の影響を調べるため、Oncomodulin 中和抗体を Zymosan と共に硝子体内投与し、その影響を Ly6G と同様に検討する。

4. 研究成果

(1) Zymosan を眼内投与すると、12 時間後および 24 時間後には、硝子体において Gr-1 陽性の好中球が多数観察された。一方、F4/80 陽性のマクロファージはその時間帯にはまだ少数であるが、72 時間後までにはやや増加することが確認された。

以上の組織学的な解析結果は、フローサイトメトリーを用いた検討結果ともよく一致することが判明した。

(2) Zymosan 投与後の眼内からセルソーターで回収した Gr-1 陽性好中球および F4/80 陽性マクロファージの両者において、非常に高いレベルの Oncomodulin mRNA の発現が確認された。

また Zymosan を投与しない個体と投与後の個体の血液から好中球を採取して同様の検討を行うと、後者の方が Oncomodulin mRNA の発現量が非常に高いことがわかった。

以上から、好中球にはもともと Oncomodulin が発現しているものの、Zymosan などによって活性化されることにより、その発現量が大きく上昇することが示

された。

(3) 視神経挫滅の直前に Ly6G を投与した個体では、挫滅の 24 時間後における眼内浸潤細胞数が大きく減少し、網膜内層における Oncomodulin の蛋白発現量も、約 50%程度にまで低下した。この時に ciliary neurotrophic factor (CNTF)、leukemia inhibitory factor (LIF) および IL-6 を同時に免疫染色法で確認したが、Ly6G による発現量の変化はなく、Oncomodulin の選択的な低下が確認された。

次に視神経挫滅後の軸索再生効果を検討した。対照群 (IgG 投与群) では Zymosan 投与により、0.5 mm 以上再生した軸索の本数が有意に増加した。しかし Ly6G 投与群では、Zymosan 非投与群よりは良好な結果であったものの、再生軸索数は対照群よりも大きく低下した。

(4) Oncomodulin の機能を確認する目的で Zymosan と共に Oncomodulin の阻害蛋白を眼内投与したところ、それらの個体では対照群と比較して、再生軸索数が 30%程度にまで減少することがわかった。

(5) 以上をまとめると、視神経損傷後に Zymosan を投与して炎症を惹起した場合、最初に反応して眼内に浸潤するのは好中球であり、そこから放出される Oncomodulin が網膜神経節細胞に作用して、軸索再生を促進することが予想される。さらに Zymosan は好中球における Oncomodulin の発現量を増加させることも確認された。

先行研究と同様、本研究からもマクロファージは Oncomodulin を産生していることが明らかとなり、Zymosan による好中球、マクロファージなどの自然免疫の活性化が視神経再生と深く関連していることが示された。

(6) ただし (4) の Oncomodulin 阻害蛋白を用いた検討結果からは、Oncomodulin 以外にも複数の因子が軸索伸長に与える可能性が想定される。そこで引き続き新規に作成した Oncomodulin の欠損マウスを用いて、野生型マウスと同様の視神経再生実験を開始したところである。

今後はこれらの検討を継続することにより、Oncomodulin および他の因子が軸索伸長に与える影響について、さらに解明を進める予定である。

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 4 件)

1. Kanamoto T, Souchelnytski N,

Kurimoto T, Ikeda Y, Sakaue H, Munemasa Y, Kiuchi Y.

Proteomic study of retinal proteins associated with transcorneal electric stimulation in rats.

Journal of Ophthalmology. 2015;492050, 2015.

doi: 10.1155/2015/492050. 査読有

2. Omodaka K, Kurimoto T, Nakamura O, Sato K, Yasuda M, Tanaka Y, Himori N, Yokoyama Y, Nakazawa T. Artemin augments survival and axon regeneration in axotomized retinal ganglion cells.

Journal of Neuroscience Research 92(12), 1637-1646, 2014.

doi: 10.1002/jnr.23449. 査読有

3. Koriyama Y, Kurimoto T, de Lima S, Benowitz L.

Reinnervation of central visual areas and recovery of visual functions following optic nerve regeneration in adult mice.

Brain and Nerve 66(3), 265-272, 2014.

査読有

4. Kurimoto T, Yin Y, Habboub G, Gilbert HY, Li Y, Nakao S, Hafezi-Moghadam A, Benowitz LI. Neutrophils express oncomodulin and promote optic nerve regeneration.

Journal of Neuroscience 33(37), 14816-24, 2013.

doi: 10.1523/JNEUROSCI.5511-12.2013.

査読有

[学会発表](計 3 件)

1. Kazuko Omodaka, Takuji Kurimoto, Ori Nakamura, Kota Sato, Masayuki Yasuda, Noriko Himori, Toru Nakazawa.

Role of GDNF-receptor related genes to axonal damage-induced retinal ganglion cell death and regeneration.

Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology, 2015.5.5., Denver, USA.

2. Daiji Kittaka, Kazuhiko Namekata, Takuji Kurimoto, Xiaoli Guo, Chikako Harada, Takayuki Harada.

Roles of ASK1 in neuroprotection and axonal regeneration after optic nerve injury.

43rd Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2013.11.11., San Diego,

USA.

3. 栗本拓治. 眼炎症と PTEN 遺伝子欠損による視神経再生.
シンポジウム「緑内障の新しい神経保護・再生治療」
第 117 回 日本眼科学会総会
平成 25 年 4 月 4 日 東京国際フォーラム (東京都千代田区)

〔図書〕(計 1 件)

1. 栗本拓治. 傍腫瘍症候群と神経眼科.
眼科臨床エキスパート (編集 三村治、谷原秀信) 知っておきたい神経眼科診療.
pp 341-348. 医学書院 (2016)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗本 拓治 (KURIMOTO Takuji)
公益財団法人東京都医学総合研究所・運動・感覚システム研究分野・研究員
研究者番号: 50388815