

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462694

研究課題名(和文) 緑内障視神経変性における神経分泌タンパク質VGFの保護機構に関する研究

研究課題名(英文) A study for protective mechanisms of VGF, a neurosecretory peptide, in glaucomatous optic nerve degeneration

研究代表者

嶋澤 雅光 (Shimazawa, Masamitsu)

岐阜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：80381721

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マウス実験的緑内障(視神経挫滅)モデルにおけるVGFの発現変化およびVGFペプチドの作用について検討した。視神経挫滅1～7日後における網膜内のVGF遺伝子発現変化を検討したところ、3日をピークにVGF遺伝子の発現上昇が認められた。VGF蛋白質は遺伝子発現の上昇よりも遅れて7日後に上昇が認められた。VGF活性ペプチドであるVGF588-617(AQEE30)を硝子体内投与することにより、視神経挫滅後の網膜神経節細胞死を有意に抑制した。本知見はVGFが網膜神経節細胞障害に対して保護作用を有することを示唆している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the involvements of VGF in a mouse experimental glaucoma (optic nerve crush) model. Vgf mRNA increased in retina at the peak of 3 days after optic nerve crush. The VGF protein showed an increase after 7 days after optic nerve crush. Intravitreal administration of VGF peptide (AQEE 30) significantly suppressed retinal ganglion cell death after optic nerve crush. This finding suggests that VGF has a protective effect against retinal ganglion cell disorder.

研究分野：神経化学

キーワード：網膜神経節細胞

1. 研究開始当初の背景

緑内障は、我が国における中途失明原因の第1位を占める失明疾患であり、緑内障の40歳以上の平均有病率は約5%、20人に1人の割合で存在する(多治見スタディー)。しかし、眼圧降療法以外に緑内障に対して有効な治療法は存在せず、眼圧を十分に下降しても視野障害が進行する患者が多数存在する。したがって、緑内障の病態解明および直接網膜神経節細胞を保護するような治療法の開発が望まれている。近年、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症(ALS)などに代表される神経変性疾患において、神経細胞内に異常なタンパク質が凝集体を形成していることが報告され、その神経変性と小胞体ストレスとの関連性が注目されている。一方、アルツハイマー病患者において高率に緑内障を発症していることが疫学調査により明らかにされた。すなわち、緑内障の発症率は健常者で5%に対してアルツハイマー病患者の緑内障発症率は26%であった。これらの知見から、緑内障とアルツハイマー病、特に小胞体ストレスの間になんらかの因果関係があることが推測される。

これまで申請者らは、網膜神経節細胞死における小胞体ストレスの関与について検討し、それを初めて明らかにした。一方、網膜神経節細胞死における小胞体ストレスの関与に着目して研究しているのは、申請者ら以外にほとんどいない。さらに申請者らは、小胞体ストレス細胞死を抑制する化合物を見出すことを目的にマウス由来培養網膜神経節細胞を用いてツニカマイシン誘発小胞体ストレス細胞死に対するスクリーニングを実施した。そのスクリーニングから小胞体ストレス細胞死を抑制するいくつかの天然成分および化合物を見出した。そのなかで、抗酸化作用および $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ チャネル遮断作用を有する(2S)-1-(4-amino-2,3,5-trimethylphenoxy)-3-(4-[4-(4-fluorobenzyl)phenyl]-1-piperazinyl)-2-propanol dimethanesulfonate (SUN N8075)が最も強力にその細胞死を抑制することを見出した。一方、他の抗酸化剤および $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ チャネル遮断薬には明確な保護作用は認められなかった。これらの結果から、SUN N8075の小胞体ストレスにより誘発される細胞死に対する保護作用は抗酸化および $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ チャネル遮断作用以外の新規な機序によることが示唆された。さらに、SUN N8075の保護作用が網膜以外の細胞においても認められるか否か確認するために、ヒト由来神経芽細胞腫(SH-SY5Y)を用いて同様の検討を実施した。その結果、SUN N8075はSH-SY5Y細胞においても同様にツニカマイシンによる細胞死を抑制した。そこで、SUN N8075の小胞体ストレス細胞死抑制作用の機序についてDNAマイクロアレイを用いた解析を行い、いくつかの標的候補分子を同定した。そのなかで、VGF nerve

growth factor inducible (VGF)遺伝子の発現がSUN N8075処置単独およびツニカマイシン併用下において著明に増加することを見出し、その増加はリアルタイムRT-PCR解析においても確認された。VGFはエネルギーバランスの維持および海馬シナプスの可塑性への関与が報告されている神経分泌タンパク質で、神経栄養因子であるNerve growth factor (NGF)およびBrain-derived neurotrophic factor (BDNF)により誘導されることが知られている。興味深いことに、発達過程の外側膝状体においてVGFが高発現し、眼球内へのテロロドトキシン(TTX)投与により網膜から外側膝状体への神経伝達を遮断することにより外側膝状体のVGF発現が著明に低下することが報告されている。

そこで、自然発症緑内障モデルマウス(DAB/2J, 15ヶ月齢)の網膜におけるVGFの発現を蛍光免疫染色により検討したところ、対照の正常マウス網膜と比較して緑内障マウス網膜においてVGFの発現が著明に増加していることが明らかになった。つぎに、小胞体ストレス細胞死に対するSUN N8075の保護作用がVGFの発現を介しているか否かを検討したところ、VGF siRNAによるVGF発現抑制によりSUN N8075の保護作用はほぼ完全に消失した。さらに、一過性のVGF遺伝子導入によりツニカマイシン細胞死は有意に抑制された(参考文献3)。また、VGF活性ペプチドであるVGF588-617(AQEE30)は、ハンチントン病遺伝子導入神経細胞および家族性ALS遺伝子(SOD1 G93A)導入運動ニューロンに対する細胞死を著明に抑制した。

これらの結果は、SUN N8075の小胞体ストレス細胞死に対する保護作用がVGFの発現を介しており、VGFが小胞体ストレス細胞死抑制作用を有し、VGFが小胞体ストレスを介した神経変性に対して保護作用を有していることを強く示唆する。

2. 研究の目的

緑内障に代表される網膜疾患において、その網膜神経節細胞死の機序については十分に解明されていない。申請者らはその網膜神経節細胞死に小胞体ストレス負荷を介した機序が関与しているという仮説に基づき研究を進め、その網膜障害時に小胞体ストレスが誘導されることを初めて明らかにした。さらに、小胞体ストレス細胞死を抑制する遺伝子の解析から、強力な細胞保護作用を有する神経分泌タンパク質であるVGF nerve growth factor inducible (VGF)遺伝子を見出した。また、自然発症緑内障マウス網膜においてVGFの発現が亢進していることを明らかにした。本研究ではこれらの研究を更に発展させ、緑内障におけるVGFの関与並びにその細胞保護機構の解明、VGFの新規治療ターゲットとしての可能性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 実験的緑内障(視神経挫滅)モデルの作製

網膜神経細胞の蛍光標識

マウスにケタミンおよびキシラジンの混合麻酔液を腹腔内投与した。その後、脳定位固定装置に固定し、頭がい骨を露出させた。顕微鏡下、Fluorogoldの注入点を、脳の表面からの深さ 2 mm、前後方向の軸に沿ってブレグマの後ろ 2.92 mm、正中線の横 0.5 mm の場所に右半球・左半球それぞれ定めた。定めた点に手術用ドリルで穴を開け、マイクロシリンジを用いてフルオロゴールド (4% in saline) を 1 μ L (0.5 μ L/min) 注入することにより、上丘より逆行性に網膜神経節細胞を蛍光標記した。

視神経挫滅モデルの作製

ケタミン 120 mg/kg およびキシラジン 6 mg/kg の混合麻酔液を腹腔内投与した。その後、結膜を切開し、切開した結膜の端を持ち眼球を鼻側に動かし慎重に視神経を露出させた。眼球後方約 0.5-1 mm の部位でネガティブピンセット (Dumont#7, Jura, Switzerland) を使用し、10 秒間視神経を挫滅した。眼球を元の位置に戻し、感染症を防ぐために少量のタリビット眼軟膏 0.3% を塗り眼球の保護を行った。視神経挫滅 10 日後にマウス眼球を摘出し、4% パラホルムアルデヒド含有 0.1M PB (pH7.4) 液中で 6 ~ 8 時間固定した。固定した眼球は、0.01 M PBS に浸しながら顕微鏡下で角膜および水晶体を切除し、色素上皮から網膜を分離し、網膜を強膜から完全に剥離した。その後、網膜を四分円に切り、平面状態にして Fluoromount (Diagnostic BioSystems, Pleasanton, CA, USA) で封入し、網膜フラットマウント標本作製した。その後蛍光顕微鏡 (Olympus, Tokyo, Japan) を用いて蛍光観察を行った。撮影は顕微鏡 (Power BX50: Olympus) にデジタルカメラ (Coolpix 4500, Nikon) を装着して行った。

(2) 網膜における Vgf mRNA の発現

全 RNA 抽出

視神経挫滅 1、2、3、5、7 日後にマウス眼球を摘出し、網膜を単離した。単離した網膜は 1.5 ミリチューブの中に入れ、液体窒素を用いて急速凍結した。サンプルは RNA 抽出まで -80 °C に保存した。RNA の抽出には NucleoSpin® RNA (MACHEREY-NAGAL GmbH & Co. KG, Duren, Germany) を用い、手順はキットの標準プロトコールに従って次のように行った。サンプルを氷上にて融解し、2-ME DTT を 1% 添加した Buffer RA1 を 350 μ L 加え、ホモジナイズを行った。ホモジナイズしたライセートを Nucleo Spin Filter セットした Collection Tube (2 mL) に加え、23 °C、11000 \times g で 1 分間遠心した。その後、Nucleo Spin

Filter を取り除き、ろ液に 70% エタノールを 350 μ L 加え、混合した。混合液を Nucleo Spin RNA Colum に添加し、23 °C、11000 \times g で 30 秒間遠心した。遠心したカラムを新たな Collection Tube (2 mL) にセットし、MDP 350 μ L 添加した後、4 °C、11000 \times g で 1 分間遠心した。rdNase 10 μ L と Reaction Buffer for rdNase 90 μ L を混合した DNase reaction mixture 95 μ L を、遠心したカラムの中央のシリカメンブレンへ直接添加し、室温で 15 分間インキュベートした。インキュベート終了後、Buffer RAW2 をカラムに 200 μ L 添加し、4 °C、11000 \times g で 30 秒間遠心した。遠心したカラムを新たな Collection Tube (2 mL) にセットし、Buffer RA3 をカラムに 700 μ L 添加し、4 °C、11000 \times g で 30 秒間遠心した。遠心終了後、ろ液を捨て Buffer RA3 をカラムに 250 μ L 添加し、4 °C、11000 \times g で 2 分間遠心した。遠心したカラムを新たな Collection Tube (1.5 mL) にセットし、RNase-free H2O をカラムに 60 μ L 添加し、4 °C、11000 \times g で 1 分間遠心した。溶出した RNA は、逆転写反応を行うまで -80 °C に保存した。

RNA 定量および逆転写

RNA 濃度は Nano Vue Plus (GE healthcare Japan, Tokyo, Japan) を用い 260 nm の波長にて測定し、逆転写反応には Thermal Cycler Dice Real Time System (Takara Bio, Shiga, Japan) を用いた。逆転写反応は PrimeScript RT reagent kit (Perfect real time, Takara Bio) を用いて 37 °C、15 分の条件後に 85 °C、5 秒の条件で行った。

リアルタイム PCR

標的 cDNA の定量には SYBR Premix Ex Taq (Takara Bio) および TP 8000 Thermal Cycler Dice Real Time system (Takara Bio) を用いた。Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh) は内部標準として使用した。反応は 95 °C で 30 秒間反応させた後、95 °C ; 5 秒間、60 °C ; 30 秒間を 50 サイクル行い、Vgf について検討を行った。用いたプライマーは、Vgf は 5' -CAGGCTCGAATGTCC GAAAG-3' (forward) および 5' -CTTGGATAAG GGTGTCAAAGTCTCA-3' (reverse)、Gapdh は 5' -TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3' (forward) および 5' -TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-3' (reverse) である。

(3) 免疫染色

マウス眼球を摘出し、4%パラホルムアルデヒド含有 0.1 M PB (pH 7.4) にて 24 時間、4 °C で固定した。ついで 25%スクロース含有 0.1 M PB (pH 7.4) 液に 48 時間、4 °C で浸漬した。その後、O.C.T. compound によって凍結した眼球を包埋し、速やかに液体窒素で凍結し、薄切するまで -80 °C にて保存した。クリオスタット (Leica) を用いて、-20 °C で眼球後

1,000 μm -1,500 μm の位置で厚さ 10 μm の切片を作成し、MAS コーティングされたカバーガラス (Matsunami) に載せ、 -80°C で保存した。網膜凍結切片を染色時 -80°C より取り出し -20°C で 1 時間放置した後、 4°C で 1 時間、室温で 2 時間乾燥させ、Super PAP pen (Thermo Scientific) にて反応液の流出を防ぐために切片の周囲を囲んだ。その後、PBS に浸して O.C.T. Compound を洗浄した。その後、0.3% Triton X-100 含有 10% goat serum により 1 時間ブロッキングを行った。続いて、一次抗体 (VGF 抗体) を用いて 4°C で一晩反応させた。その後、蛍光標識した二次抗体によって 1 時間反応させ、Fluoromount (水溶性封入基材) で封入した。

(4) VGF の硝子体内投与

視神経挫滅の直後に AQEE-30 (50 $\mu\text{M}/2 \mu\text{l}/\text{eye}$) または溶媒 (PBS) の硝子体内投与、ポジティブコントロールとしてプリモニジン (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) の腹腔内投与を行った。感染症を防ぐために少量のタリビット眼軟膏 0.3% を塗り眼球の保護を行った。視神経挫滅 2、5 日後に、小動物用麻酔器 (Soft Lander, Sin-ei industry Co., Ltd.) を用い、笑気ガス 70%、酸素ガス 30% 下において麻酔導入時には 3.0% イソフルランを、麻酔維持には 1.5% イソフルランを使用し、マウスに麻酔をかけた。その後、AQEE-30 (50 $\mu\text{M}/2 \mu\text{l}/\text{eye}$) または溶媒 (PBS) の硝子体内投与を行った。感染症を防ぐためにクラビット点眼剤 0.3% を点眼し、眼球の保護を行った。

(5) 統計学的解析

実験成績は平均値 \pm 標準誤差で示した。統計学的な比較は、SPSS Statistics (IBM, Armonk, NY, USA) を用いて Student's t-test あるいは Dunnett's test により解析した。危険率が 5%未満を有意差有りとした。

4. 研究成果

(1) 視神経挫滅後の網膜における Vgf mRNA の発現量の経時的変化

視神経挫滅後の網膜における Vgf mRNA の発現量の経時的変化を、視神経挫滅 1、2、3、5、7 日後に、リアルタイム PCR 法を用いて検討を行った。Sham 群と比較し、視神経挫滅 2 日後は約 1.77 倍、3 日後は約 2.78 倍、5 日後は約 1.81 倍に Vgf mRNA の発現量が有意に上昇していることが認められた (図 1)。

(2) 視神経挫滅後の網膜における VGF 様免疫活性の経時的変化

視神経挫滅後の網膜における VGF タンパク質の発現を蛍光免疫染色法により検討した。視神経挫滅 7 日後の網膜全層において、特に網膜神経節細胞層および神経線維層に強い発現上昇が認められた (図 2)。

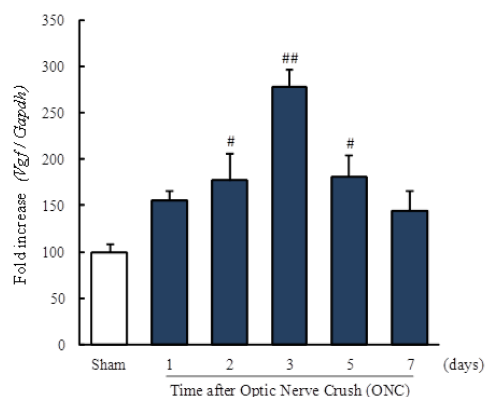


図 1. 視神経挫滅後の網膜における Vgf mRNA の発現量の経時的変化

P < 0.05, ## P < 0.01 vs the Sham group

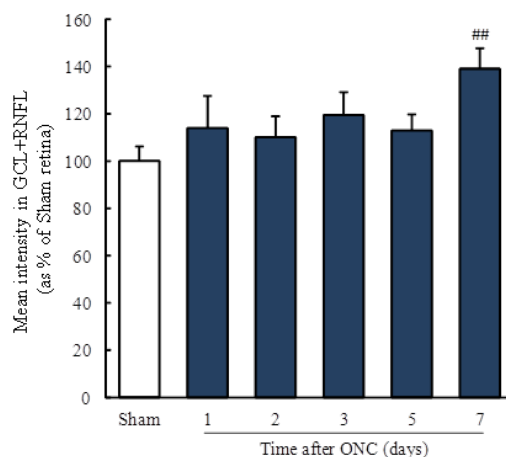


図 2. 視神経挫滅後の網膜神経節細胞層および神経線維層における VGF 免疫活性の経時的変化 ## P < 0.01 vs the Sham group

(3) 視神経挫滅モデルにおける VEGF 活性ペプチドの保護効果の検討

Fluorogold により標識した RGC 数の計測により評価を行った。Sham 群と比較して、視神経挫滅群は視神経挫滅 10 日後において、RGC 数の有意な減少が認められた。AQEE-30 (50 $\mu\text{M}/2 \mu\text{l}/\text{eye}$) 投与群は、網膜神経節細胞死を約 27.6%、有意に抑制した。

これらの結果から、視神経挫滅後の網膜神経節細胞死に VGF が関与しており、緑内障などの網膜疾患の治療ターゲットとして有用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 2 件)

Nakano Y., Shimazawa M., Ojino K., Izawa H., Takeuchi H., Inoue Y., Tsuruma K. and Hara H. Toll-like receptor 4 inhibitor protects against retinal ganglion cell damage induced by optic nerve crush in mice. J. Pharmacol. Sci., 査読有り, 133, 176-183, 2017.

Ojino K., Shimazawa M., Izawa H., Nakano Y., Tsuruma K. and Hara H. The involvement of endoplasmic reticulum stress in optic nerve degeneration after chronic high intraocular pressure in DBA/2J mice. J. Neurosci. Res. 査読有り, 93, 1675-1683, 2015.

〔学会発表〕(計5件)

竹内寛人、中野志迪、射和寛、久世祥己、鶴間一寛、嶋澤雅光、原英彰．視神経挫滅モデルにおける VGF nerve growth factor inducible の神経保護作用．第36回日本眼薬理学会(東京、2016、9、10-11)

Mizoguchi T., Minakuchi H., Ishisaka M., Ohba T., Tsuruma K., Shimazawa M. and Hara H. VGF overexpression mice exhibited several behavioral abnormalities with disruption of brain organization: implication in mental disorders. 30th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology (Seoul, 2016, 7, 3-5)

中野志迪、射和寛、王子野和樹、竹内寛人、鶴間一寛、嶋澤雅光、原英彰．マウス視神経障害に対する TLR4 阻害薬の神経保護作用．日本薬学会第136年会(横浜、2016、3、26-29)

溝口貴洋、石坂光絵、鶴間一寛、嶋澤雅光、原英彰．VGF overexpression mice show psychological abnormal behaviors. VGF 過剰発現マウスは、精神的な行動に異常を示す第89回日本薬理学会年会(横浜、2016、3、9-11)

王子野和樹、伊藤保志、鶴間一寛、嶋澤雅光、原英彰．DBA/2J マウスの視神経変性における小胞体ストレスの関与．生体機能と創薬シンポジウム2014(東大阪、2014、8、28-29)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

嶋澤 雅光 (SHIMAZAWA MASAMITSU)

岐阜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：80381721

(2) 研究分担者

原 英彰 (HARA HIDEAKI)

岐阜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：20381717