

令和 4 年 5 月 18 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07857

研究課題名(和文)病的内圧が神経変性を惹起する分子機序の解析

研究課題名(英文)Molecular mechanism of neurodegeneration caused by modest static pressure

研究代表者

米重 あづさ (Yoneshige, Azusa)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：70586750

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：高眼圧は緑内障発症リスクの一つであるが、内圧上昇と網膜変性の直接的関連性や分子機序は解明されていない。本研究では、水柱下培養装置を用いて網膜組織に加圧し、鉄イオン輸送蛋白質Lcn2と網膜変性との相関性を解析した。高眼圧に相当する50cm水柱圧下で培養した網膜では、正常眼圧である20cm水柱圧に比べて、Lcn2の発現が上昇し網膜神経節細胞(RGC)層でのグリア細胞増生が見られ、RGCの細胞死が増加していた。これら網膜変性病態は鉄イオンキレート剤によって抑制された。以上から本培養装置は内圧上昇と神経変性との直接的な因果関係を解明する上で有用で、Lcn2と鉄イオンの制御は治療標的であると示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

筆者らが開発した水柱下培養装置は生体内を模倣する実験モデルであり、内圧上昇とLcn2発現上昇、網膜神経節細胞層の神経変性との直接的な因果関係を証明した点が重要である。今後は網膜における内圧上昇の感作とLcn2をはじめとする神経変性因子発現誘導に至る分子機構の解明が必要で、特に内圧上昇感作におけるグリア細胞の役割が非常に興味深い。また、本研究において鉄イオンキレート剤であるDF0が網膜神経保護効果を示したことも、緑内障の新規治療法開発という観点において重要である。今後はLcn2発現上昇と組織内鉄イオン濃度の変化、それらによる細胞傷害機構の解明などを通して新規治療法開発につなげていきたい。

研究成果の概要(英文)：Elevation of intraocular pressure is a major risk factor for glaucoma development, which causes the loss of retinal ganglion cells (RGCs). Lipocalin 2 (Lcn2) is upregulated in glaucomatous retinae; however, whether Lcn2 is directly involved in glaucoma is debated. In this study, retinal explant cultures were subjected to increased water pressure using a two-chamber culture device, and Lcn2 protein levels were examined by immunoblotting. In situ TUNEL and GFAP immunohistochemical assays were performed to assess apoptosis and gliosis, respectively. The Lcn2 protein levels, percentage of TUNEL-positive cells, and GFAP-positive area were significantly higher in retinae cultured under 50 cm H<sub>2</sub>O pressure loads compared to those cultured under 20 cm H<sub>2</sub>O. The negative effects of increased hydrostatic pressure were attenuated by the iron chelator deferoxamine. Modulating Lcn2 and iron levels may be a promising therapeutic approach for retinal degeneration.

研究分野：実験病理学

キーワード：機械的圧力 神経変性 グリオシス 細胞死 鉄イオン

### 1. 研究開始当初の背景

内圧の上昇は種々の疾患の原因であるが、圧力負荷による細胞・組織変性の機序はほとんど明らかでない。特に緑内障や水頭症においては、眼圧または頭蓋内圧の軽減がほぼ唯一効果的な治療法であるにもかかわらず、内圧上昇と神経変性との直接的因果関係でさえ議論中である。その一因として従来の圧負荷実験系は特殊な加圧装置と培養環境が必要であるため、汎用性および再現性が低く至適な病的モデルの構築が困難であることが挙げられる。これまでに筆者らは、特殊な加圧装置を必要とせず且つ通常の培養環境において静的圧負荷が可能な細胞培養装置を開発し(図1)、圧力上昇に伴って神経接着分子である Cell adhesion molecule 1 (CADM1)の細胞外領域の酵素的切断(shedding)が亢進し軸索変性を惹起することを明らかにした(文献 )。

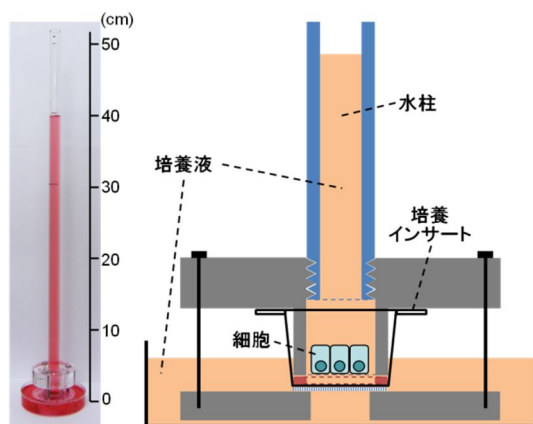


図1 水柱下培養装置の写真(左)と装置下部の模式図(右) 水柱の高さに相当する静的圧力が培養インサート上の細胞に負荷される。

一方で、筆者は緑内障における網膜神経節細胞の細胞死誘導機構を解明する過程で、Lipocalin 2 (LCN2)の発現上昇を見出している(文献 )。LCN2は細胞分化・増殖、細胞死に関わる多機能分泌蛋白質で、主には鉄イオンの細胞内恒常性を制御することによってその機能を果たす。近年では緑内障をはじめ多くの神経変性疾患においてLCN2の発現上昇が報告され、神経傷害因子として注目されている。しかしながら、神経系におけるLCN2の機能は未知でLCN2が関与する神経病態形成機構の解明が待たれる。

### 2. 研究の目的

本研究課題の核心をなす学術的「問い」は圧力負荷によって神経変性が惹起されることを実験的に証明することである。本研究は緑内障における眼圧上昇と網膜神経節細胞変性との因果関係を明確にし、その病態形成の分子基盤を解析することを目的とする。方法として筆者らが独自に開発した細胞培養加圧装置を用いて圧上昇と神経節細胞変性との相関解析を行い、筆者らによる先行研究に基づいて着想した2つの仮説：神経接着分子 Cell adhesion molecule 1 (CADM1)の酵素的切断産物の蓄積による神経軸索変性；鉄イオン制御分子 Lipocalin 2 (LCN2)の発現上昇による神経細胞死誘導を検証する。最終的に緑内障モデルマウスを用いて生体における仮説の実態解析を行うとともに、これら2つの分子を標的とした新たな緑内障治療法の効果を判定する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 網膜組織の水柱下培養系の確立

水柱下培養モデルとして網膜組織培養、網膜神経節細胞初代培養、網膜神経細胞株 RGC-5 を用いた。網膜神経節細胞初代培養では先行論文を参考に新生仔マウス網膜から初代培養の系を構築したが、水柱

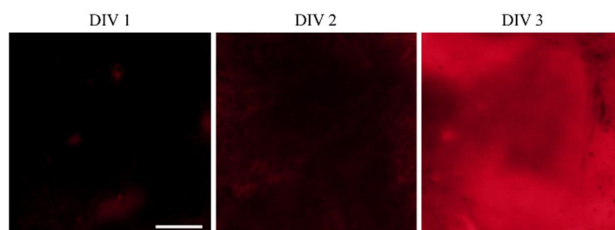


図2 通常培養下の網膜組織のPI染色

下培養での長期培養には適さない事が判った。また、網膜神経細胞株 RGC-5 は近年の研究により、網膜神経細胞由来でない事が判明したため、使用を取り止めた。

網膜組織培養の予備実験で、通常培養においても培養3日目以降は非特異的な細胞死が見られることが判明したため(図2)、網膜組織を用いて水柱下培養を2日間行うこととした。6-16カ月齢の C57BL/6J マウス網膜を採取し、神経培養用サプリメント含有 DMEM 培地を充填したシリンドー下部で網膜を2日間培養し(図1)、以下の実験に供した。

#### (2) 水柱下培養網膜組織のウエスタンブロッティングおよび組織化学的解析

ウエスタンブロッティングにより Lcn2 の発現変化を、TdT-mediated dUTP nick and labeling (TUNEL)法および glial fibrillary acidic protein (GFAP)の免疫染色によりアポトーシス陽性率およびグリオーシスの程度を評価した。

#### (3) 培養網膜組織の細胞毒性試験

網膜に対する Lcn2 の直接的な神経毒性を明らかにするため、リコンビナント Lcn2 を網膜組織培地中に添加した。また、鉄イオンの神経毒性を明らかにするため、鉄イオンの過剰投与を ferric 8-hydroxyquinoline complex (Fe-8HQ)で、鉄イオンのキレート効果を deferoxamine (DFO)を用いて再現した。各処理後の網膜組織において TUNEL 法によりアポトーシス陽性率を評

価した。

#### (4) 生体内における再現性確認

DBA/2J マウスは眼房水の排出障害による高眼圧性緑内障モデルで、6-12 ヶ月齢で眼圧が上昇することが知られている。手持ち眼圧計で眼圧を経時的に測定し、DBA/2J マウス網膜における Lcn2 の発現変化を mRNA、蛋白質レベルで解析した。

#### 4. 研究成果 (文献)

##### (1) 水柱圧上昇による Lcn2 発現上昇

網膜組織を 2cm (常圧)、20cm (正常眼圧)、50cm (高眼圧) 水柱下で培養後、Lcn2 発現量を調べたところ、50cm 水柱圧負荷の網膜組織では 20cm 水柱に比べて Lcn2 蛋白質量が 2.68 倍上昇することが判った ( $p < 0.01$ )。一方で、50cm 水柱下培養培地中に鉄イオンキレート剤 DFO を添加すると、網膜組織中の Lcn2 の発現上昇は抑制されることも判った (図 3)。

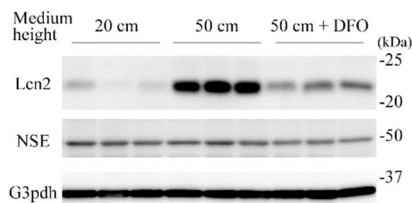


図3 水柱下培養網膜組織中の Lcn2 量

##### (2) 水柱圧上昇による網膜神経節細胞層におけるアポトーシス陽性率およびグリオーシスの上昇

50cm 水柱圧負荷の網膜組織では、網膜神経節細胞層における TUNEL 陽性率 (43.1%) が 20cm 水柱に比べて有意に高かった ( $p = 0.013$ )。一方、50cm 水柱圧負荷の網膜組織では GFAP 陽性面積が 20cm 水柱の 2.46 倍上昇していた ( $p = 0.029$ )。両変化は DFO 添加により抑制された (図 4)。

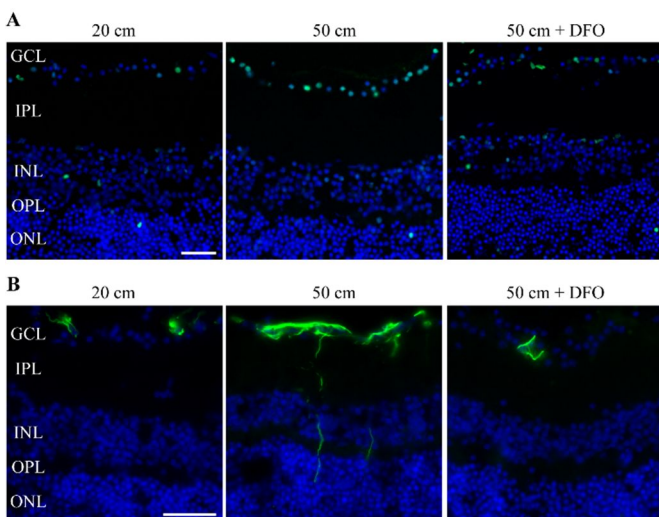


図4 水柱下培養網膜組織の TUNEL 法(上)と GFAP 免疫染色(下)

相関解析により、TUNEL 陽性率と GFAP 陽性面積とは正の相関にあり、両因子は Lcn2 蛋白質量とも正に相関していた。このことから、水柱圧上昇による Lcn2 発現上昇は網膜神経節細胞死および網膜組織グリオーシスと関連していることが示唆される。

##### (3) 網膜組織に対する Lcn2 および鉄イオン過剰による神経毒性

常圧網膜組織培養培地中に 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のリコンビナント Lcn2 を添加したところ、神経節細胞層における TUNEL 陽性率が非存在下の 2.56 倍上昇した ( $p < 0.01$ )。予想に反して、DFO はリコンビナント Lcn2 に対しては神経保護効果を発揮しなかった。ウエスタンブロッティングによりこれら組織中の Lcn2 蛋白質量を調べたところ、DFO 添加網膜組織では内在性の Lcn2 発現上昇は抑制されていたが、リコンビナント Lcn2 の組織内への吸収は抑制されていないことが判った。

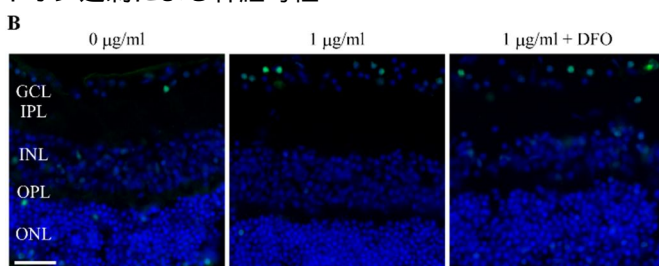


図5 常圧培養網膜組織に対する Lcn2 添加の影響

同様に常圧網膜組織培養培地中に Fe-8HQ を添加し、鉄イオンの過剰投与を行ったところ、Fe-8HQ 濃度依存的な網膜神経節細胞数の減少が観察された (図 6)。10  $\mu\text{M}$  Fe-8HQ 存在下の網膜組織では神経節細胞層だけでなく、全層にわたって TUNEL 陽性細胞が散見された。

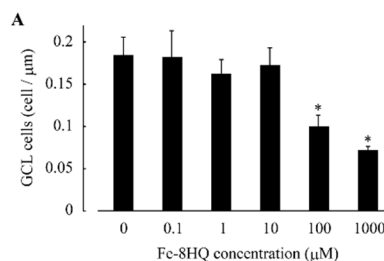


図6 常圧培養網膜組織に対する Fe-8HQ 添加の影響

##### (4) 高眼圧性緑内障モデル DBA/2J マウスにおける Lcn2 発現上昇とグリオーシスの亢進

先行研究において確立した手法により (文献 )、レーザーマイクロダイセクションで網膜神経節細胞層を単離して Lcn2 mRNA レベルを月齢 3, 6, 9, 12 の DBA/2J マウス網膜において解析し

た。Lcn2 mRNA は眼圧が最高値を示す 9 カ月齢において発現が最も高く、相関解析により眼圧と Lcn2 mRNA レベルは正の相関にあることが判った(図 7)。網膜組織中の Lcn2 蛋白質レベルは DBA/2J マウスの 9 カ月齢以降顕著な発現亢進が確認され、免疫染色では Lcn2 の神経節細胞層局所的な発現亢進が見られた(図 7)。一連の結果は Lcn2 が網膜神経節細胞層で合成され、同所に蓄積することによって神経節細胞を招くことを示唆する。GFAP の免疫染色によりグリオシスの程度を DBA/2J マウス網膜において解析したところ、12 > 9 > 3 カ月齢の順に GFAP 陽性面積は広く ( $p < 0.05$  vs 3 months)、9 カ月齢以降グリオシスは年齢と共に進行していることが判った(図 8)。

筆者らが開発した水柱下培養装置は本研究においても生体内を模倣する装置であることが示された。一般的な機械的高圧負荷装置は、そのほとんどが生体で発生する圧力よりもはるかに高い条件下での研究であった。例えばヒトの高眼圧は 24-32 mmHg であるのに対し、既報論文では 40-80 mmHg で実施されていた。その観点において筆者らの水柱下培養装置は 37 mmHg 以下の圧力を再現でき、且つ細胞から組織培養まで様々な生体外実験に応用出来ることも示せた。

一方で、本実験モデルを用いて内圧上昇と Lcn2 発現上昇、網膜神経節細胞層の神経変性との直接的な因果関係を証明した点も重要である。今後は網膜における内圧上昇の感作と Lcn2 をはじめとする神経変性因子発現誘導に至る分子機構の解明が必要と考える。これまでに網膜における機械的圧センサーとして transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) など様々な受容体が示唆されているが、内圧上昇におけるこれらの受容体と神経細胞死との関連を明らかにするために本実験モデルは有用であろう。特に本研究において内圧上昇による GFAP 陽性グリア細胞の増生が明らかになったが、内圧上昇感作におけるグリア細胞の役割は非常に興味深い。また、本研究において鉄イオンキレート剤である DF0 が網膜神経保護効果を示したことも、緑内障の新規治療法開発という観点において重要である。アルツハイマー病やパーキンソン病などでは鉄イオンキレート剤の投与により症状が改善したとの報告もあり、緑内障においても鉄イオン濃度の制御は効果的と考えられる。今後は Lcn2 発現上昇と組織内鉄イオン濃度の変化、それらによる細胞傷害機構の解明などを通して新規治療法開発につなげていきたい。

#### < 引用文献 >

- Yoneshige A, Hagiya M, Inoue T, Tanaka T, Ri A, Ito A. Modest Static Pressure Can Cause Enteric Nerve Degeneration Through Ectodomain Shedding of Cell Adhesion Molecule 1. *Mol Neurobiol*. 2017 Oct;54(8):6378-6390.
- Ueno S, Yoneshige A, Koriyama Y, Hagiya M, Shimomura Y, Ito A. Early Gene Expression Profile in Retinal Ganglion Cell Layer After Optic Nerve Crush in Mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2018 Jan 1;59(1):370-380.
- Yoneshige A, Hagiya M, Takashima Y, Ueno S, Inoue T, Kimura R, Koriyama Y, Ito A. Elevated Hydrostatic Pressure Causes Retinal Degeneration Through Upregulating Lipocalin-2. *Front Cell Dev Biol*. 2021 May 31;9:664327.

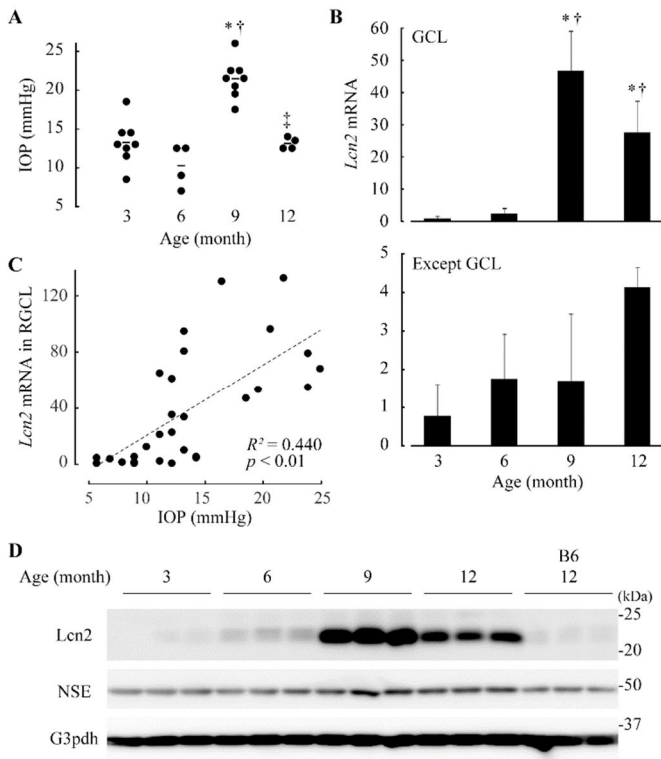


図7 DBA/2J マウス網膜における Lcn2 発現亢進

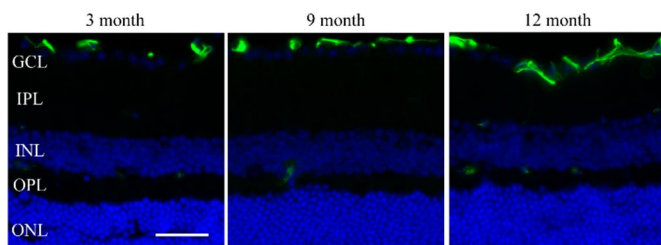


図8 DBA/2J マウス網膜におけるグリオシスの進行

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yoneshige Azusa, Hagiya Man, Takashima Yasutoshi, Ueno Satoru, Inoue Takao, Kimura Ryuichiro, Koriyama Yoshiki, Ito Akihiko	4. 巻 9
2. 論文標題 Elevated Hydrostatic Pressure Causes Retinal Degeneration Through Upregulating Lipocalin-2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2021.664327	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 米重あづさ、上野覚、萩山満、木村竜一朗、郡山恵樹、伊藤彰彦。
2. 発表標題 レーザーマイクロダイセクション法による視神経損傷マウス網膜神経節細胞層の単離と遺伝子発現解析。
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 米重あづさ、萩山満、伊藤彰彦
2. 発表標題 水柱下培養装置を用いた高眼圧性緑内障モデルの構築
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Linking experimental pathology experts  
<https://www.ingentaconnect.com/content/sil/impact/2019/00002019/00000004/art00024>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------