

学位論文内容要旨

氏名： 浅野 大樹

題目：

網膜における神経－血管－グリア連関の破綻と再構築に関する研究

(Disruption and reorganization of the neuronal-vascular-glial interactions in the retina)

背景・目的：

網膜の恒常性は、神経細胞、血管構成細胞（内皮細胞／平滑筋／周皮細胞）及びグリア細胞（アストロサイト／ミクログリア／ミュラー細胞）が情報交換することにより維持されている（神経－血管－グリア連関）(Fig. 1)。^[1,2]例えば、網膜血管の拡張と収縮及び血液網膜関門の維持には、血管構成細胞のみならず神経細胞及びグリア細胞が関与している。^[3,4]また、糖尿病網膜症や緑内障等の網膜疾患では、神経－血管－グリア連関の破綻と病態との関連が示唆されているが、その詳細は不明である。

我々はこれまでに *N-methyl-D-aspartic acid* (NMDA) を硝子体内に投与したラットの網膜において、1) 視神経節細胞の脱落に遅れてグリア細胞が活性化し、血管が脱落すること、^[5-7]2) 神経と血管の相互依存度は幼若期（2 週齢）において強く、個体の成熟に伴い減弱することを明らかにしている (Fig. 2)。^[8]

本研究では、傷害性刺激に対してより脆弱である 1 週齢の新生仔ラットにおいて、視神経節細胞を脱落させて、その後に生じる網膜血管の変化と血管変化における神経及びグリアの意義について検討することにより、網膜における神経－血管－グリア連関の破綻と再構築の詳細を明らかにし、網膜疾患の新規予防・治療戦略の礎を構築することを目的とした。

第 1 章では、新生仔ラットの硝子体内に NMDA を投与することにより視神経節細胞を脱落させた後に、網膜血管が脱落し、再形成される過程について検討した。そして、第 2 章及び第 3 章では網膜血管の脱落及び血管形成の機序について、それぞれ検討した。

第 1 章 新生仔ラットの硝子体内に NMDA を投与した後に生じる網膜血管の変化

ラットの網膜において、神経と血管の相互依存度は、個体の成熟に伴い減弱する。^[8]従って、網膜における神経－血管－グリア連関の研究において、神経細

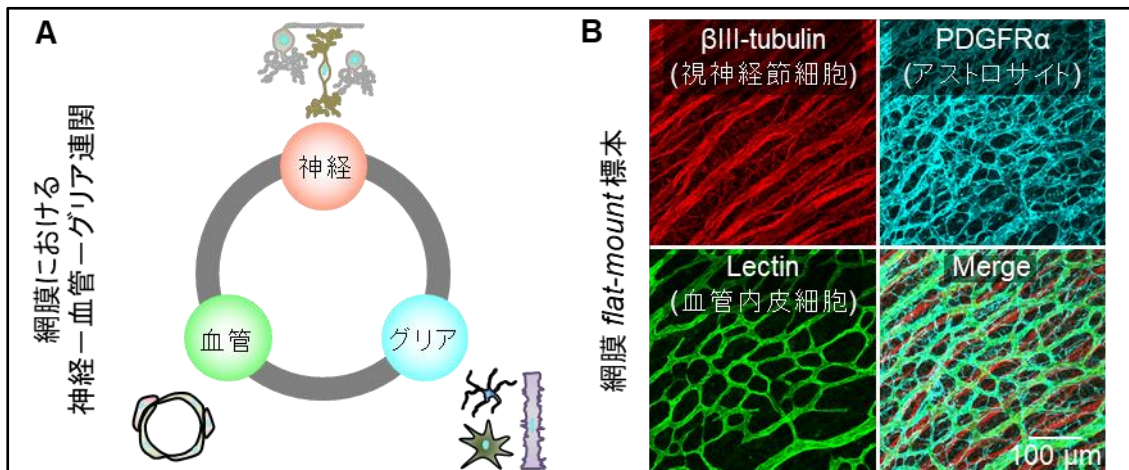


Fig. 1 網膜における神経-血管-グリア連関

網膜における神経-血管-グリア連関の概略図 (A) 及びラットの網膜表層における神経細胞 (視神経節細胞)、血管 (血管内皮細胞)、及びグリア細胞 (アストロサイト) の分布 (B)。

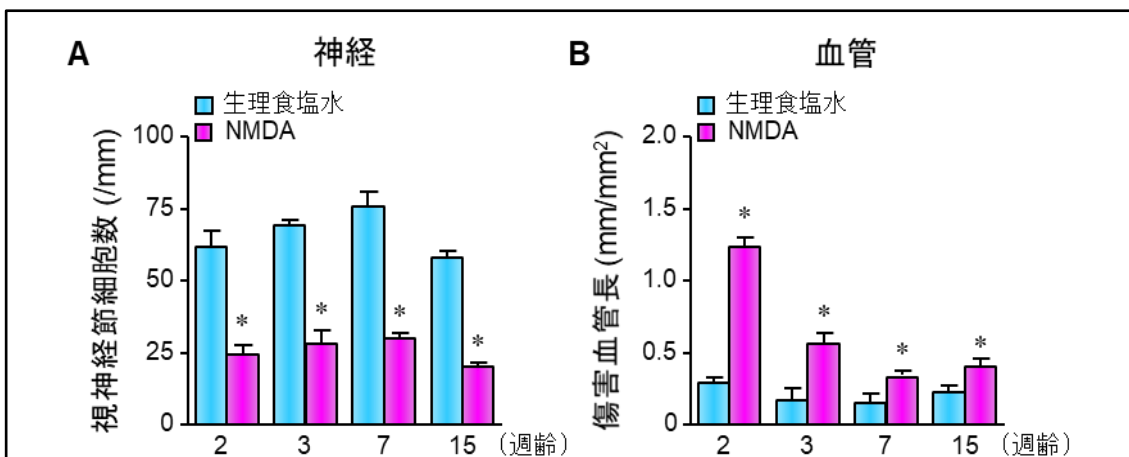


Fig. 2 網膜神経脱落后に生じる網膜血管傷害とラットの成熟度の関係

ラット (2 週齢～15 週齢) の硝子体内に NMDA を投与した 7 日後の網膜における、視神経節細胞の数 (A) 及び傷害血管の総長 (B)。NMDA による視神経節細胞の脱落にはラットの成熟度の影響が認められなかったものの、血管傷害の程度は成熟に伴い減少した。* $p < 0.05$ vs. 生理食塩水投与群

胞、血管構成細胞及びグリア細胞が相互に強く依存している新生仔期ラットを用いることが有用であると考えられた。そこで、本章では新生仔ラットにおいて網膜神経が脱落した後に生じる血管の変化の過程について検討した。

まず、NMDA を 1 週齢 (7 日齢) のラットの硝子体内に投与した後に生じる網膜組織構造の変化について検討した。その結果、NMDA 投与 2 日後で著しい

視神経節細胞の脱落及び内網状層 (IPL) と内顆粒層 (INL) の菲薄化が生じ、それ以降、ほぼ同様の組織構造を示すことが明らかになった (Fig. 3)。

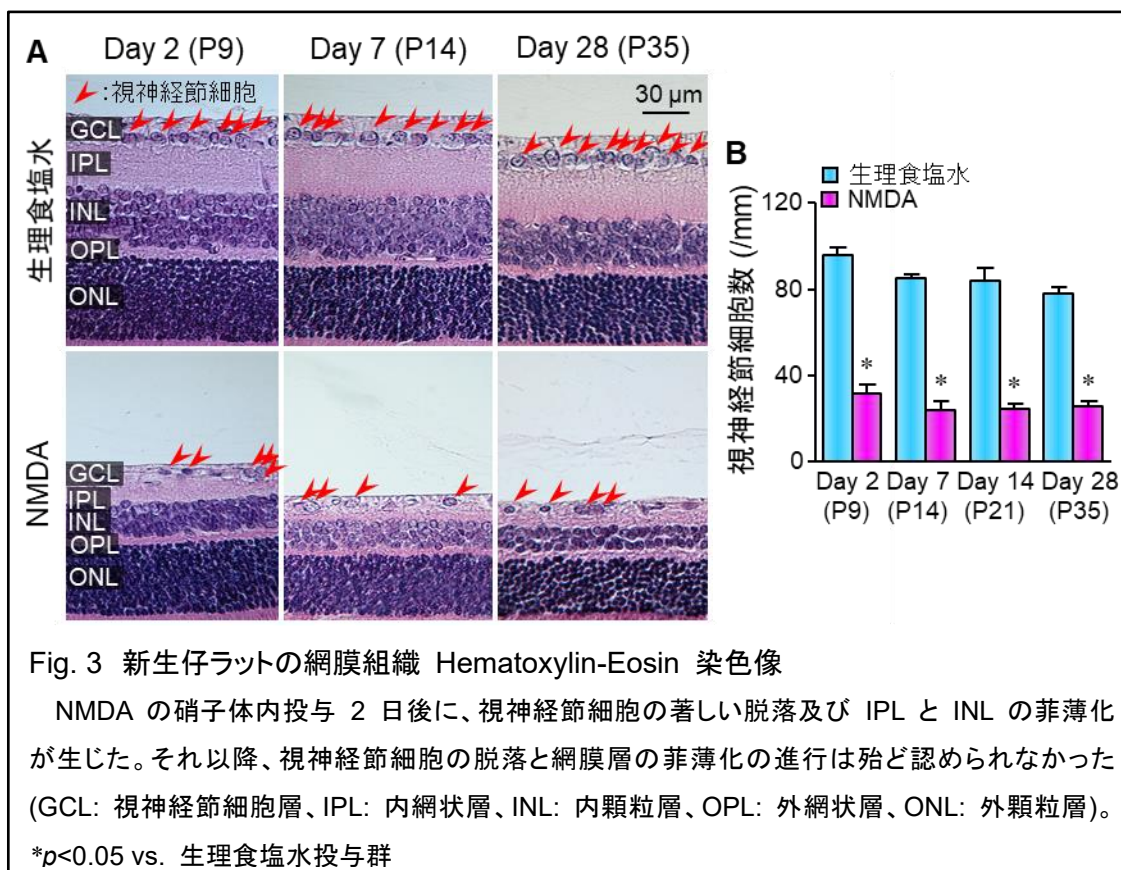


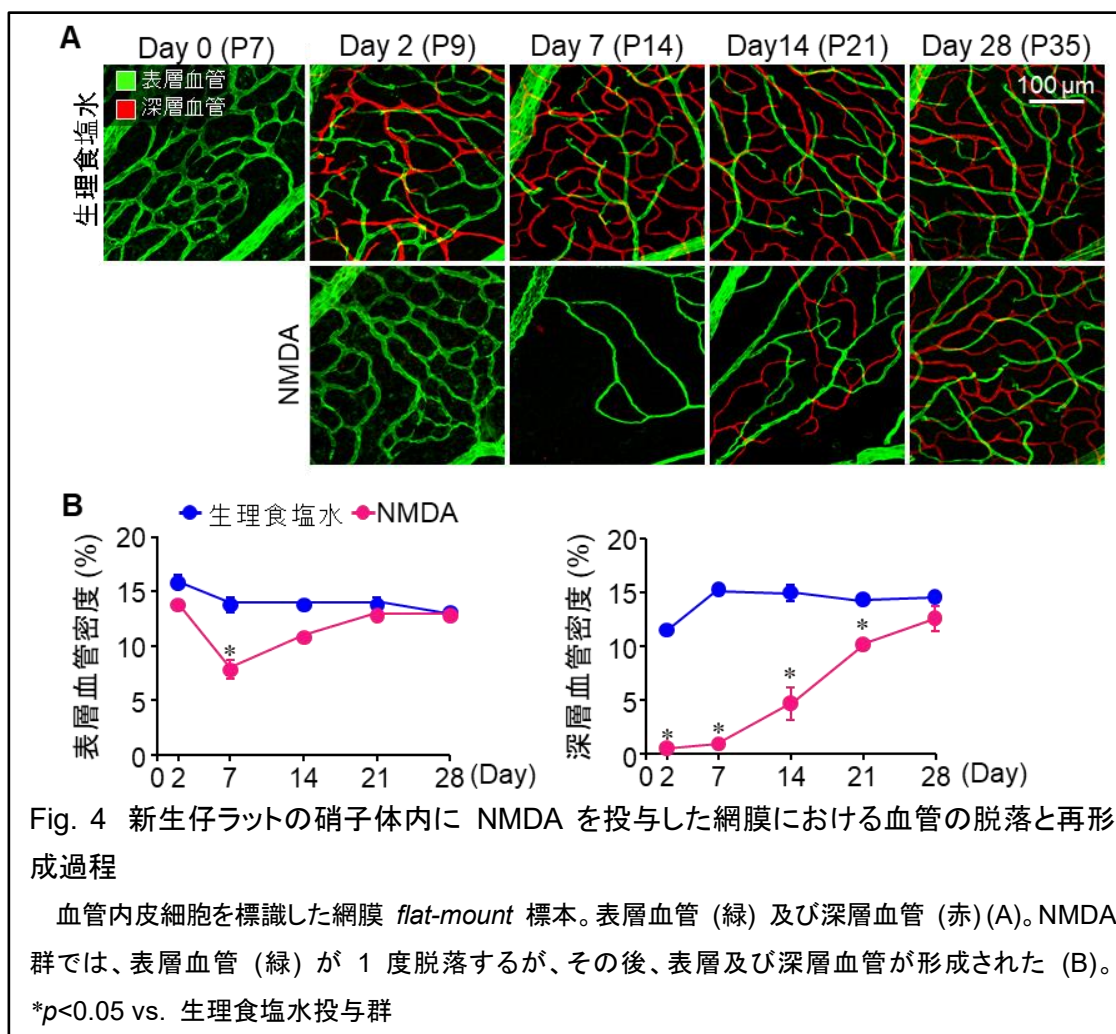
Fig. 3 新生仔ラットの網膜組織 Hematoxylin-Eosin 染色像

NMDA の硝子体内投与 2 日後に、視神経節細胞の著しい脱落及び IPL と INL の菲薄化が生じた。それ以降、視神経節細胞の脱落と網膜層の菲薄化の進行は殆ど認められなかった (GCL: 視神経節細胞層、IPL: 内網状層、INL: 内顆粒層、OPL: 外網状層、ONL: 外顆粒層)。

*p<0.05 vs. 生理食塩水投与群

次に網膜血管の変化について検討した。対照である生理食塩水を硝子体内に投与したラットの網膜では、まず表層血管網が、次いで深層血管網が形成された。そして投与 14 日後には 2 層からなる網膜血管網が完成した (Fig. 4)。一方、NMDA を投与したラットの網膜においては、深層血管の形成が抑制された後、表層部の毛細血管が脱落したが、その後に表層と深層の血管新生が生じ始めた。そして投与 28 日後には正常と同様な網膜血管網が形成された (Fig. 4)。^[9,10]

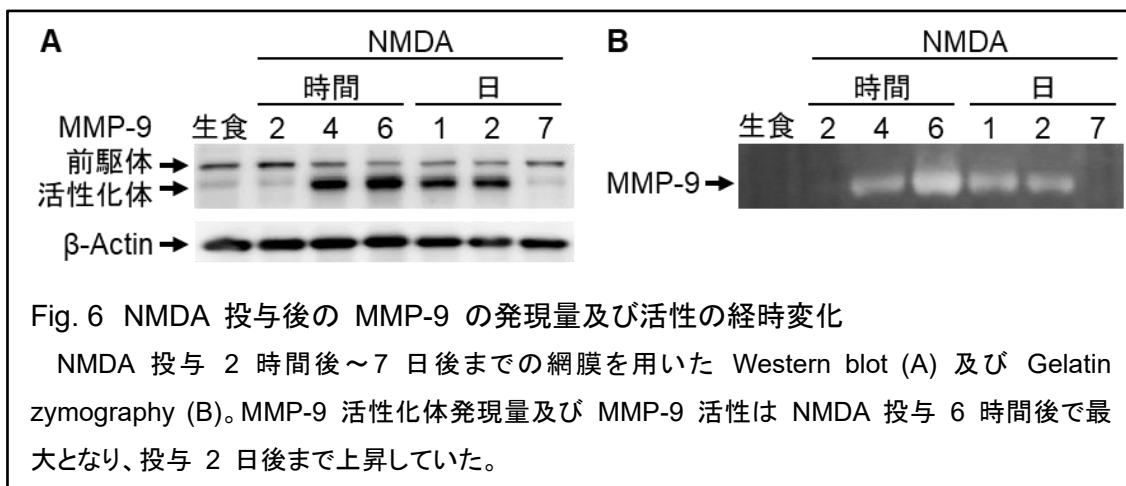
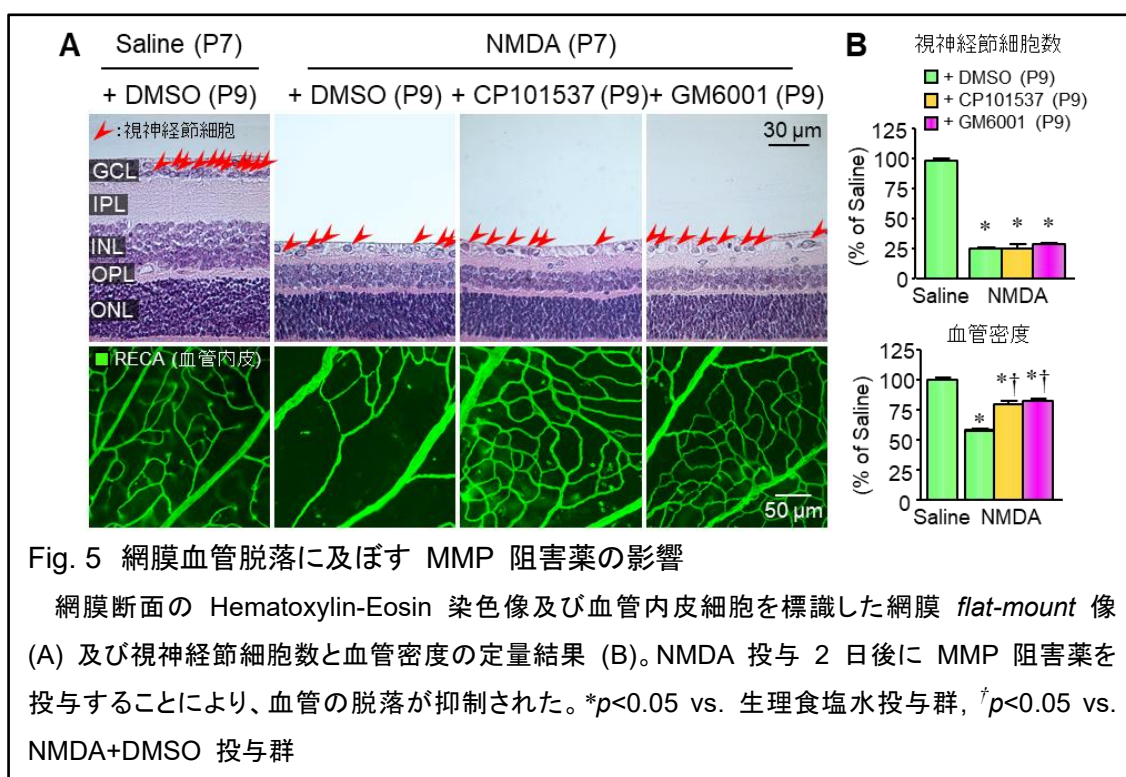
以上の結果から、新生仔ラット網膜において、視神経節細胞は 1 度脱落すると再生されないものの、血管は 1 度脱落した後に再び形成され、最終的には正常と同様な血管網が形成されることが明らかとなった。視神経節細胞は網膜血管形成において重要な役割を演じているが、著しく傷害されると、別の細胞がその役割を補完し血管形成を促す可能性が考えられた。また、新生仔ラットの硝子体内に NMDA を投与することにより、網膜血管において生じる脱落と再形成の両過程を系統的に検討できることが示された。



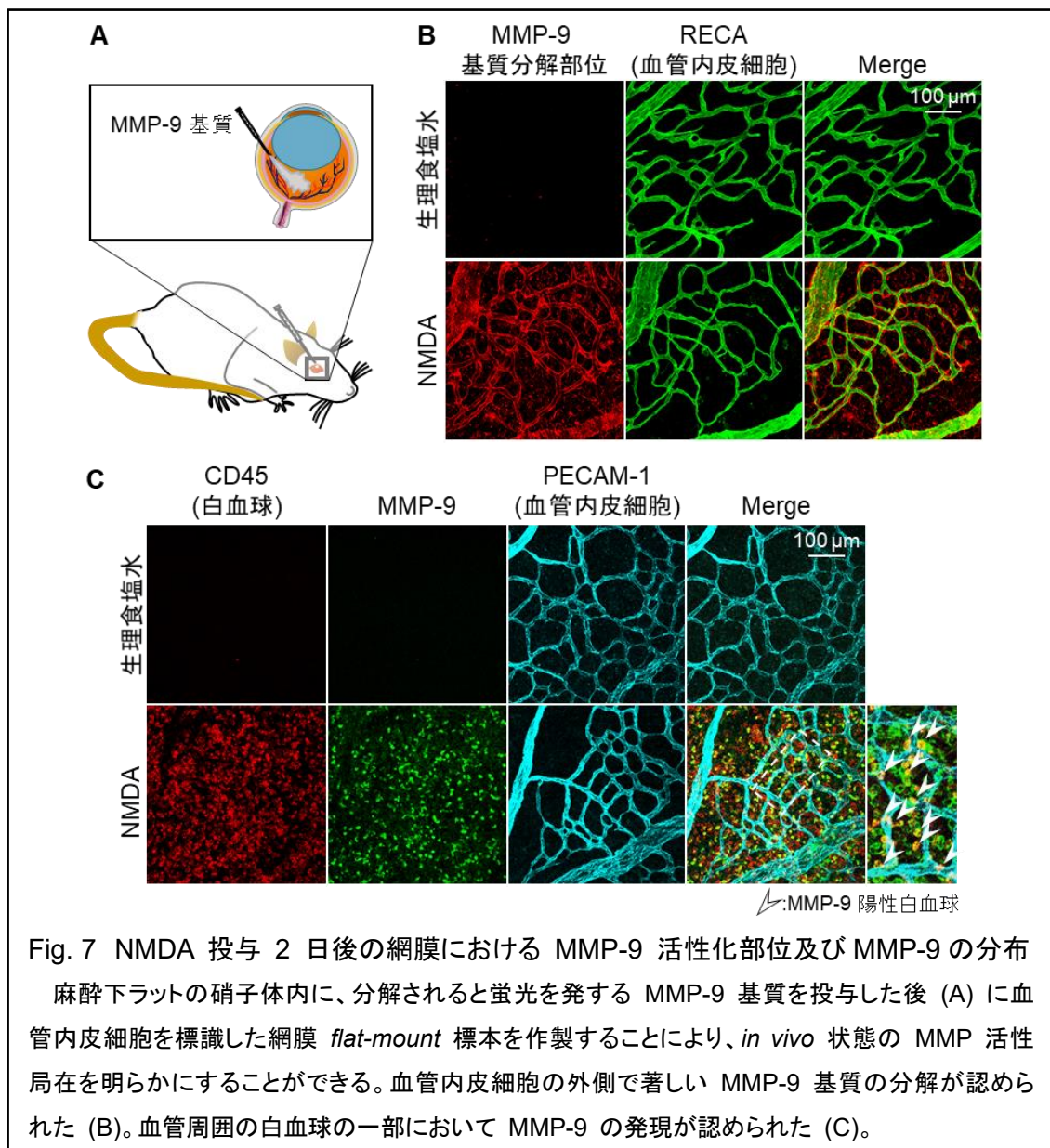
第 2 章 新生仔ラットの硝子体内に NMDA を投与した後に生じる網膜血管脱落の機序解析

第 1 章の結果より、NMDA を投与した新生仔ラットの網膜において、投与 2 日後から視神経節細胞が脱落し、7 日後から毛細血管が脱落することが示された。これまでに網膜傷害時には視神経節細胞やグリア細胞において様々な因子が過剰に産生されることにより、神経細胞死の進行を促進することが明らかにされている。^[12-14]しかしながら、それらの神経細胞・グリア細胞由来因子の中で血管傷害を招く因子については明らかにされていない。本章では matrix metalloproteinase (MMP) に着目した。MMP は現在 28 種類のアイソフォームが知られており、網膜においては MMP-9 が豊富に存在している。MMP-9 は発達期において血管新生に関与しているものの、糖尿病網膜症等の網膜疾患においては、MMP-9 が過剰に活性化されることにより血管傷害に寄与している。そこで本章では、NMDA を硝子体内投与した新生仔ラットの網膜で生じる血管脱落における MMP-9 の意義について検討することとした。

第 1 章の結果に基づき、視神経節細胞の脱落后、未だ血管に傷害が及んでいない NMDA 投与 2 日後に、MMP 阻害薬である CP101537 (100 nmol) 又は GM6001 (25 nmol) を硝子体内投与し、血管傷害における MMP-9 の役割について検討したところ、両 MMP 阻害薬は毛細血管の脱落を顕著に抑制することが示された (Fig. 5)。一方、既に脱落している視神経節細胞に対して、MMP 阻害薬は影響を及ぼさなかった。次に、網膜における、MMP-9 のタンパク質量及び活性の経時変化について、それぞれ Western blot 法及び Gelatin zymography 法によって検討したところ、いずれも NMDA 投与後速やかに上昇し、投与 2 日後まで上昇していることが明らかになった (Fig. 6)。更に *in vivo* 状態の網膜組



織中 MMP-9 活性局在を明らかにするために *in situ* zymography 法を確立し、検討したところ (Fig. 7A)、血管内皮細胞の外側で MMP-9 による基質分解が生じることが示された (Fig. 7B)。^[15] また免疫組織化学的な検討により、血管内外に集積している白血球の多くが MMP-9 を発現しており、MMP-9 の産生細胞として血管傷害に関与している可能性が示された。以上の結果より、網膜神経が傷害された後に血管内から網膜実質へ浸潤した白血球から産生・遊離した MMP-9 が、網膜血管の MMP-9 基質の分解を亢進して血管の脱落に関与している可能性が考えられた。

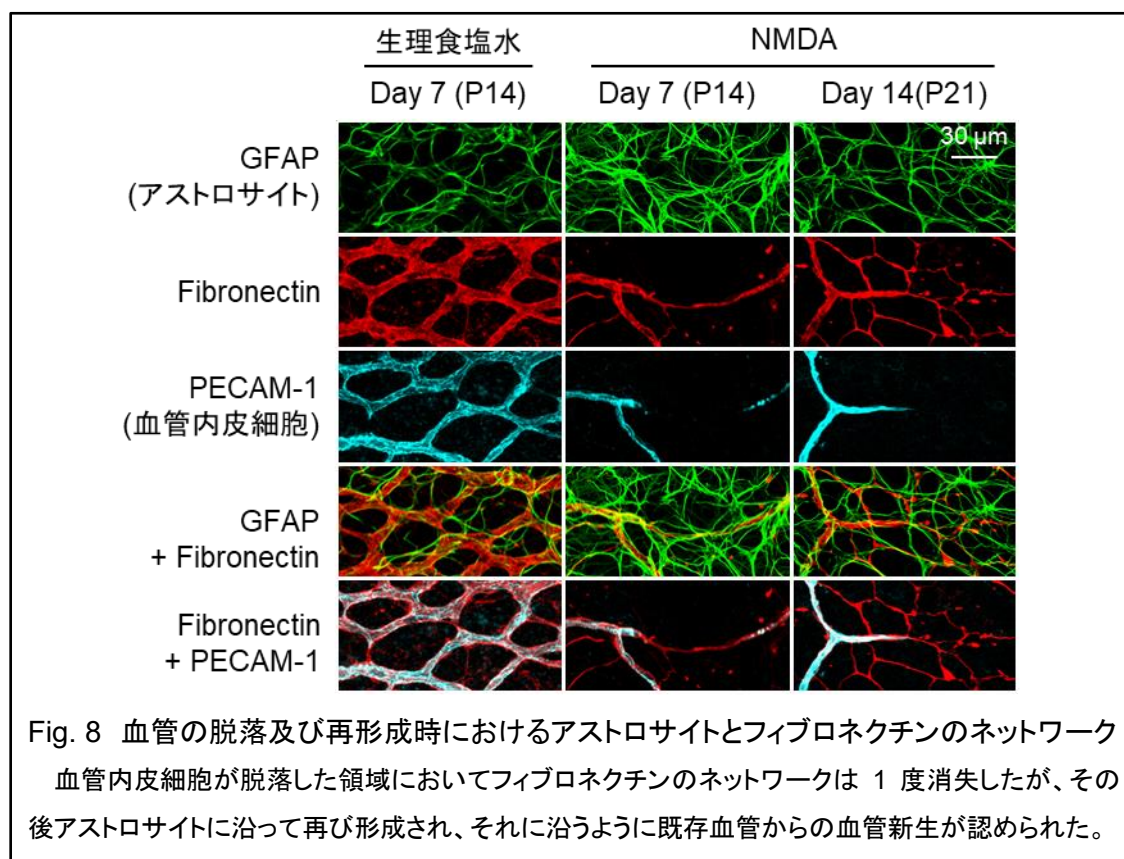


第 3 章 新生仔ラットの硝子体内に NMDA を投与した後に生じる網膜血管形成の機序解析

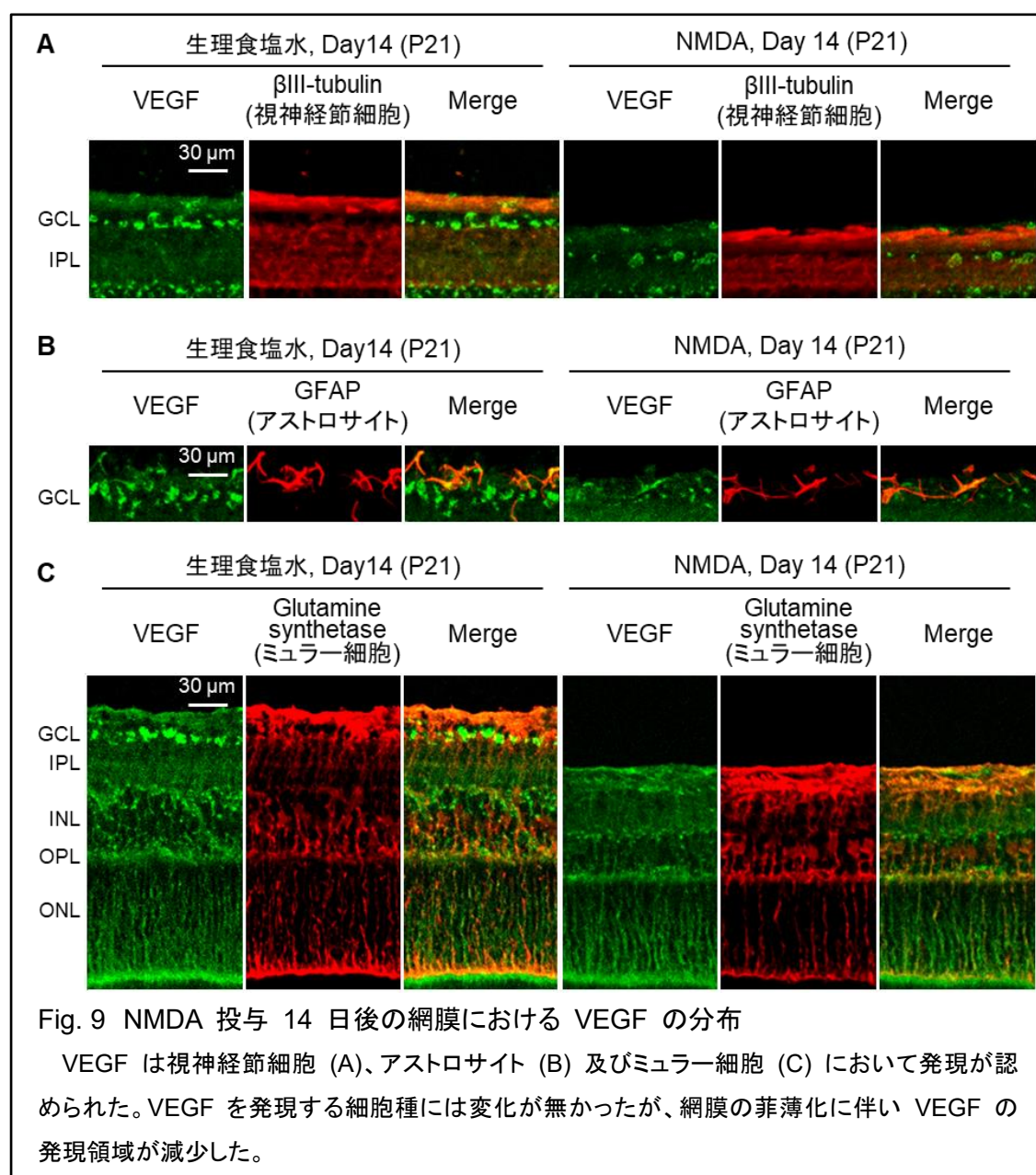
第 1 章での検討により、網膜において神経細胞が脱落した後に生じる血管脱落には MMP-9 の活性化が関与していることが明らかになった。しかしながら 1 度脱落した血管が再び形成される機序は不明である。

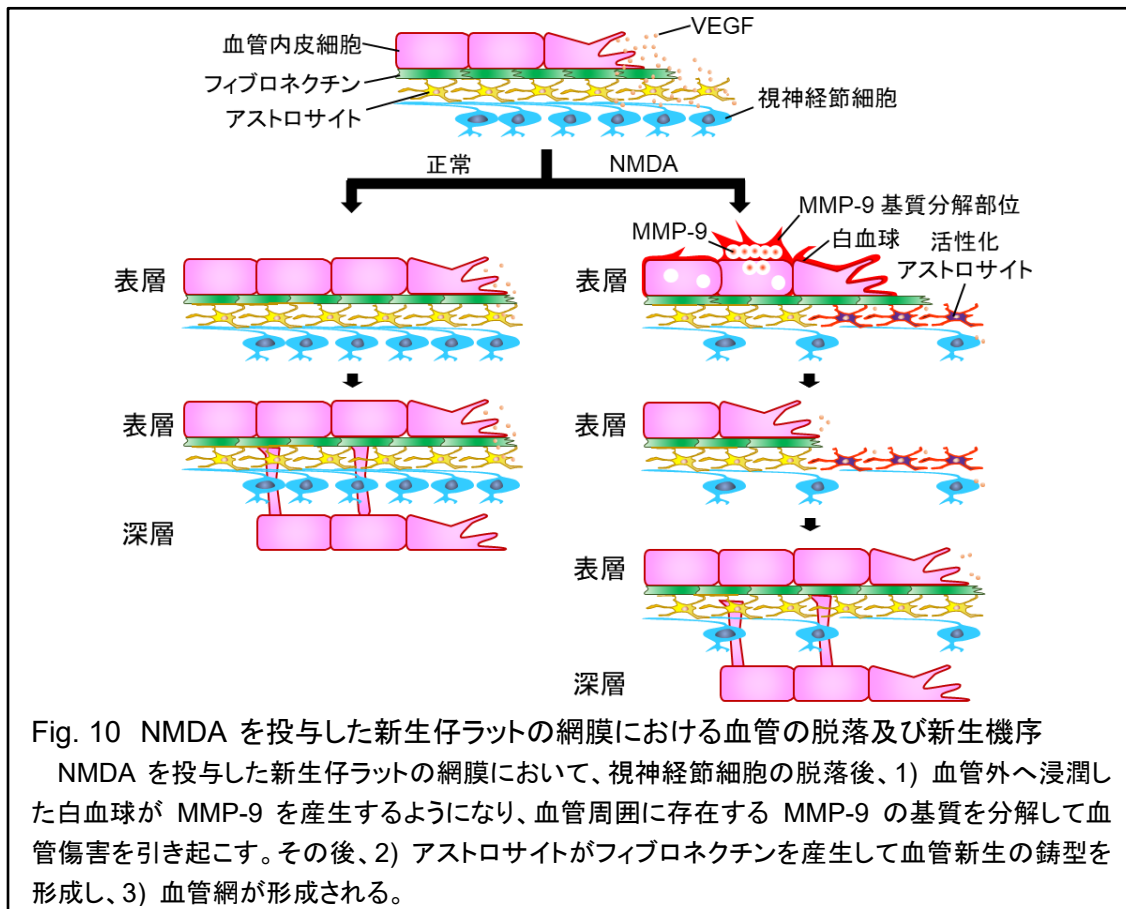
網膜の正常な血管網形成過程では、血管内皮細胞はグリア細胞の 1 種であるアストロサイトが産生するフィブロネクチンのネットワークを鋳型として遊走する。^[16-18]フィブロネクチンは管腔が形成された後は血管基底膜の構成成分として血管の安定化に関与する。そこで本章では、NMDA を投与した新生仔ラットの網膜において、視神経節細胞が脱落した後に生じる血管形成におけるアストロサイトを含むグリア細胞の役割について検討した。

その結果、NMDA を硝子体内投与した新生仔ラットの網膜では、1) アストロサイトが活性化すること、2) 血管内皮細胞が脱落すると速やかに血管基底膜の成分として存在していたフィブロネクチンが消失すること、3) その後、アストロサイトがフィブロネクチンを産生し、網膜実質にアストロサイトのネットワークに沿ったフィブロネクチンネットワークを形成し、それを鋳型として既存血管から血管が伸長することが示された (Fig. 8)。



Vascular endothelial growth factor (VEGF) は血管新生に寄与し、網膜において視神経節細胞及びグリア細胞であるアストロサイト並びにミュラー細胞において発現している。血管再形成過程における VEGF の意義を明らかにするため、網膜血管が再び形成され始める NMDA 投与 14 日後に VEGF 受容体チロシンキナーゼ阻害薬 KRN633 (10 mg/kg) を 2 日間、背部皮下に投与したところ、ほぼ完全に血管新生は抑制されることが示された。^[10]NMDA による網膜の菲薄化により、VEGF の発現領域の減少が認められたものの、VEGF を発現する細胞種には変化は生じていなかった (Fig. 9)。^[10]以上の結果から、NMDA を硝子体内に投与した新生仔ラットの網膜において、グリア細胞が脱落した視神経節細胞の役割を補完し、血管形成を促すものと考えられた。





総括

私は、第 1 章において、新生仔ラットの視神経節細胞を脱落させると網膜血管は 1 度脱落するものの、その後に再び形成されること、第 2 章において、網膜内の MMP-9 の活性上昇が血管の脱落を招くこと、第 3 章において、神経細胞が著しく脱落した際にはグリア細胞がその役割を補完して網膜血管網の構築に参与することを明らかにした (Fig. 10)。これらのことは、網膜において、神経細胞が傷害されて神経－血管連関が破綻すると 1 時的に血管に対して悪影響が及ぶものの、グリア細胞がグリア－血管連関を構築して血管新生に参与することによって、恒常性を維持するように働くことを示唆している。

網膜血管の閉塞と脱落及び虚血により新生する病的血管は、多くの網膜疾患の病態と関連している。従って、本研究で用いた実験モデルは、網膜神経変性時の血管傷害と血管新生を系統的に解析することができ、新規網膜血管傷害／新生モデルとして、網膜疾患研究において有用であると期待される。

謝辞

KRN633 を合成してくださいました本学薬学部薬品製造化学教室 長光亨先生及び有馬志保先生に厚く御礼申し上げます。また本研究の 1 部は、日本学術振興会から、科研費 (18H06130, 19K21246, 20K16122) の助成を受けて行いました。

参考文献

- [1] Nakahara *et al.*, 2013. *J. Pharmacol. Sci.* 2013, 123, 79–84.
- [2] Newman *et al.*, 2015. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 370(1672): 20140195.
- [3] Someya *et al.*, 2019. *Int. J. Mol. Sci.* 20(8), 1952. [研究業績 (1)-3]
- [4] Someya, Mori, Asano *et al.*, 2018. *Curr Eye Res.* 43(3):350-356. [研究業績 (1)-5]
- [5] Hayashi, Aoki, Asano *et al.*, 2015. *Biol Pharm Bull.* 38(11):1765-71. [研究業績 (1)-6]
- [6] Aoki, Nakahara, Asano *et al.*, 2015. *Biol Pharm Bull.* 38(2):321-4. [研究業績 (1)-8]
- [7] Hayashi, Aoki, Ushikubo, Asano *et al.*, 2016. *Fundam Clin Pharmacol.* 30(6):529-536. [研究業績 (1)-7]
- [8] Asami, Nakahara, Asano *et al.*, 2015. *Curr Eye Res.* 40(5):549-53. [研究業績 (1)-10]
- [9] Asano *et al.*, 2015. *J Neurosci Res.* 93(2): 380-390. [研究業績 (1)-9]
- [10] Asano *et al.*, 2019. *Int. J. Mol. Sci.* 20(19), 4759. [研究業績 (1)-1]
- [11] Nakano, Asano *et al.*, 2018. *Exp Eye Res.* 168:115-127. [研究業績 (1)-4]
- [12] Zhang *et al.*, 2004. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 45(7): 2374-2383.
- [13] Manabe *et al.*, 2005. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 46(12):4747-4753.
- [14] Miyata *et al.*, 2012. *Curr Eye Res.* 37(9):842-849.
- [15] Asano *et al.*, 2019. *Exp Eye Res.* 2019; 182: 101-108. [研究業績 (1)-2]
- [16] Jiang, *et al.*; 1994. *J. Cell Sci.* 107: 9, 2499–2508.
- [17] Dorrell, *et al.*, 2002. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43, 3500–3510.
- [18] Stenzel, *et al.*, 2011. *Development.* 138, 4451–4463.

研究業績

(1) 学術論文

【原著論文】

- ①. Asano D, Hokazono M, Hirano S, Morita A, Nakahara T. Cellular mechanisms of angiogenesis in neonatal rat models of retinal neurodegeneration. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20(19), 4759. [IF = 4.56]
- ②. Asano D, Morita A, Mori A, Sakamoto K, Ishii K, Nakahara T. Involvement of matrix metalloproteinases in capillary degeneration following NMDA-induced neurotoxicity in the neonatal rat retina. *Exp Eye Res.* 2019; 182: 101-108. [IF = 3.15]
3. Someya E, Akagawa M, Mori A, Morita A, Yui N, Asano D, Sakamoto K, Nakahara T. Role of neuron-glia signaling in regulation of retinal vascular tone in rats. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20(8), 1952. [IF = 4.56]
4. Nakano A, Asano D, Kondo R, Mori A, Arima S, Ushikubo H, Sakamoto K, Nagamitsu T, Ishii K, Nakahara T. Retinal neuronal cell loss prevents abnormal retinal vascular growth in a rat model of retinopathy of prematurity. *Exp Eye Res.* 2018; 168: 115-127. [IF = 3.15]
5. Someya E, Mori A, Asano D, Morita A, Sakamoto K, Nakahara T. Role of Glial Cells in μ -Opioid Receptor-Mediated Vasodilation in the Rat Retina. *Curr Eye Res.* 2018;43(3):350-356. [IF = 2.12]
6. Hayashi I, Aoki Y, Ushikubo H, Asano D, Mori A, Sakamoto K, Nakahara T, Ishii K. Protective effects of PF-4708671 against *N*-methyl-D-aspartic acid -induced retinal damage in rats. *Fundam Clin Pharmacol.* 2016; 30(6):529-536. [IF = 2.75]
7. Hayashi I, Aoki Y, Asano D, Ushikubo H, Mori A, Sakamoto K, Nakahara T, Ishii K. Protective effects everolimus against *N*-methyl-D-aspartic acid-induced retinal damage in rats. *Biol Pharm Bull.* 2015;38(11):1765-1771. [IF = 1.86]
8. Aoki Y, Nakahara T, Asano D, Ushikubo H, Mori A, Sakamoto K, Ishii K. Preventive Effects of Rapamycin on Inflammation and Capillary Degeneration in a Rat Model of NMDA-Induced Retinal Injury. *Biol Pharm Bull.* 2015;38(2):321-324. [IF = 1.86]
- ⑨. Asano D, Nakahara T, Kurauchi Y, Mori A, Sakamoto K, Ishii K. Regression of retinal capillaries following NMDA-induced neurotoxicity in neonatal rat retina. *J Neurosci Res.* 2015; 93(2): 380-390. [IF = 4.70]
10. Asami Y, Nakahara T, Asano D, Kurauchi Y, Mori A, Sakamoto K, Ishii K. Age-dependent changes in the severity of capillary degeneration in rat retina following *N*-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity. *Curr Eye Res.* 2015; 40(5): 549-553. [IF = 2.12]

(その他：共著者として 4 報 全て査読有り)

○印は博士論文の基盤となる原著論文である。

(2) 学会発表

【口頭発表】

浅野大樹, 森田 茜, 森 麻美, 中原 努. ラット網膜で観察される神経グリアー血管連関の破綻における MMP の産生・活性化機序. 第39回日本眼薬理学会. 2019.9.15

浅野大樹, 森田 茜, 森 麻美, 坂本謙司, 中原 努. ラット網膜において NMDA 誘発神経障害後に観察される血管退縮に対する MMP 阻害薬の保護効果. 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2018. 2018.8.26 【優秀口頭発表賞受賞】

(その他：筆頭演者として 5 回、共同演者として 17 回)

【ポスター発表】

浅野大樹, 外園雅生, 平野奨悟, 森田 茜, 森 麻美, 中原 努. 網膜神経変性ラットにおいて生じる網膜血管新生におけるグリア細胞の役割. 第 27 回日本血管生物医学会学術集会. 2019.12.14

(その他：筆頭演者として 6 回、共同演者として 15 回)