

研究論文： 林 琢磨 18.4.3

1

研究論文

著 者： 林 琢磨^{1,3}、柳平 朋子²、高橋 康子²、村田 敏規²所 属： ¹信州大学大学院医学系研究科免疫制御学、²同大学眼科学

研究題目： **転写調節因子 NF- κ Bp50 欠損マウスで認められる視神経細胞組織の損傷
-眼の老化：正常眼圧緑内障の治療への還元-**

³Corresponding: 林 琢磨、信州大学大学院医学系研究科免疫制御学、

〒390-8621 長野県松本市旭 3-1-1 tel: 0263-37-2611 fax: 0263-37-2613

5731 文字 (本文: 要旨、はじめに、研究結果、これまでの結果、今後の研究方針、まとめ)

図 5 点 (400 字 x4)

要 旨：

水晶体から入って来た光は、網膜に存在する光受容体により捕らえられ電子情報化され視神経節細胞から視神経細胞へと伝達され最終的に脳へと情報伝達される。転写調節因子 NF- κ Bp50 の活性化は、視神経節細胞の増殖・生存に重要である知見が、我々の研究グループの研究成果により立証されている。具体的には、転写調節因子 NF- κ Bp50 欠損マウスは、ヒト正常眼圧緑内障 (NTG: normal tension glaucoma) で認められる種々の臨床所見に極めて類似した所見を呈している。これまで、これら転写調節因子 NF- κ Bp50 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ることが証明されてきた。つまり、転写調節因子 NF- κ Bp50 が、視神経節細胞での増殖・生存メカニズムに密接に関与していることは、非常にユニークな知見である。現在、林らの研究グループは、転写調節因子 NF- κ Bp50 欠損マウスを用いて、網膜の視神経細胞や視神経節細胞の増殖・生存における転写調節因子 NF- κ Bp50 の重要性について検討を行っている。本稿において、新たな研究成果を加えて NTG の新規治療法の開発に対する考察を行いたい。

はじめに：

近視や遠視ではなく、視力が落ちるような病気の原因は、主に老化と生活習慣にある。老化というのは、悪い生活習慣によるストレスが体にかかる負荷により進行する。緑内障は、老化によって起こりやすく、視神経細胞や視神経節細胞の萎縮によって生じる不可逆的な症状を呈する。視神経細胞は、束ねられて眼球の後ろにあいた穴 (視神経乳頭部) から一本のコードのように伸びて脳と繋がっている。したがって、網膜で捉えられた光の信号は、この視神経細胞を伝わって脳へと伝達されるため、視神経細胞は、目で捉えた信号を脳に伝える重要な仕事を行っている。視神経萎縮は、視神経細胞や視神経節細胞が萎縮し

て死んでいる状態にあり、視神経細胞の末期状態なので回復の見込みはない。つまり、緑内障の発症の際、患者は適切な治療を受けなければ、最終的には視力を失うことになる。正常眼圧緑内障 (NTG) は、特に日本人において発生頻度が高く、40 才以上人口の約 4% (28 人に 1 人) に認められ、高齢者に多い疾患である。現在まで、NTG の原因・発症メカニズムは明らかとされていないが、近視の患者では健常眼圧が統計上の正常眼圧よりも低い (眼圧に対する耐性が低い)、循環障害説 (神経に出血を認める症例)、免疫説などがあるが、他の成人病と同様遺伝背景にこれらの環境要因が加わって発症すると考えられている⁽¹⁻³⁾。そこで、NTG の視神経萎縮症の発症機序の解析は、同疾患に対する予防や治療法の確立へと還元するうえで重要である。

外部からのストレスに対して生体を防御するシステムは、生命維持に必須である。「その生体防御において重要な役割を担っている転写調節因子 NF- κ B や NF-AT は、脳神経細胞の増殖および記憶においてもキーマンである」ことを、デヴィット ボルチモア教授 (カリフォルニア工科大学) や利根川 進 教授 (マサチューセッツ工科大学) らの研究グループにより明らかとされている^(4,5)。さらに、「これらの転写調節因子は、視神経細胞の増殖や生存においても重要である可能性」が、我々の研究グループの遺伝子改変実験動物を用いた研究成果により明らかとされている⁽⁶⁾。高齢者において罹患率が高い NTG は、これらの転写調節因子の活性化に関与する環境が老化に伴って徐々に変化するために発症するかもしれない。林らの研究グループは、転写調節因子の活性化と視神経細胞の成長・萎縮の関連性を種々の遺伝子改変動物を用いて固体レベルで解明していくことを目的としている。

研究結果：

我々の研究グループのこれまでの研究成果では、転写調節因子 NF- κ Bp50 の非活性化依存的に、網膜での視神経節細胞 (Retina Ganglion cells = RGCs) の増殖・生存の異常が確認されている⁽⁶⁾。図 1 で認められる様に、月齢 5 ヶ月以降の NF- κ Bp50 欠損マウスの網膜での RGCs がアポトーシスによって死滅する。RGCs のアポトーシスが生じるには、以下の 2 つの理由が考えられる。1、NF- κ Bp50 欠損マウスの網膜では、乳幼児期 (3 週齢) までに RGCs の分化・増殖が正常に行われていない。2、同欠損マウスでは、乳幼児期 (3 週齢) までに RGCs の分化・増殖が正常に行われているが、水晶体から入る光り (紫外線を含む) 等がストレスとなり、NF- κ Bp50 欠損のため RGCs がアポトーシスが誘導される。上記の仮説を立証するため、種々の週齢・月齢の NF- κ Bp50 欠損マウスを用いて、RGCs の増殖・死滅機構を組織学的、分子生物学的に検討を行った。NF- κ Bp50 欠損マウスの網膜の構造や形態異常について正常マウスの網膜と比較検討したところ、NF- κ Bp50 欠損マウスの網膜の IPL、INL、ONL において、構造や形態学的な異常は認められなかった。つまり、月齢 5 ヶ月以降の NF- κ Bp50 欠損マウスにおいて、視神経節細胞層 (GCL) の RGCs のみが顕著に減少していることが認められた。つまり、月齢依存的に NF- κ Bp50 欠損マウスの網膜の RGCs がアポトーシスにより死滅し、RGC の生存細胞が顕著に減少することが明らかとされた⁽⁶⁾。そこで、RGC のアポト

ーシスの原因と考えられる眼圧を測定したところ、正常マウスも NF- κ Bp50 欠損マウスも月齢依存的に眼圧の変化は認められなかった(図 2)⁽⁶⁾。

NF- κ Bp50 欠損マウスの網膜の RGCs がアポトーシスにより死滅するため、ヒトの NTG において認められる視神経細胞の萎縮や視神経乳頭陥没が認められるか検討した。正常マウスと比較検討した結果、月齢 5 ヶ月のマウスの網膜では認められなかった視神経乳頭陥没が、月齢 10 ヶ月の NF- κ Bp50 欠損マウスの網膜において顕著に認められた(図 3)^(6,7)。

さらに、NF- κ Bp50 欠損マウスの網膜において、視神経乳頭部を通り脳へと繋がっている視神経細胞の著しい萎縮や膨潤が認められた(図 3)⁽⁶⁾。また、視神経細胞の著しい萎縮や膨潤は、視神経繊維の全体に認められ、局在的に存在してなかった。つまり、視神経細胞の著しい萎縮や膨潤は高眼圧による物理的な刺激により生じたのでは無いことを示している。

ヒト NTG においては、死滅した RGCs の残骸を貪食するためにアストロサイトが活性化される⁽⁸⁾。NF- κ Bp50 欠損マウスの網膜でのグリア細胞(アストロサイトやミューラー細胞)の活性化を同細胞の活性化マーカー:GFAP の陽性化を指標として検討した。貪食細胞として活性化しているグリア細胞(網膜においてアストロサイトやミューラー細胞)の活性化マーカーである GFAP の陽性細胞⁽⁹⁾が、NF- κ Bp50 欠損マウスの網膜の視神経節細胞層(GCL)と視神経繊維においてのみに有意に認められた(図 4)⁽⁶⁾。しかしながら、NF- κ Bp50 欠損マウスの網膜の INL から IPL において、GFAP の陽性細胞が認められないことから、網膜に存在するアストロサイトが、アポトーシスにより死滅した RGCs を貪食して処理するために活性化されたと思われる(図 4)。つまり、ミューラー細胞の貪食細胞としての活性化は認められなかった。NF- κ Bp50 欠損マウスの網膜における GFAP の陽性細胞の局在性は、ヒトの NTG の網膜組織において認められる GFAP の陽性細胞の局在性に類似している^(6,8,9)。

デヴィット ボルチモア教授(カリフォルニア工科大学)のグループは、NF- κ Bp50 欠損マウスは非特異的抗体を自身で産生し自己免疫様疾患を呈することを報告している。そこで、月齢 5 ヶ月以降の NF- κ Bp50 欠損マウスにおける RGCs を認識する自己抗体の生産について検討を行った。その結果、月齢 5 ヶ月以降の NF- κ Bp50 欠損マウスから得られた血清内に RGCs を認識する自己抗体の存在の可能性が確認された(図 5)。つまり、NF- κ Bp50 欠損マウスで認められる月齢依存的な RGCs の細胞死は自己抗体を起因として誘導されているかもしれない。今後、RGCs のアポトーシスの詳細な機序は検討されなければならない。

これまでの結果：

現在、臨床学的に、ヒト NTG は、①眼圧が正常値(10~21mmHg)、②視神経乳頭辺縁部狭細化および陥没、③網膜視神経線維層欠損、④篩板の変形・後方偏位、⑤視神経節細胞とグリア細胞の減少などが総合的に認める特異的な視神経病変をきたす疾患として定義されている^(1,2)。NF- κ Bp50 欠損マウスにおいて、月齢 5 ヶ月以降に RGC のアポトーシスによる死滅が認められる点がヒト NTG の中高齢者より発症する慢性疾患としての罹患率に極めて類似する。さらに、NF- κ Bp50 欠損マウスが、上記 5 つの臨床学的所見に極めて類似する症状を

呈するため、NTG を自然発症するモデル動物と思われる^(注1)。

今後の研究方針：

NF- κ Bp50 の発現低下が、ヒト NTG の発症に対するリスクファクターであるか検討することが必須である。これまでの臨床所見では、NTG の患者の多くは、前兆症状性偏頭痛を患っている⁽¹⁰⁾ため、最近では偏頭痛の治療に使う Ca 拮抗剤が、NTG に対して有効である事が判り現在臨床試験が行なわれている^(11,12)。つまり、NTG と前兆症状性偏頭痛の両疾患において共通のリスクファクターが存在している可能性を示している。既に、利根川 進 教授のグループより、前頭脳の神経細胞におけるカルシニューリンの活性化異常は、統合失調症のリスクファクターであることが報告されている⁽¹³⁾。カルシウムを介した CaMKII シグナルカスケードは、カルシニューリンと同様に NF- κ B の活性化を誘導する。Ca 拮抗剤は、NF- κ B の活性化を抑制することで正常眼圧緑内障の進行を止めていると思われる^(11,12)。2002 年に、マイジャ ウェスマン教授（米国カリフォルニア大学ロスアンゼルス校医学部）らの研究グループが、前兆症状性偏頭痛のリスクファクターの解析のため同疾患の染色体上の感受性ローカスは 4 番染色体 24(4q24)であることを報告している⁽¹⁴⁾。偶然にも、NF- κ Bp50 (MIM:164011) の遺伝子は、4 番染色体 24(4q24)にコードされている^(15,16)。つまり、NF- κ Bp50 は、ヒト NTG のリスクファクターの可能性が示唆されている。マイジャ ウェスマン教授らの研究グループが解析した前兆症状性偏頭痛 252 症例において、NTG の病歴を含む症例がどれだけ存在しているか明らかにすべく、林らの研究グループは、マイジャ ウェスマン教授らの研究グループに問い合わせを行っている。さらに、RGCs での NF- κ Bp50 の非活性化がヒト NTG の発症のリスクファクターであるか検討すべく、ヒト NTG の網膜組織を用いて検討を行うため米国の Dever Eye Institute との共同研究の調整を行っている。NTG は視力傷害さらには失明という極めてシリアスな疾患であるが、致命的な疾病ではないため外科的手法による眼球摘出は不適合である。したがって、残念ながら、日本国内でヒト正常眼圧緑内障の組織を解析することが不可能であり、諸外国との医療機関との提携のもと研究を行うことは必要不可欠である。

まとめ：

一般に、細胞は、アポトーシス、ネクローシスあるいはオートファジーの生物学的生命現象によって死へと移行する。NTG において認められる視神経萎縮は、視神経細胞や視神経節細胞のストレスに対する保護機能が老化により失い、その結果アポトーシスを誘発して死滅している状態と考えられる。これまで、生物の形態形成、疾患等の発症に関与する多くのアポトーシス因子が同定・解析されている。米国・マサチューセッツ工科大学の利根川 進 教授の研究協力のもと、林らの研究グループは、転写調節因子の発現異常を起因としたアポトーシスの誘発、さらには自己免疫疾患やがんの発症への関与について研究を行っており、その研究成果を論文や国際学会において報告している^(17,18)。これまでの研究

成果では、アポトーシスは、自己免疫疾患やアルツハイマーなどの難治性疾患の原因に複雑に絡んでいることが明らかとされている。特に、最近、利根川 進 教授の研究グループが、カルシニューリンのシグナル異常が、統合失調症の原因である可能性を報告している⁽¹³⁾。林らの研究グループは、アポトーシスに關与する特定の転写調節因子に注目し、その因子を欠損させた実験動物(マウス)を解析している。その結果、転写調節因子 NF- κ Bp50の欠損マウスにおいて、視神経細胞萎縮や RGC のアポトーシスによる死滅などヒト NTG の臨床所見と類似した病理学的組織所見が認められた⁽⁶⁾。特筆したい点は、その視神経節細胞死は、月齡依存的に多く認められさらに高齡になると視神経乳頭陥没が認められることで、慢性疾患であるヒト NTG の臨床所見に極めて類似している⁽⁶⁾。これまで、月齡依存的に視神経萎縮、RGCs のアポトーシスや視神経乳頭陥没が自然発症する動物モデルの報告はなく、NF- κ Bp50 欠損マウスが、慢性疾患であるヒト NTG の発症を極めて良く反映した病態モデルマウスだと思われる。これまで報告されている遺伝子改変マウス(グルタメイトトランスポーター欠損マウス⁽¹⁹⁾、 β -アミロイド発現マウス⁽²⁰⁾)において認められる NTG 様の症状は、改変されている遺伝子は異なっているが、「NMDA 受容体からのシグナルによる Ca イオン上昇を介した NF- κ B (p65/p50) の活性化シグナルカスケード因子」であるため、これらの遺伝子改変マウスにおいて認められる NTG 様の症状は、結果的には NF- κ B の活性化異常が起因して誘発されたものと考えられる。現在、ヒトの NTG の組織：RGCs において、NF- κ B (p65/p50) の活性化異常が認められるか検討を行う必要がある。現在、林らの研究グループは、米国の臓器バンクとアイバンクを基盤とした米国の医療機関との連携のもとヒトの NTG の発症における NF- κ B の活性化の關与について検討を行うべく調整を行っている。NF- κ Bp50 欠損マウスを用いた被験物質の評価方法や NF- κ Bp50 欠損マウスを用いた視神経節細胞死の発症機序の解析は、NTG を起因とした視神経萎縮・視力障害に対する予防や治療法の確立に還元される^(注1)。

参考文献

1. Osborne NN, et al. Neuroprotection in relation to retinal ischemia and relevance to glaucoma. *Surv Ophthalmol* 1999 ; **43** Suppl 1: S102-28
2. Votruba M. Molecular genetic basis of primary inherited optic neuropathies. *Eye* 2004; **18**:1126-32
3. Romano C, Barrett DA, Li Z, Pestronk A, Wax MB. Anti-rhodopsin antibodies in sera from patients with normal-pressure glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; **36**: 1968-1975
4. Mollie K. et al. NF- κ B functions in synaptic signaling and behavior, *Nature Neurosci.* 2003; **6**: 1072-1078.
5. Zeng H. et al. Forebrain-specific calcineurin knockout selectively impairs bidirectional synaptic plasticity and working/episodic-like memory. *Cell* 2001; **107**: 617-629.
6. Takahashi Y. et al. Development of spontaneous optic neuropathy in NF- κ Bp50-deficient

- mice; Requirement for NF- κ Bp50 in ganglion cell survival. *Neuropathol Appl. Neurobiol.* 2007; **33**: 692-705.
7. Wax MB, Tezel G. Neurobiology of glaucomatous optic neuropathy: diverse cellular events in neurodegeneration and neuroprotection. *Mol Neurobiol* 2002; **26**: 45-55.
8. Aschner M. Astrocytic functions and physiological reactions to injury: the potential to induce and/or exacerbate neuronal dysfunction--a forum position paper. *Neurotoxicology* 1998; **19**: 7-17.
9. Wang L. *et al.* Immunohistologic evidence for retinal glial cell changes in human glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; **43**: 1088-1094.
10. Drance SM. Some clinical implications of the collaborative normal tension glaucoma study. *Klin Oczna* 2004; **106**: 588-592.
11. Toriu N. *et al.* Lomerizin, a Ca²⁺ channel blocker, reduces glutamate-induced neurotoxicity and ischemia/reperfusion damage in rat retina. *Exp. Eye Res.* 2000; **70**: 475-484.
12. http://www.santen.co.jp/jp/ir/reports/db2007_07.pdf
13. Gerber D.J. *et al.* Evidence for association of schizophrenia with genetic variation in the 8p21.3 gene, PPP3CC, encoding the calcineurin gamma subunit. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; **100**: 8993-8998.
14. Wessman M. *et al.* A susceptibility locus for migraine with aura, on chromosome 4q24. *Am J Hum Genet.* 2002; **70**: 652-662.
15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=157300>
16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=164011>
17. Hayashii *et al.* LMP2 expression and proteasome activity in NOD mice. *Nature Med.* 2000; **6**: 1065-1066.
18. Hayashi t. Faustman DF. Development of spontaneous uterine yumors in low molecular mass polypeptide-2knockout mice. *Cancer Res.* 2002; **62**: 24-27.
19. Harada T. *et al.* The potential role of glutamate transporters in the pathogenesis of normal tension glaucoma. *J. Clin. Invest.* 2007 **117**: 1763-1770.
20. Guo L. *et al.* Targeting amyloid- β in glaucoma treatment. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; **104**: 13444-13449

注1: 国際特許出願 PTC 出願 指定国移行 JST 整理番号: S2007-0926PCT (新規) (代表: 林 琢磨)「正常眼圧緑内障モデル及びそれを用いた被験物質の評価方法」(代表発明者: 林 琢磨)

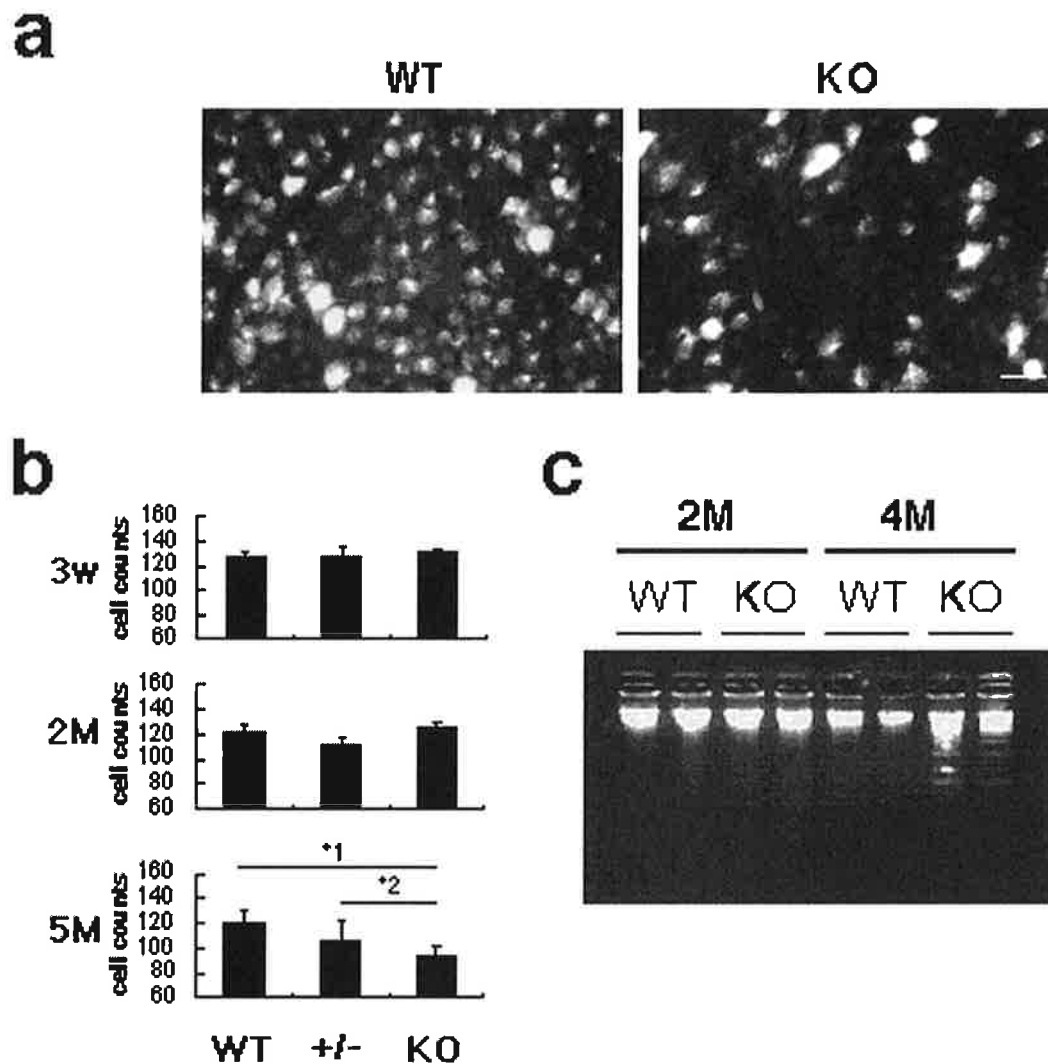


図 1、月齢 5 ヶ月以降の NF- κ Bp50 欠損マウスで認められる、アポトーシスによる視神経節細胞の死滅。a、フルオロゴールドにより特異的に視神経節細胞 (RGC) を染色し、網膜に生存する RGC を数えた結果、月齢 5 ヶ月以降の NF- κ Bp50 欠損マウスでは、RGC の生存数が、同じ月齢の野生型マウスより減少している。b、RGC の生存数は、月齢 5 ヶ月以降に認められる。c、月齢依存的に NF- κ Bp50 欠損マウスの RGCs がアポトーシスにより死滅し、RGC の生存細胞が顕著に減少する。

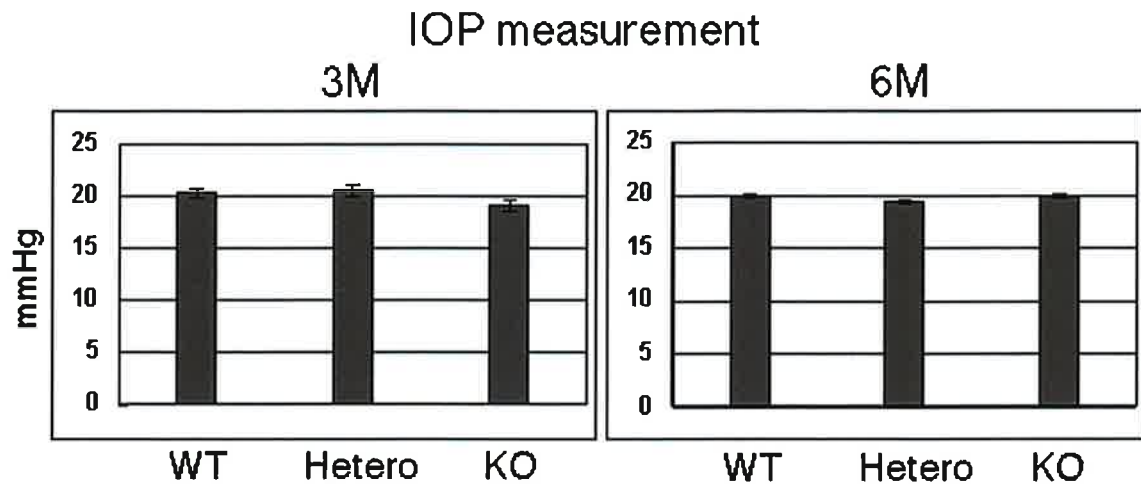


図 2、RGC のアポトーシスの原因と考えられる眼圧を測定したところ、野生型マウスも NF- κ Bp50 欠損マウスも月齢依存的に眼圧の変化は認められない。

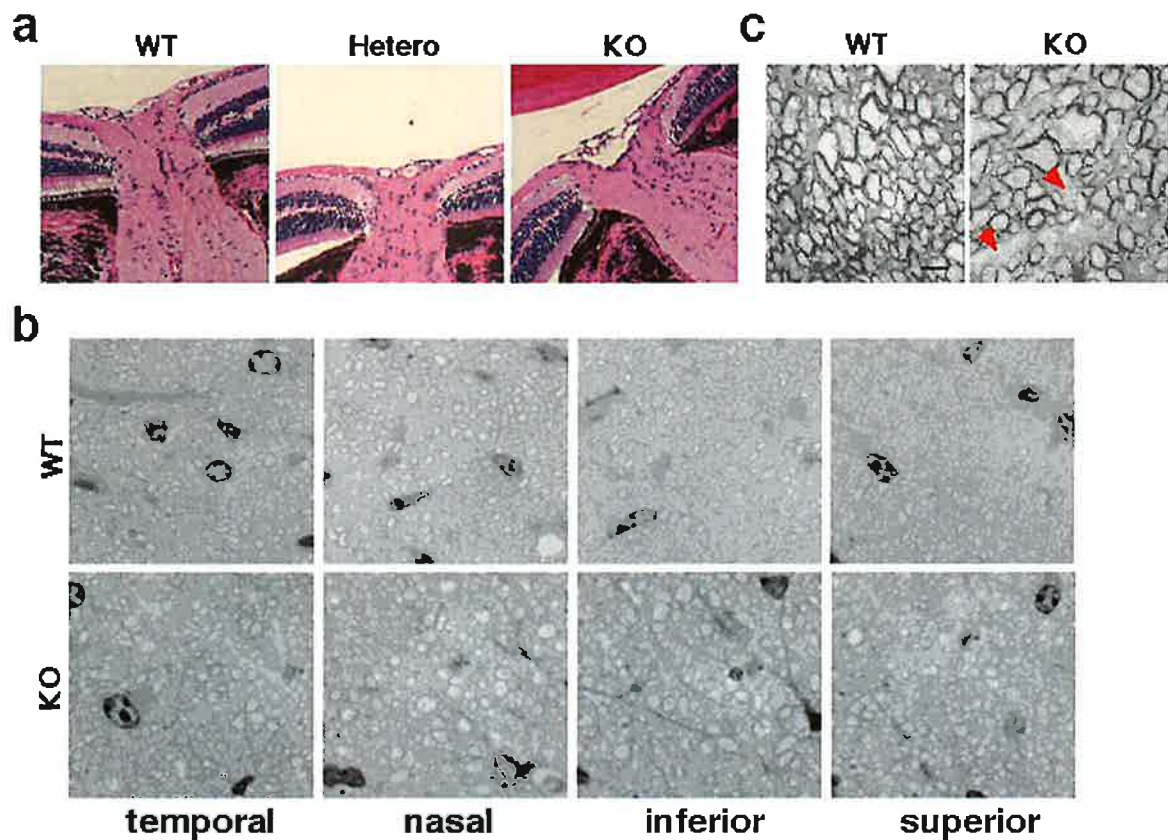


図 3、NF- κ Bp50 欠損マウスで認められる、視神経細胞の萎縮や視神経乳頭陥没。a、野生型マウスと比較検討した結果、月齢 5 ヶ月のマウスの網膜では認められなかった視神経乳頭陥没が、月齢 10 ヶ月の NF- κ Bp50 欠損マウスの網膜において顕著に認められる。b、視神経細胞の著しい萎縮や膨潤は、視神経繊維の全体に認められ局在的に存在してない。c、電子顕微鏡の写真により、視神経細胞の著しい萎縮や膨潤が認められる。

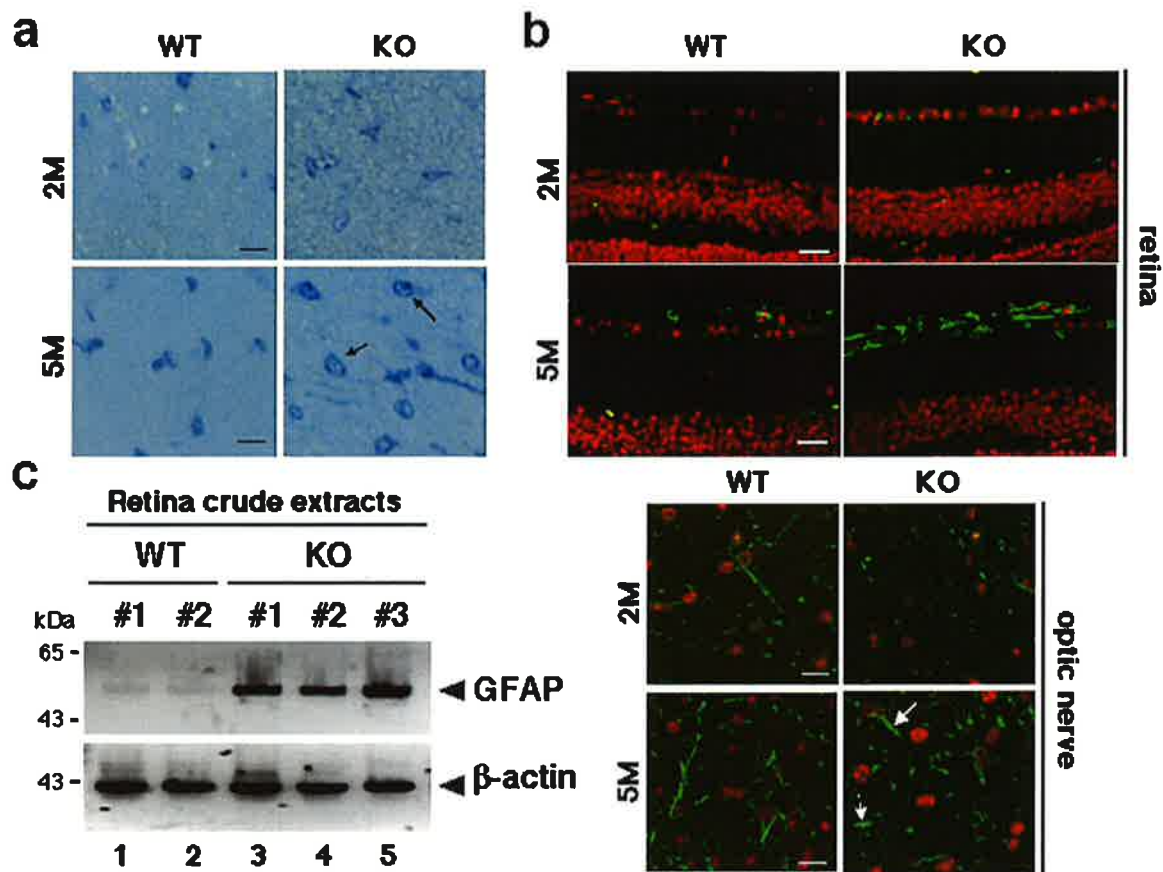


図 4、NF- κ Bp50 欠損マウスの網膜と視神経組織におけるアストロサイト活性化。a、NF- κ Bp50 欠損マウスの視神経繊維組織において、視神経細胞の著しい萎縮や膨潤が認められる。貪食細胞として活性化しているグリア細胞（網膜においてアストロサイトやミューラー細胞）の活性化マーカーである GFAP の陽性細胞が、月齢 5 ヶ月の NF- κ Bp50 欠損マウスの網膜の視神経節細胞層 (GCL) (b 上段の写真) と視神経繊維 (b 下段写真) においてのみに有意に認められる。c、NF- κ Bp50 欠損マウスの網膜組織での GFAP の著しい発現が、ウエスタンブロット法によって確認されている。

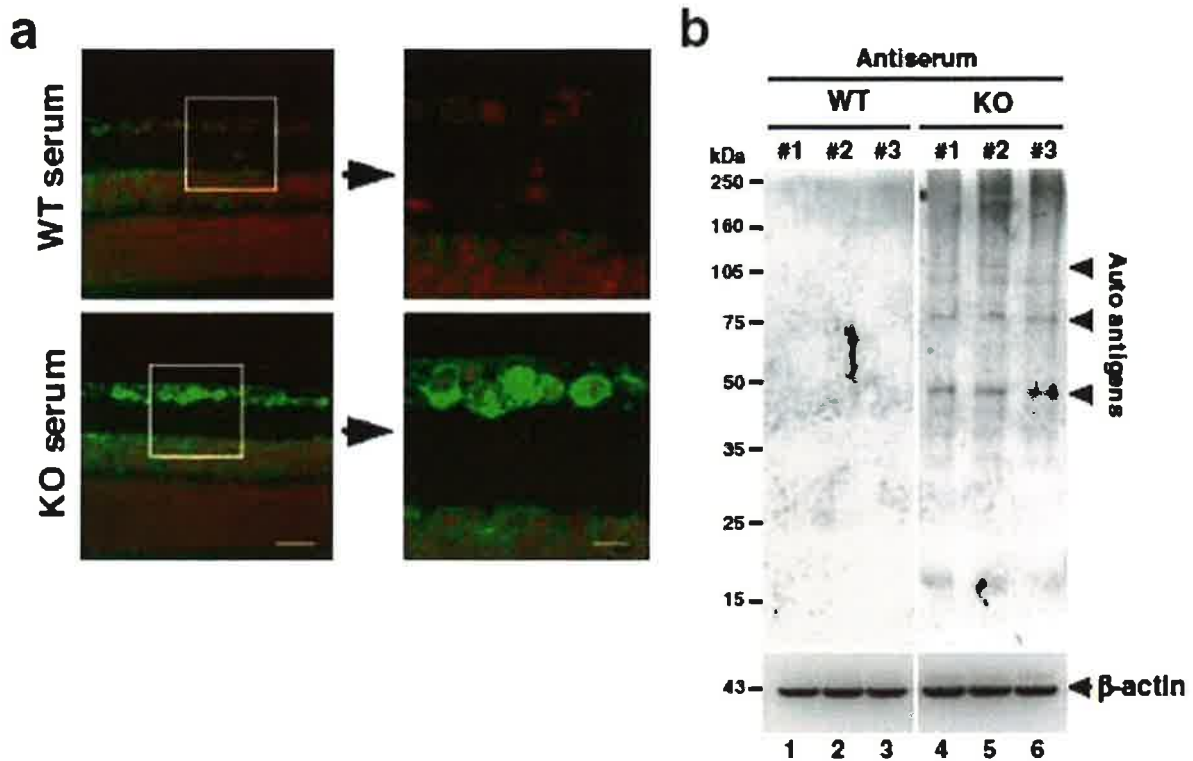


図 5、NF-κBp50 欠損マウスにおける網膜に対する自己抗体の産生。(a) 5 ヶ月齢のマウス (各 n = 4~5 匹のマウス) 由来の血清による免疫組織化学的染色は、NF-κBp50 欠損マウスにおける網膜を認識する自己抗体産生の可能性を明らかにした。NF-κBp50 欠損マウスおよび野生型 (WT) マウスの代表的な写真。左:スケールバー=25μm、右:スケールバー=10μm。(b) ウェスタンブロッティング分析は、NF-κBp50 欠損マウスにおける自己抗体の産生の可能性を示す。3 匹の WT および 3 匹の p50 欠損マウスから各血清を個別に採取し、WT マウス+血清由来の網膜粗抽出物を用いたウェスタンブロット分析を行った。KO、ノックアウト; WT、野生型。