

# 網膜神経節細胞の生存・機能制御における 視神経グリア細胞の役割に関する研究

山梨大学大学院 医学工学総合研究部 医学学域 薬理学講座  
小泉 修一

## 1. はじめに

緑内障は、網膜神経節細胞（RGC; retinal ganglion cells）が眼圧の上昇により障害され、やがては失明に至る重篤な疾患である。これまでRGC障害は眼圧亢進に依存すると考えられていたが（図1左）、眼圧が正常範囲である所謂「正常眼圧緑内障」が緑内障患者の多くを占めることが明らかとなり、眼圧亢進以外の新しい病因の解明と、従来の眼圧下降以外の新規治療法開発が強く求められている。緑内障病

理像の解析から、本病態には神経突起伸展及び軸索流障害が関与していることが示唆されているが、最近、RGCの生存及び突起伸長が、視神経グリア細胞（ミュラー細胞及び視神経アストロサイト）により強く制御されていることが明らかとされ、眼疾患治療におけるグリア細胞の役割が注目されている（図1右）。そこで本研究は、

「視神経グリア細胞とRGC連関の視点から、緑内障の分子病態・治療戦略を見いだす」

ことを目的とする。また到達目標は、

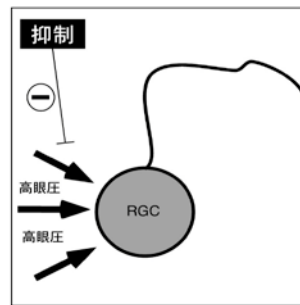
1. RGCの生存・突起伸展（軸索流障害の改善）に対するグリア細胞（ミュラー細胞・アストロサイト）の影響を明らかとする、
2. グリア細胞により放出される因子の同定と、各種因子によるRGC保護及び突起伸展制御の分子メカニズムを明らかとする、

ことである。

## 2. 方法

RGC、ミュラー細胞及び視神経アストロサイトの初代培養は、既報に従った<sup>1)</sup>。アストロサイトまたはミュラー細胞は、ミリセルの半透膜上に播種、またRGCは24ウェルプレートに播種し、その翌日にRGC上にグリア細胞を播種したミリセルをのせて、両細胞の接触が無い条件下で共培養を行った。グリア細胞の生存率はフローサイトメトリー法により、また突起伸長の測定は、顕微鏡下で任意の視野の細胞写真を複数枚取得し、画像解析ソフトImage Jを用いて突起長をマニュアルで測定した。

これまでの戦略



新しい戦略

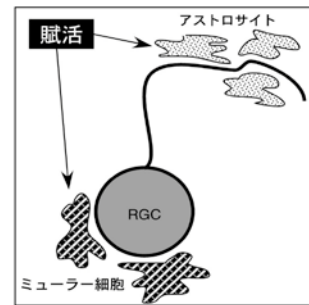


図1 緑内障治療戦略

左：これまで。眼圧低下が主な戦略。

右：新規戦略。RGC周囲のグリア細胞機能制御。

### 3. 結果 研究成果

#### (1) グリア細胞によるRGC生存維持及び突起伸長作用

グリア細胞が混在すると、NO誘発性のRGC細胞死・障害が顕著に保護されることを、グリア+RGC共培養系を用いて明らかとした。RGCの単独培養では、SNAPは5~50  $\mu$  Mの濃度で、濃度依存的にRGCの生存率を低下させた。グリア細胞が共存下では、SNAP(20  $\mu$  M)により惹起される細胞死は抑制され、抑制率はそれぞれ20.5 $\pm$ 5.2 % of RGC alone(アストロサイト)及び18.8 $\pm$ 1.7 of % of RGC alone(ミューラー細胞)であった。また、グリア細胞はSNAP (10  $\mu$  M)刺激下で、RGCの突起伸長に対する亢進作用も有し、その伸長増加率はアストロサイト及びミューラー細胞共存下でそれぞれ1012.4 $\pm$ 19.3及び803.4 $\pm$ 45.2 % of RGC aloneであった。特に作用が顕著であったアストロサイトのRGC突起伸長作用に注目して、以下の研究を進めた。

#### (2) アストロサイトのATP放出と突起伸長メカニズム

脳及び脊髄アストロサイトは、各種刺激に応じてATPを放出することにより、グリア自身及び周辺神経細胞及び血流量をコントロールしている。そこで、視神経アストロサイトがATPを放出するか否かを検討した。図2で示すように、SNAP(10  $\mu$  M)は基礎遊離量の約10倍のATP放出を惹起した。非選択的なATP受容体(P2受容体) suramin (30  $\mu$  M) 存在下では、SNAPによる突起伸長は、約60%抑制されたことから、アストロサイトのATPがRGCの突起伸長に重要な役割を果たしていることが示唆された。

アストロサイト及びRGCは共に各種P2受容体を発現している<sup>2)</sup>。従って、放出されたATPが(i)直接RGCに作用する、(ii)アストロサイトに作用して各種RGC伸長因子を産生・放出することにより伸長作用を呈する、の2つの可能性が考えられる。そこで先ず、RGCを単独培養し各種P2受容体agonistsを添加してRGC伸長作用を検討した。ATP(1-100  $\mu$  M)及びUTP(1-100  $\mu$  M)添加により、RGCは突起伸長作用を呈したが、その程度は小さく、ATP(100  $\mu$  M)で22.5 $\pm$ 4.4 % of ATP-free, UTP(100  $\mu$  M)で31.4 $\pm$ 6.1 % of UTP freeであった。各種P2受容体単独の添加により、RGCの突起伸長作用が抑制されたことから、その作用は20%程度であった。従って、恒常的にRGCから放出されるATPがオートクライン様作用によりRGCの突起伸長にも関係している可能性が示唆された。しかし、何れにしてもATP/P2受容体シグナルがRGCの突起伸長に果たす役割は小さいことが明らかとなった。

そこで次に、ATP/P2受容体シグナルにより、アストロサイトで産生・放出される突起伸長因子の探索を開始した。ATP刺激により、脳アストロサイトではBDNFの産生が亢進することが知られている。そこで、ATP刺激による視神経アストロサイトでBDNFが産生されるか否かを確認した。

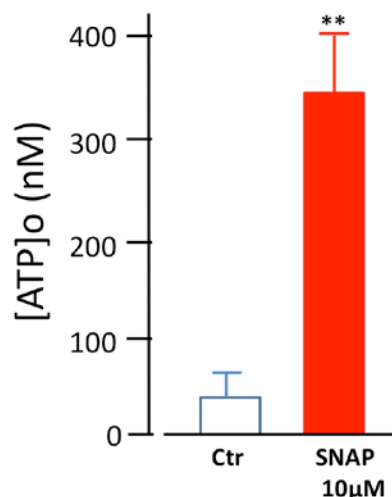


図2 アストロサイトのATP放出  
SNAP(10  $\mu$  M, 10 min)刺激により、  
視神経アストロサイトは、基礎遊離量(Ctr)の約10倍ものATPを放出した。

ATPは、濃度依存的にBDNFのmRNA及び蛋白発現を亢進させ、それは基礎産生レベルの約10倍に達した。BDNFがRGCの

突起伸長作用を呈する事は、既に良く知られている。そこで、アストロサイトによるRGC突起伸長作用が、BDNFに依存するか否かの検討を行った。図3の様に、アストロサイト (SNAP) により誘発されるRGCの突起伸

展は、BDNFの中和抗体及びBDNF受容体 (trkB) 拮抗薬K252aにより、ほぼ消失した。以上、アストロサイトは種々の刺激に応答

してATPを放出すること、このATPがオートクライン様作用によりアストロサイトP2受容体 (P2Y1受容体) 依存的にBDNF産生・放出すること、アストロサイト由来BDNFによりRGCは突起を伸長させること、が明らかとなった。

#### 4. 考察 まとめ

視神経グリア細胞は、RGCの生存及び突起伸長に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。特に視神経アストロサイトは、その突起伸長促進作用が顕著であった。また、視神経アストロサイトはATPを放出すること、またこのATP/P2受容体依存的にBDNFが産生されること、アストロサイトのBDNF依存的にRGCの突起伸長が誘発されることが明らかとなった。既にスクリーニングにより、いくつかの既存薬物がアストロサイトのATP放出を惹起することが明らかとなっている。これらの知見を元に、一日も早くアストロサイトに作用する全く新しい新規緑内障治療薬の開発したい。

#### 5. 発表論文、参考文献

##### 参考論文

- 1) Kashiwagi, K., Iizuka, Y., Tanaka, Y., Araie, M., Suzuki, Y. & Tsukahara, S.: Molecular and cellular reactions of retinal ganglion cells and retinal glial cells under centrifugal force loading. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **45**: 3778-3786, 2004.
- 2) Koizumi, S., Fujishita, K., Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y. & Inoue, K.: Dynamic inhibition of excitatory synaptic transmission by astrocyte-derived ATP in hippocampal cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**: 11023-11028, 2003.

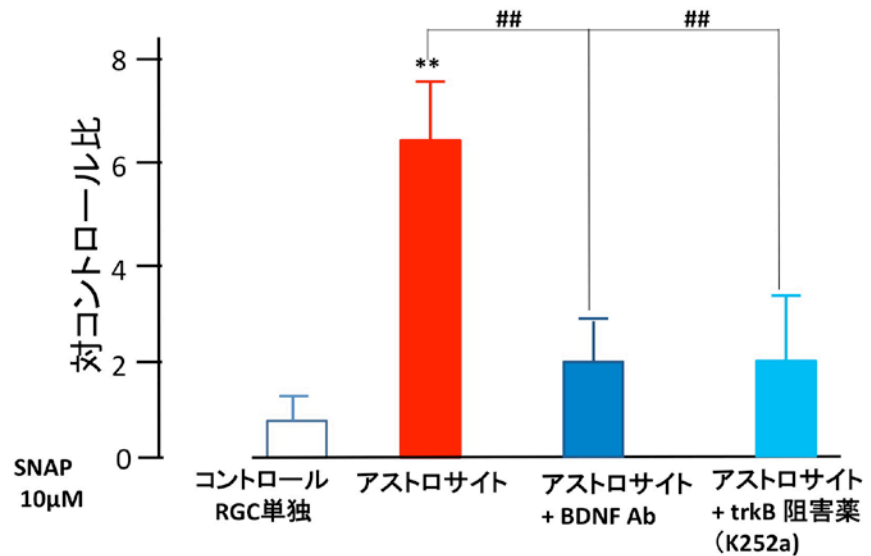


図3 アストロサイトによるRGCの突起伸長作用とBDNFシグナル  
アストロサイト存在下のSNAP (10 μM, 10 min) 刺激により、RGCは有意に突起を伸長させた。この突起伸長は、BDNFの中和抗体 (ab) 及びBDNFの受容体 (trkB) 拮抗薬 (K252a) によりほぼ消失した。