

難治疾患共同研究拠点共同研究終了報告書

平成25年3月1日

東京医科歯科大学難治疾患研究所長 殿

申請者(代表者)

所属機関 東京都神経科学総合研究所

職 名 副参事研究員

氏 名 原田 高幸

下記により、共同研究の終了報告を致します。

記

研究題目	(和) モデルマウスを用いた正常眼圧緑内障の病態解明と新規治療薬の開発 (英) Determination of mechanisms and evaluation of new treatments of normal tension glaucoma using animal models		
研究領域番号 (研究領域から選択)	2	研究対象番号 (研究対象から選択)	B
研究領域	1. 難治疾患の病因・病態解明に関する基礎・応用研究 2. 難治疾患の診断・治療・予防法の開発に関する基礎・応用研究 3. 難治疾患研究に有用な解析技術・モデル生物の開発に関する基礎・応用研究		
研究対象	A. 悪性腫瘍の共同研究 B. 脳・神経系難治疾患の共同研究 C. 心・血管系難治疾患の共同研究 D. 運動器系難治疾患の共同研究 E. 免疫・感染系難治疾患の共同研究 F. 代謝系難治疾患の共同研究 G. その他の難治疾患の共同研究		
研究期間	平成22年4月1日～平成24年3月31日		
研究組織			
氏名	所属機関・部局等	職名	役割分担
原田高幸	東京都神経科学総合研究所・分子神経生物学分野	副参事研究員	新規治療薬候補物質の作用機序の解析
田中光一	東京医科歯科大学大学院疾患生命科学研究所・高次神経科学	教授	新規治療薬候補物質のモデル動物を用いたスクリーニング
相田知海	東京医科歯科大学難治疾患研究所・分子神経科学	助教	新規治療薬候補物質のモデル動物を用いたスクリーニング
難治疾患研究所共同研究対応教員	(共同研究をした教員名を記載) 田中光一、相田知海		

研究成果

緑内障は我が国における失明原因のトップとなっている。本邦における特徴の1つとして正常眼圧緑内障の比率が高いことがあげられるが、詳しい発症メカニズムは解明されていない。これまでに我々はグルタミン酸輸送体である GLAST および EAAC1 の遺伝子欠損マウスが正常眼圧緑内障のモデル動物となり得ることを報告した (Harada *et al. J Clin Invest*, 2007)。これらの疾患モデルではグルタミン酸毒性に加えて、酸化ストレスの関与が示唆されたが、後者を標的とした治療研究はまだ行われていない。

そこで我々は、酸化ストレスに反応して細胞死を誘導する mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase の1つである apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) の機能に注目した。同遺伝子の抑制による緑内障症状の緩和が可能か検討するため、GLAST 欠損マウス (GLAST^{+/-}および GLAST^{-/-}) と ASK1 欠損マウス (ASK1^{-/-}) との交配を行い、約6か月間にわたる形態学的観察と電気生理学的な機能検討を行った。さらに GLAST^{+/-}:ASK1^{-/-}および GLAST^{-/-}:ASK1^{-/-}マウスの眼圧、酸化ストレス (malondialdehyde)、グルタチオン産生量を測定した。また緑内障との関係が注目される腫瘍壊死因子 (Tumor Necrosis Factor, TNF) を ASK1^{-/-}由来の培養 Müller グリア細胞に投与し、刺激によって産生される free radical の1つである一酸化窒素の合成酵素 inducible nitric oxide synthase (iNOS) の産生量を測定した。さらに ASK1^{-/-}由来の培養網膜神経節細胞における TNF 耐性を検討した。

その結果として、GLAST^{+/-}:ASK1^{-/-}および GLAST^{-/-}:ASK1^{-/-}マウスにおいては、それぞれ GLAST^{+/-}および GLAST^{-/-}マウスと比較すると網膜神経節細胞と視神経の変性過程が遅延し、視神経の機能を示す多局所網膜電位の二次核も6か月間に渡って保たれていることがわかった。ただし GLAST^{+/-}:ASK1^{-/-}および GLAST^{-/-}:ASK1^{-/-}マウスは正常眼圧を示し、GLAST^{+/-}および GLAST^{-/-}マウスと比較しても malondialdehyde 濃度の減少やグルタチオン産生量の増加を認めなかった。しかし ASK1^{-/-}由来の培養 Müller グリア細胞を TNF 刺激すると野生型由来と比べて p38 MAPK の活性が抑制され、iNOS の産生量が大幅に減少することがわかった。また ASK1^{-/-}由来の培養網膜神経節細胞に対する TNF 毒性実験では、野生型由来と比べて有意な細胞死の減少を認めた。

以上から神経およびグリアの両細胞における ASK1 活性の制御が、緑内障をはじめとする神経変性疾患の進行抑制に有用な可能性が示された。我々はすでに ASK1 阻害剤の新規開発に成功しており、今後は同薬剤による治療研究を予定している。

利用した難治疾患研究リソース
(○で囲む)

- 1) 疾患バイオリソース
- ②) 疾患モデル動物
- 3) 疾患オミックス

使用した設備・資料・試料等	GLAST 欠損マウス EAAC1 欠損マウス
---------------	----------------------------

本研究成果に関連する論文発表状況
(本共同研究拠点経費による研究であることが謝辞に明示されている論文には * 印を付けて下さい)

Harada, C., Namekata, K., Guo, X., Yoshida, H., Mitamura, Y., Matsumoto, Y., Tanaka, K., Ichijo, H., and Harada, T. ASK1 deficiency attenuates neural cell death in GLAST deficient mice, a model of normal tension glaucoma. *Cell Death and Differentiation* 17, 1751-1759, 2010.

Harada, C., Guo, X., Namekata, K., Kimura, A., Nakamura, K., Tanaka, K., Parada, L.F., Harada, T. Glia- and neuron-specific functions of TrkB signaling during retinal degeneration and regeneration. *Nature Communications* 2:189, 2011.

