

硝子体穿刺後の網膜内での脳由来神経栄養因子遺伝子の発現

酒井 勉, 吉利 尚, 川越 真美, 溝渕 宗秀, 北原 健二

東京慈恵会医科大学眼科学教室

要 約

目 的：硝子体穿刺による網膜の損傷後、網膜変性モデルでは視細胞変性が抑制され、視神経切断モデルでは神経節細胞の生存率が高まることが報告されている。この防御機構には、神経栄養因子の関与が推察されている。今回、網膜における神経栄養因子の産生の有無を知るために、硝子体穿刺を行った網膜内での神経栄養因子の遺伝子の発現変化を調べた。

対象と方法：成熟ラット 20 匹それぞれの片眼の硝子体を経強膜的に 3 か所で穿刺し、網膜に損傷を加えた。術直後から 14 日後の間に網膜を採取して検索した。

結 果：硝子体穿刺後の網膜には、グリア線維酸性蛋白質 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) と脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF)

の発現が増強していた。Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法によるニューロトロフィン 3 (neurotrophin-3, NT-3) 遺伝子の発現の増強はなかった。

結 論：硝子体穿刺後のラット網膜内では、神経細胞の保護作用のある BDNF がグリア細胞の関与により産生されている可能性がある。(日眼会誌 103: 271—276, 1999)

キーワード：脳由来神経栄養因子、ニューロトロフィン 3、グリア線維酸性蛋白質、網膜損傷、網膜グリア細胞

Expression of Brain-derived Neurotrophic Factor Gene in Retina Following Vitreous Tap

Tsutomu Sakai, Takashi Yoshitoshi, Mami Kawagoe, Tokihide Mizobuchi and Kenji Kitahara

Department of Ophthalmology, Jikei University School of Medicine

Abstract

Purpose : Mechanical injuries to the retina following vitreous tap are reported to protect photoreceptor cells in a rat model of the retinal degeneration and enhance the survival rate of retinal ganglion cells in the optic nerve transection. Neurotrophic factors are presumably involved in the protective mechanisms. In order to see whether neurotrophic factors are synthesized in the retina, we studied the expression of neurotrophic factors in the retina following vitreous tap in rats.

Materials and Methods : One eye each of 20 mature rats received transscleral vitreous taps at three points of entry and retinal injury. The retinas were removed and examined at day 0 to 14 of treatment.

Results : Following injury, the retina showed in-

creased expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) mRNA and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA. There was no enhancement of neurotrophin-3 (NT-3) mRNA when examined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

Conclusions : Activated retinal glial cells may produce BDNF which prevents retinal neuronal cell damage following injury. (J Jpn Ophthalmol Soc 103: 271—276, 1999)

Key words : Brain-derived neurotrophic factor, Neurotrophin - 3, Glial fibrillary acidic protein, Retinal injury, Retinal glial cells

I 緒 言

脳神経系の回路網の構築、維持には、神経栄養因子が重

要な働きをしている。神経栄養因子は、標的細胞、周囲のグリア細胞あるいは神経細胞自身から神経細胞に供給され、その生存維持、分化促進に作用すると考えられてい

別刷請求先：105-8461 東京都港区西新橋 3-25-8 東京慈恵会医科大学眼科学教室 酒井 勉

(平成 10 年 6 月 5 日受付、平成 10 年 10 月 21 日改訂受理)

Reprint requests to: Tsutomu Sakai, M.D. Department of Ophthalmology, Jikei University School of Medicine, 3-25-8 Nishi-shinbashi, Minato-ku, Tokyo 105-8461, Japan

(Received June 5, 1998 and accepted in revised form October 21, 1998)

る¹⁾。代表的な神経栄養因子としては、神経成長因子(nerve growth factor, NGF)、脳由来神経栄養因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、ニューロトロフィン3(neurotrophin-3, NT-3)、ニューロトロフィン4/5(neurotrophin-4/5, NT-4/5)、毛様体神経栄養因子(ciliary neurotrophic factor, CNTF)、グリア細胞由来神経栄養因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)などがある。中でも BDNF, NT-3 は哺乳動物間で種差および変異が少ないことから生物学的存在意義が大きいと考えられている²⁾。BDNF は、その名が示す通り、他の神経栄養因子に比べ脳への局在度が高く、*in vitro*, *in vivo* で様々な中枢ニューロンに作用することがわかっている。一方、NT-3 は末梢および中枢ニューロンのいずれにも分布し、末梢ニューロンへの作用が大きいと考えられている¹⁾。

眼科領域においては、培養網膜細胞³⁾⁴⁾や網膜変性モデル⁵⁾⁶⁾、視神経切断モデル⁷⁾⁸⁾へ神経栄養因子を投与することにより、神経再生が促進され、視細胞変性が抑制されることが確認されている。また、培養網膜細胞に BDNF 遺伝子を導入することにより神経節細胞の生存率が高まること⁹⁾、網膜変性モデルに CNTF 遺伝子を導入することにより網膜変性が抑制されることが報告¹⁰⁾されている。

一方、近年、網膜変性あるいは視神経切断後の網膜に硝子体穿刺による損傷を加えることにより、神経栄養因子の投与と同様の効果がみられることが明らかにされつつある⁷⁾¹¹⁾。つまり、硝子体穿刺時網膜内で神経細胞の保護のために神経栄養因子が産生される可能性がある。また、脳損傷時には反応性にアストロサイトが活性化され、神経栄養因子の合成を高めることが指摘されており¹²⁾¹³⁾、眼内でもグリア細胞が同様の作用を持っている可能性があるが、現在なお不明な点が多い。

今回、我々は硝子体穿刺後の網膜での神経栄養因子の産生の可能性を知るために、ラット網膜での BDNF と NT-3 の遺伝子の発現を reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を用いて調べ、損傷による発現の変化を検討したので報告する。

II 方 法

1. 実験動物

実験動物として、体重 200~250 g の雄の成熟ラット (Sprague-Dawley 系) 20 匹を使用した。ラットの飼育は明暗 12 時間サイクル、室温 22℃ とした。

2. 硝子体穿刺

ジエチルエーテルの吸入麻酔下で、眼球赤道部からやや後極寄りの部位に、顕微鏡下で 27 ゲージ針により水晶体を損傷しないように強膜から網膜を経て硝子体内への穿刺を片眼のみに 3 か所行った。硝子体出血がみられたものを実験対象から除外したため、最終的に実験に用いられたものは 36 眼であった。対照として、両眼とも硝子

体穿刺を加えていない 4 匹 8 眼を用いた。

3. 組織標本の作製

硝子体穿刺後、0, 1, 3, 7, 14 日目に摘出した眼球を、10% 中性ホルマリン緩衝液で固定後、アルコール脱水してパラフィン包埋し、5 μm の薄切標本を作製した。グリア線維酸性蛋白質(glial fibrillary acidic protein, GFAP)、BDNF、NT-3 の局在をウサギ抗ウシポリクローナル GFAP 抗体(DAKO)、ヒツジ抗ポリクローナル BDNF 抗体(CHEMICON)、ウサギ抗ポリクローナル NT-3 抗体(CHEMICON)を一次抗体とし、Vectastain Elite ABC Kit (Vector 社)とジアミノベンチジンをを用いてペルオキシダーゼ発色させ、光学顕微鏡下で観察した。

4. RT-PCR 法

網膜内での GFAP、BDNF、NT-3 遺伝子の発現を RT-PCR 法で調べた。硝子体穿刺後、0, 1, 3, 7, 14 日目に眼球を摘出し、網膜を採取した後、Quick-Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia 社)のプロトコールに従って全 RNA を抽出、精製した。全 RNA 量を 1 μg に合わせた後、random primer (Gibco-BRL) および逆転写酵素 (Superscript II reverse transcriptase, Gibco-BRL) で逆転写反応を行い、cDNA を作製し、RNase H (Promega) 処理後、ラット β-actin、GFAP、BDNF、NT-3 に対する特異的なプライマー(表 1)^{14)~16)}を用いて PCR (Zymoreactor, ATTO) を施行した。PCR 反応液は Taq バッファー、200 μM dNTP ミックス、2 mM MgCl₂、0.5 μM プライマー、50 units/ml Taq (Perkin-Elmer)、鋳型 DNA 溶液 2 μl として調整され、反応条件は β-actin、GFAP は変性温度を 95℃×0.5 分、アニーリング温度を 55℃×0.5 分、伸長温度を 72℃×1 分とし、BDNF、NT-3 は変性温度を 95℃×1 分、アニーリング温度を 60℃×1.5 分、伸長温度を 72℃×1.5 分とした。サイクル数は PCR のプラトー効果を考慮に入れ、β-actin は 25 として、GFAP、BDNF、NT-3 は 35 と設定した。また、PCR 産物が genomic DNA の混入による増幅産物でないことを証明するために、逆転写反応を行わなかった RNA を試料として同条件で PCR を施行した。PCR 産物は 3% アガロースゲル上で電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した。目的の大きさの

表 1 プライマーの塩基配列

Primers	Sequence	Base pairs
GFAP	5'-ACCTCGGCACCCTGAAGAAAG-3' 5'-CCACGACTCAACCTTCCTC-3'	140
BDNF	5'-GAAAGTCCCGGTATCCAAAG-3' 5'-CCAGCCAATTCTCTTTT-3'	181
NT-3	5'-ATGCAGAACATAAGAGTCAC-3' 5'-AGCCTACGAGTTTGTGTGTTT-3'	294

GFAP : glial fibrillary acidic protein, BDNF : brain-derived neurotrophic factor, NT-3 : neurotrophin-3

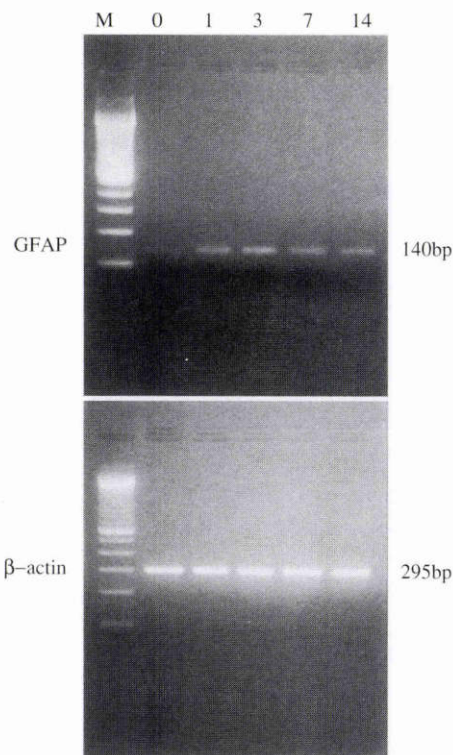
バンドを確認した後、そのシグナルの大きさを image analyzer (NIH Image: Wayne Rasband, フリーウェア) により測定した。それぞれの PCR 産物が鋳型として用いた cDNA に用量依存的に変化する条件であることを確認した後、 β -actin を内部標準として遺伝子発現量の変化を求め、対照の結果と比較した。

5. PCR 産物の確認

増幅産物は pGEM-T Vector を用い、Invitrogen 社のプロトコルに従いサブクローニングを行った。T ベクターは pGEM-5 Zf(+) ベクターを EcoRV で切断し、その両方の 3 末端に T (チミジン) を付加して作製された。サブクローニングされた PCR 産物については、SP 6, T7 プライマーを用いて dideoxy 法により塩基配列が確認された (United States Biochemical 社のプロトコルに

従った)。

A



B

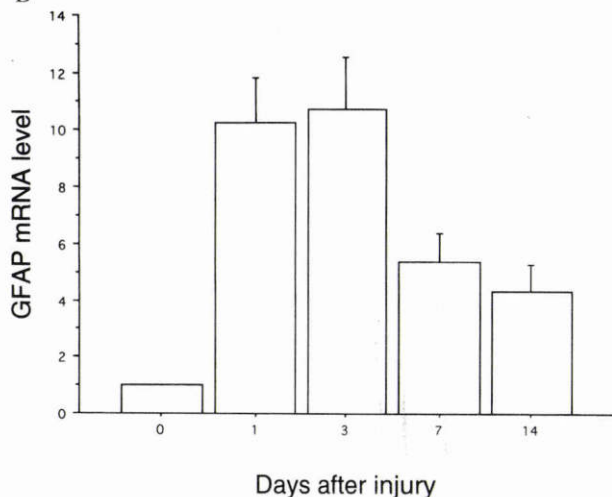


図2 損傷前後の GFAP mRNA の発現。

A: Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を用いた損傷前後の GFAP mRNA の発現変化を電気泳動後のゲル写真で示す。内部標準物質として用いられた β -actin はすべての経過で変化をみない。GFAP mRNA は損傷後早期に発現のピークがある。M は分子量マーカーの 100 bp DNA ladder を表す。B: β -actin を内部標準として、GFAP mRNA の発現量の変化を半定量的に測定した。3 回の実験系から得られた結果は半定量後、正常 (損傷前) 網膜の発現レベルを 1 とし相対的に数値化した。測定結果はすべて平均値 $\pm$ 標準偏差 ($n=3$) で示した。

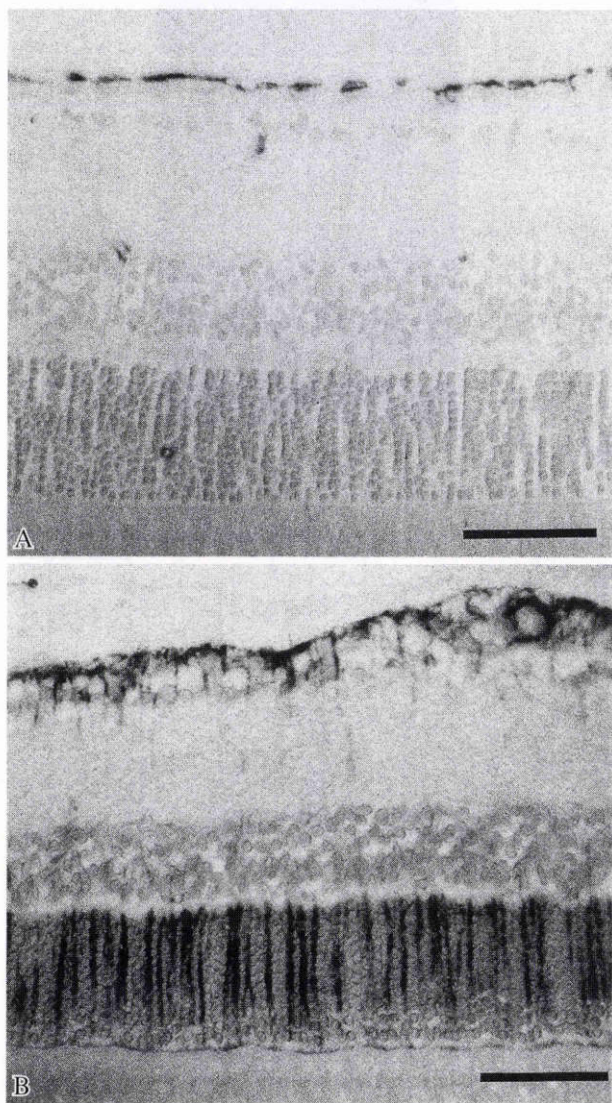


図1 損傷前後の glial fibrillary acidic protein (GFAP) の発現。

A: 正常 (損傷前) 網膜においては内境界膜に沿って弱い陽性所見がある。B: 損傷後 1 日目の網膜においては内境界膜から外顆粒層にわたり強い陽性所見がある。バーはすべて 100 μ m

III 結 果

1. 組織学的所見

網膜切片を ABC Kit で発色させた結果, 非損傷眼では

網膜の内境界膜に沿ってのみ GFAP 陽性所見がみられた(図 1 A).

損傷後 1 日(図 1 B)では網膜の内境界膜から外顆粒層にわたり GFAP 陽性所見がみられ, 損傷部においてより強い染色がみられた. 損傷後 3, 7, 14 日後においても同様

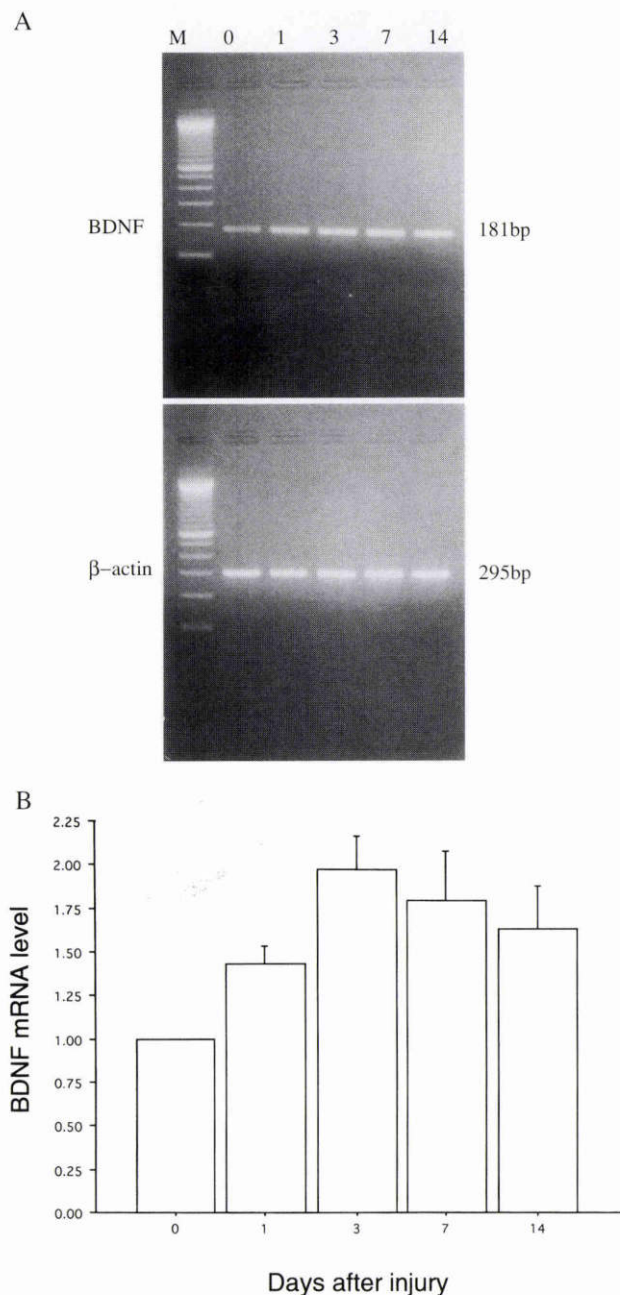


図 3 損傷前後の brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA の発現.

A: RT-PCR 法を用いた損傷前後の BDNF mRNA の発現変化を電気泳動後のゲル写真で示す. 内部標準物質として用いられた β -actin はすべての経過で変化をみない. BDNF mRNA は損傷後 3 日目に発現のピークがある. M は分子量マーカーの 100 bp DNA ladder を表す. B: β -actin を内部標準として, BDNF mRNA の発現量の変化を半定量的に測定した. 3 回の実験系から得られた結果は半定量後, 正常(損傷前)網膜の発現レベルを 1 とし相対的に数値化した. 測定結果はすべて平均値 $\pm$ 標準偏差 ($n=3$) で示した.

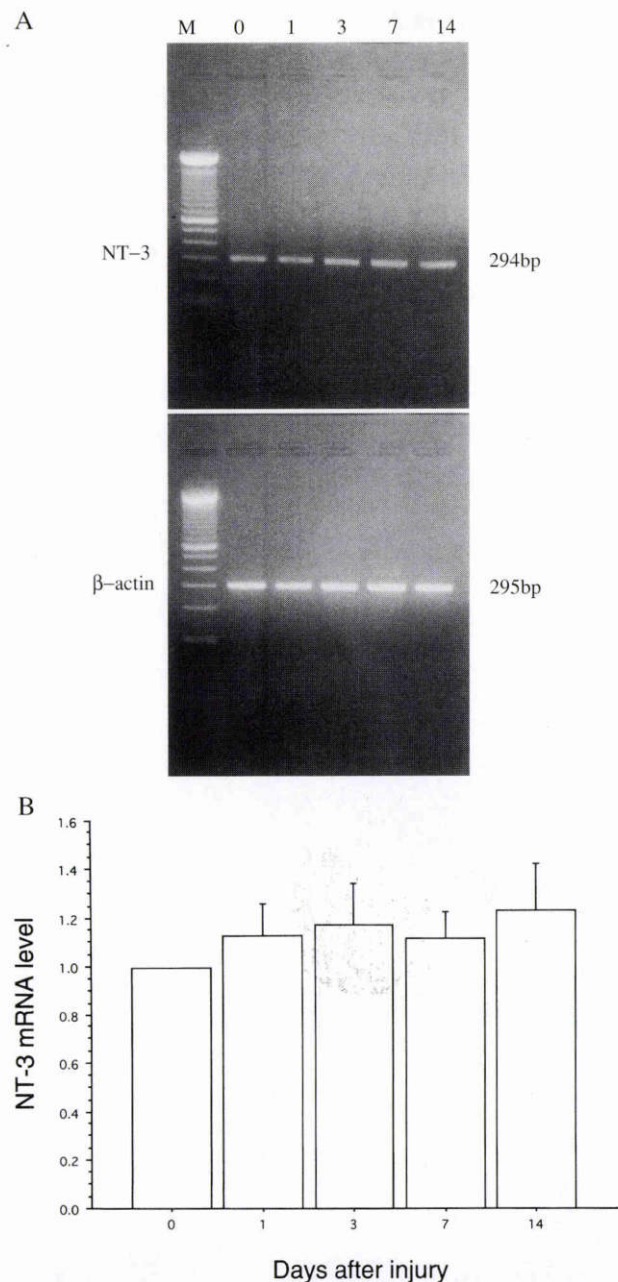


図 4 損傷前後の neurotrophin-3 (NT-3) mRNA の発現.

A: RT-PCR 法を用いた損傷前後の NT-3 mRNA の発現変化を電気泳動後のゲル写真で示す. 内部標準物質として用いられた β -actin はすべての経過で変化をみない. NT-3 mRNA は損傷後発現の変化はない. M は分子量マーカーの 100 bp DNA ladder を表す. B: β -actin を内部標準として, NT-3 mRNA の発現量の変化を半定量的に測定した. 3 回の実験系から得られた結果は半定量後, 正常(損傷前)網膜の発現レベルを 1 とし相対的に数値化した. 測定結果はすべて平均値 $\pm$ 標準偏差 ($n=3$) で示した.

の所見が得られた。

また, BDNF, NT-3 は免疫染色法で損傷および非損傷眼において発現は検出されなかった。

2. GFAP 遺伝子の発現

網膜損傷に対するグリア細胞の反応をみるために GFAP の遺伝子発現変化を調べた。対照における GFAP 遺伝子の発現量と比較した結果, 損傷後 1 日では 10.2 ± 1.5 (平均値 $\pm$ 標準偏差) 倍, 3 日では 10.7 ± 1.7 倍になり, 7 日では 5.3 ± 0.9 倍, 14 日では 4.2 ± 0.9 倍であった (図 2)。以上, GFAP 遺伝子の発現は, 損傷後 1 日目および 3 日目にピークがみられた。

3. 神経栄養因子 (BDNF, NT-3) 遺伝子の発現

対照の BDNF 遺伝子と比較すると, 損傷後 1 日では発現量が 1.4 ± 0.1 倍になり, 3 日では 1.9 ± 0.2 倍, 7 日では 1.8 ± 0.3 倍, 14 日では 1.6 ± 0.2 倍であった (図 3)。以上, BDNF 遺伝子については損傷後, 発現が増強しており, 3 日目に発現のピークがみられた。

NT-3 遺伝子の発現に関しては, 対照との比較では損傷後発現の増強はなかった (図 4)。

IV 考 按

今回, 我々は神経細胞の生存およびその維持に深く関わっている神経栄養因子に着目し, 硝子体穿刺後の網膜において遺伝子の発現変化を経時的に検索した結果, BDNF の遺伝子の発現が増強することを示すことができた。硝子体穿刺による網膜の損傷後, 網膜変性モデルでは視細胞の変性が抑えられ, 視神経切断モデルでは神経節細胞の生存率が高まることが報告⁷⁾¹¹⁾されている。Wen ら¹⁷⁾は線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor, FGF) と CNTF の遺伝子が損傷後網膜で増強していることを証明し, これらの因子に神経細胞の保護作用がある可能性を指摘している。これらのことから, 網膜の損傷の効果には種々の神経栄養因子の産生が関与することが考えられる。

神経栄養因子の中で, 特に BDNF は網膜内で神経細胞を保護する作用があることが知られており, 注目されている。培養細胞を用いた *in vitro* の実験で, Thanos ら³⁾は BDNF が軸索障害後の網膜神経節細胞の生存率を高めることを, 高野⁴⁾は BDNF に神経再生促進効果があることを報告している。また, *in vivo* の実験で, Mansour-Robaey ら⁷⁾は BDNF の投与により視神経切断後の網膜内において軸索の再生が促進されることを, La Vail ら⁵⁾は網膜変性モデルの視細胞変性が BDNF により抑制されることを報告している。以上のことから, 網膜細胞の保護の観点から BDNF は重要な因子であると考えられる。本実験の結果からも神経細胞の保護のため, あるいは神経再生に有利な環境を提供するために網膜内で BDNF が産生されている可能性があることが示唆される。一方, NT-3 では発現に変化はみられず, 損傷時の網膜におけ

る役割は少ないと考える。

今回, BDNF の発現が遺伝子レベルで増強していたことから蛋白レベルでの発現の増強の可能性も考えられたが, 免疫組織学的方法では検出できなかった。これは蛋白質の発現量が少なく, 検出限界以下の可能性や検出感度が低いことによる可能性もあり, 今後は検出感度の高い western blotting 法についても検討する必要がある。また, Vecino ら¹⁸⁾は網膜内での BDNF の発現を免疫組織学的方法で確認しており, 今後, 新たな抗体の作製や染色方法, 可視化技術の改良による再検討も必要であると考ええる。

GFAP はグリア細胞に特異的に存在する蛋白であり, 正常状態の網膜では主にアストロサイトに存在すると考えられているが, 損傷, 変性, 網膜剥離などの病的状態においては主にミューラー細胞に発現の増強があった^{19)~21)}。本実験の免疫組織学的検討においても, 従来の報告と同様, 損傷後では GFAP 陽性像はミューラー細胞の分布に一致していた。また, Wen ら¹⁷⁾の報告と同様に損傷後, 早期に GFAP 遺伝子の発現のピークがあった。これは損傷後, 早期にグリア細胞が活性化していることが考えられる。さらに, GFAP 遺伝子に続いて BDNF 遺伝子も発現の増強が確認されたことから, グリア細胞の活性化が BDNF の発現に関与している可能性が推察される。従来から, 培養系においては活性化グリア細胞がサイトカイン, 神経栄養因子, プロテアーゼなど様々な物質を産生, 分泌することが報告²²⁾されており, 我々も培養網膜グリア細胞系において, サイトカインにより BDNF と NGF の遺伝子の産生が増強されることを確認している²³⁾。これらのことから, 生体網膜内においても, 損傷時には様々な因子により活性化されたグリア細胞, 主にミューラー細胞が神経栄養因子を産生, 分泌し, 神経細胞の生存, 修復過程の促進に深くかかわっていると考える。

今回の実験結果から, 硝子体穿刺による網膜損傷後, 神経細胞を保護するために, 網膜グリア細胞の関与により BDNF 遺伝子が発現する可能性が示唆された。今後は, 様々な実験動物モデルを用いて, グリア細胞と神経栄養因子の関連についてさらに検討したい。

稿を終えるに当たり, 本研究にご指導, ご助言をいただいた東京慈恵会医科大学眼科学教室の山口朋彦先生および高田雄一郎先生に謝意を表します。

本論文の要旨は第 63 回日本中部眼科学会で発表した。

文 献

- 1) 古川昭栄: ニューロトロフィンファミリーと病巣修復. 神経進歩 39: 957—965, 1995.
- 2) 古川美子, 古川昭栄: 脳由来神経栄養因子 (BDNF). 神経精神薬理 18: 815—822, 1996.
- 3) Thanos S, Bahr M, Barde YA, Vanselow J: Survival and axonal elongation of adult rat retinal ganglion cells: *In vitro* effects of lesioned sciatic nerve

- and brain-derived neurotrophic factor. *Eur J Neurosci* 1: 19—26, 1989.
- 4) 高野雅彦: 網膜視神経節細胞の再生. *日眼会誌* 100: 972—981, 1996.
 - 5) La Vail MM, Unoki K, Yasumura D, Matthes MT, Yancopoulos GD, Steinberg RH: Multiple growth factors, cytokines and neurotrophins rescue photoreceptors from the damaging effects of constant light. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 11249—11253, 1992.
 - 6) Unoki K, La Vail MM: Protection of the rat retina from ischemic injury by brain-derived neurotrophic factor, ciliary neurotrophic factor, and basic fibroblast growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 907—915, 1994.
 - 7) Mansour-Robaey S, Cleake DB, Wang YC, Bray GM, Aguayo AJ: Effects of ocular injury and the administration of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on the survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells on adult rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 449—465, 1994.
 - 8) Mey J, Tanos S: Intravitreal injections of neurotrophic factors support the survival of axotomized retinal ganglion cells on adult rats *in vivo*. *Brain Res* 602: 304—317, 1993.
 - 9) Castillo B Jr, del Cerro M, Breakefield XO, Frim DM, Barnstable CJ, Dean DO, et al: Retinal ganglion cell survival is promoted by genetically modified astrocytes designed to secrete brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Brain Res* 647: 30—36, 1994.
 - 10) Cayouette M, Gravel C: Adenovirus-mediated gene transfer of ciliary neurotrophic factor can prevent photoreceptor degeneration in the retinal degeneration (rd) mouse. *Hum Gene Ther* 8: 423—430, 1997.
 - 11) Steinberg RH: Survival factors in retinal degenerations. *Curr Opin Neurobiol* 4: 515—524, 1994.
 - 12) Nieto-Sampedro M, Lim R, Hicklin DJ, Cotman CW: Early release of glia maturation factor and acidic fibroblast growth factor after rat brain injury. *Neurosci Lett* 86: 361—365, 1988.
 - 13) Ip NY, Wiegand SJ, Morse J, Rudge JS: Injury-induced regulation of ciliary neurotrophic factor mRNA in the adult rat brain. *Eur J Neurosci* 5: 25—33, 1993.
 - 14) Fagan AM, Surh ST, Lucidi-Phillipi CA, Peterson DA, Holtzman DM, Gage FH: Endogenous FGF-2 is important for cholinergic sprouting in the denervated hippocampus. *J Neurosci* 17: 2499—2511, 1997.
 - 15) Hofer M, Pagliusi SR, Hohn A, Leibrock J, Barde Y: Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *EMBO J* 9: 2459—2654, 1990.
 - 16) Hohn A, Leibrock J, Bailey K, Barde YA: Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature* 344: 339—341, 1990.
 - 17) Wen R, Song Y, Cheng T, Matthes MT, Yasumura D, LaVail MM, et al: Injury-induced upregulation of bFGF and CNTF mRNAs in the rat retina. *J Neurosci* 15: 7377—7385, 1995.
 - 18) Vecino E, Caminos E, Ugarte M, Martin-Zanca D, Osborne NN: Immunohistochemical distribution of neurotrophins and their receptors in the rat retina and the effects of ischemia and reperfusion. *Gen Pharmac* 30: 305—314, 1998.
 - 19) Bignami A, Dahl D: The radial glia of Müller in the rat retina and their response to injury. An immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic (GFA) protein. *Exp Eye Res* 28: 63—69, 1979.
 - 20) Eisenfeld AJ, Bunt-Milam AH, Sarthy PV: Müller cell expression of glial fibrillary acidic protein after genetic and experimental photoreceptor degeneration in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25: 1321—1328, 1984.
 - 21) Erickson PA, Fisher SK, Guren CJ, Anderson DH, Kaska DD: Glial fibrillary acidic protein increases in Müller cells after retinal detachment. *Exp Eye Res* 44: 37—48, 1987.
 - 22) 中島一行, 高坂新一: 中枢グリア細胞の生理的役割. *神経精神薬理* 16: 249—259, 1994.
 - 23) Sakai T, Yoshitoshi T, Kawagoe M, Mizobuchi T: Expression and induction of neurotrophins mRNA in cultured rat retinal glial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38 (ARVO Suppl): B 497, 1997.