

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20245

研究課題名(和文)ミトコンドリアカルパイン阻害ペプチドによる新規緑内障神経節細胞保護療法の検討

研究課題名(英文)Study for neuroprotective treatment for glaucoma using anti-calpain peptide

研究代表者

工藤 孝志(Kudo, Takashi)

弘前大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20598718

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は正常眼圧緑内障モデル動物のひとつであるGLASTノックアウト(KO)マウスを用いて、当教室にて確立したミトコンドリアカルパイン-1を競合的に阻害するペプチドの神経保護効果を検証することを目的とした。実際にGLAST-KOマウスでは網膜神経節細胞の細胞死の存在を確認した。実験期間中にGLAST-KOマウスの繁殖力が弱かったため十分な個体数が得られず進行が大幅に遅れたが、新たな個体を導入することで克服し、光干渉断層計による網膜神経変性過程の基礎データを確立した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was originally to investigate the effect of anti-mitochondrial calpain-1 peptide on glaucomatous neuronal damage in the GLAST knockout (KO) mice, which is known to be a type of normal tension glaucoma. Although the study delayed because of weak fertility of the GLAST KO mice, we established the longitudinal change in the retinal layer thickness using optical coherent tomography.

研究分野：眼科学

キーワード：緑内障 正常眼圧緑内障 GLAST ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

緑内障は日本人の視覚障害原因疾患の第1位に位置する疾患であり、かつ早期発見、早期治療により本疾患による視覚障害を低減できる可能性が高い。緑内障には様々な病型があるが、中でも正常眼圧緑内障は日本人緑内障の約70%を占める高頻度な疾患であり、その対策が急務と言える。緑内障における細胞レベルの病態としては、何らかの原因で網膜神経線維が篩状板部にて絞扼を受けそこから神経細胞変性ないし神経節細胞死をきたすこととされる。神経節細胞死の分子機構として、アポトーシスやネクローシスなど、さまざまな反応経路が知られている。そのうち、ミトコンドリアカルパイン-1によるアポトーシス誘導因子の活性化による核内移行も重要な役割を果たしているのではないかとの着想により、当教室では近年ミトコンドリアカルパイン-1を競合的に阻害するペプチドを開発した。本研究では正常眼圧緑内障のモデル動物として知られる GLAST ノックアウト(KO)マウスを用いて、カルパイン阻害ペプチドの神経節細胞死遅延効果を検証することとした。

2. 研究の目的

背景の項に記載したとおり、正常眼圧緑内障のモデル動物の1つとして知られている GLAST-KO マウスにおける神経節細胞変性の経過とそれに対するミトコンドリアカルパイン阻害ペプチドの効果を光干渉断層計(OCT)を用いて明らかにすること。

3. 研究の方法

(1) GLAST-KO マウスの自家繁殖

GLAST-KO マウスを開発者である原田高幸博士から贈与を受け弘前大学大学院医学研究科附属動物実験施設にて自家繁殖させる。

(2) GLAST-KO マウス神経節細胞変性の OCT による観察

GLAST-KO マウスの網膜神経線維層および網膜神経節細胞層を中心とした網膜各層の厚さの変化を経時的に OCT により記録して、野性型である C57BL/6J マウスの自然経過と比較する。

(3) GLAST-KO マウス神経節細胞変性の観察

TUNEL 染色により、GLAST-KO マウスでの網膜神経節細胞変性を観察する。野性型として C57BL/6J マウスを使用する。

(4) カルパイン阻害ペプチド点眼による GLAST-KO マウス神経節細胞変性遅延効果の解析

GLAST-KO マウスならびに C57BL/6J マウスにカルパイン阻害ペプチドを点眼にて投与する。対照として基剤投与を行い、両者における網膜神経節細胞および網膜神経細胞

層の厚さの経過を比較する。

3. 研究成果

(1) GLAST-KO マウスの自家繁殖

当初、原田博士から贈与され、研究初年度に当教室にて自家繁殖させていた GLAST-KO マウスは繁殖力が非常に弱く、2年間交配を繰り返したが、十分な個体数を確保することができなかった。そこで原田博士から追加で2つがい贈与を受け、ようやく最終年度になってから自家繁殖が成功するようになった。

(2) GLAST-KO マウス神経節細胞変性の OCT による観察

GLAST-KO マウスの生後 184 日齢の視神経乳頭周囲の OCT 像を以下に示す。

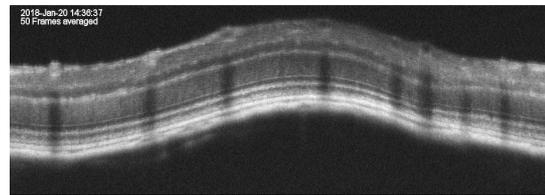


図1 生後184日齢のGLAST-KOマウス視神経乳頭周囲のOCT像

また図2には野性型であるC57BL/6Jの同部位のOCT像を示す。

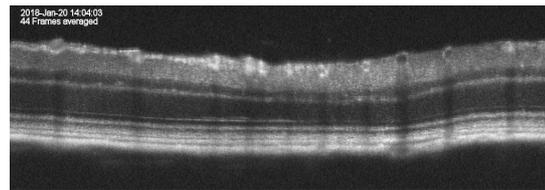


図2 生後176日例のC57BL/6Jマウス視神経乳頭周囲のOCT像

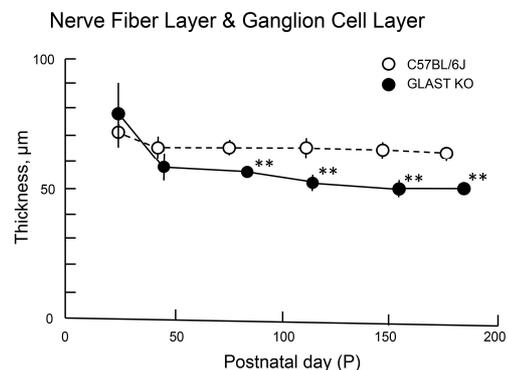


図3 GLAST-KOマウス(●)およびC57BL/6Jマウス(○)の網膜表層厚の経時変化。統計学的検定(Student *t*-test): **, $P=0.001$ C57BL/6JマウスならびにGLAST-KOマウス

両画像解析にて撮像された OCT 像 (代表症例を図 1 と図 2 に示す) を InSight ソフトウェアを用いて、網膜表層 (神経線維層と神経節細胞層)、網膜深層、視細胞層、網膜色素上皮層と脈絡膜層の 5 層に segmentation し、各層の厚さの変化を経時的に計測して両群の差を統計学的に解析した。とくに両者で差があった網膜表層の結果を図 3 に示す。

図 3 の経過から GLAST-KO マウスでは生後 70 日齢以降では網膜表層厚、すなわち網膜神経線維層と神経節細胞層の厚さが野性型に比べて有意に菲薄化することが明らかとなった。このデータは薬物療法などの実験的効果を検証するための基礎データとなるものと考えられる。

(3) GLAST-KO マウス神経節細胞変性の観察

TUNEL 染色により、GLAST-KO マウスでの網膜神経節細胞層に数は少ないながら TUNEL 陽性細胞を認めた。その数は 400 倍に拡大した視野あたり 1 視野に 2 ないし 3 個程度であった。野性型として用いた C57BL/6J マウスには TUNEL 陽性細胞は見られなかった。GLAST-KO マウスでの神経節細胞死は慢性的で緩徐ながら進行性にみられることが明らかとなった。

(4) カルパイン阻害ペプチド点眼による GLAST-KO マウス神経節細胞変性遅延効果の解析

本研究では期間中に GLAST-KO マウスの繁殖力の低下があり、十分な個体数が得られない期間が長かったため、本項目の実験は遂行することが出来なかった。本研究は緑内障の治療法開発という社会的に要求度の高い研究であるため、ぜひとも効果的な治療法の手がかりとなる成果を追求したいと考え、次年度以降に別な研究課題にてさらに本研究を引き続き継続して行うこととした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

1. Kudo A, Kudo T, Takahashi D, Metoki T, Suzuki Y, Nakazawa M.

Macular edema associated with intraocular ointment after cataract surgery. American Journal of Ophthalmology Case Reports 10, 152-156, 2018. DOI:

org/10.1016/j.ajoc.2018.02.027

査読あり

2. Kudo T, Suzuki Y, Metoki T,

Nakazawa M.

A case of childhood vitrectomy to a dense vitreous hemorrhage secondary to leukemia therapy and tumor lysis syndrome. Case Reports in Ophthalmology 2015;6:34-38.

DOI: 10.1159/000374088.

査読あり

[学会発表](計 10 件)

1. 鈴木幸彦、安達功武、工藤孝志、鈴木香、目時友美、中澤 満
術前網膜光凝固の有無による糖尿病網膜症の硝子体サイトカインと術後炎症. 第 122 回日本眼科学会総会、2018 年 4 月 19-22 日、大阪国際会議場
2. 工藤孝志、鈴木幸彦、目時友美、安達功武、毛内奈津姫、中澤 満
内境界膜剥離操作が神経節細胞層に及ぼす影響. 第 122 回日本眼科学会総会、2018 年 4 月 19-22 日、大阪国際会議場
3. 工藤孝志、江目孝幸、田名部玲子、目時友美、工藤朝香、鈴木幸彦、中澤 満
死亡例 1 例を含むステロイド治療によりニューモシスティス肺炎を併発した 3 症例. 第 121 回日本眼科学会、2017 年 4 月 6-9 日、東京国際フォーラム
4. 安達功武、鈴木幸彦、丹藤利夫、工藤孝志、鈴木香、目時友美、中澤 満
増殖糖尿病網膜症に対する硝子体手術後に両眼の網膜動脈分枝閉塞症を発症した 1 例. 第 71 回日本臨床眼科学会、2016 年 10 月 12-15 日、東京国際フォーラム
5. 工藤朝香、工藤孝志、目時友美、鈴木幸彦、中澤 満
白内障術後の前房内油滴状異物を認めた 1 症例. 第 71 回日本臨床眼科学会、2016 年 10 月 12-15 日、東京国際フォーラム
6. 山内宏大、鈴木幸彦、工藤朝香、工藤孝志、鈴木香、吹田淑子、目時友美、中澤 満
網膜色素変性患者に対する白内障手術の術後成績の検討. 第 120 回日本眼科学会、2016 年 4 月 7-10 日、仙台国際センター
7. 田名部玲子、鈴木幸彦、高橋 静、毛内奈津姫、山内宏大、安達功武、工藤孝志、吹田淑子、中澤 満、櫻庭知己
慢性眼 GVHD による重症ドライアイの角膜穿孔に対する治療経験例. 第 70 回日本臨床眼科学会、2015 年 11 月 3-6 日、京都

国際会議場

8. 江目孝幸、鈴木幸彦、目時友美、高橋 静、山内宏大、工藤孝志、松本光生、中澤 満
インフルエンザ・ワクチン接種後に発症した APMPPE の 1 例。第 70 回日本臨床眼科学会、2015 年 11 月 3-6 日、京都国際会議場
9. 山内宏大、工藤孝志、工藤朝香、中澤 満
右側の蝶形骨洞癌直接浸潤と左側の原因不明の視神経症にて両眼失明に至った 1 例。
第 70 回日本臨床眼科学会、2015 年 11 月 3-6 日、京都国際会議場

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.hirosaki-u.ac.jp/~ophthal/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

工藤孝志 (Kudo, Takashi)
弘前大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：20598718

(2)研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3)連携研究者
なし ()

研究者番号：

(4)研究協力者
なし ()