

令和元年6月20日現在

機関番号：12501
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2016～2018
課題番号：16K11318
研究課題名(和文) 神経保護合剤点眼による視神経挫滅モデル・NMDA投与モデルでの神経保護効果の検討

研究課題名(英文) Effects of combined topical neuroprotective and regenerative agents on degeneration of retina ganglion cells in rat optic nerve crush and NMDA injection models

研究代表者
忍足 俊幸 (Oshitari, Toshiyuki)
千葉大学・大学院医学研究院・特任教授

研究者番号：40546769
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：神経保護合剤の点眼によるin vivoの損傷モデル動物での神経保護・再生促進効果を検討するため、視神経挫滅モデルを用いて検討した。用いた神経保護剤はciticoline, TUDCA, NT-4, citicoline+TUDCA(doublet-1), TUDCA+NT-4(doublet-2), citicoline+TUDCA+NT-4(triplet)である。挫滅後2週間で残存神経細胞・神経線維数、再生距離を計測した。点眼は1日2回とした。NT-4を除いた全ての群で有意に残存神経細胞・線維数が増加した。tripletは単剤に比べ有意に残存細胞・線維数が増加し、再生距離も有意に増加した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

緑内障の神経保護剤として期待されたメマンチンが臨床試験でfailして以来、どの網膜・視神経疾患にも有用な神経保護治療薬が登場してこない状態が続いているが、1つの理由としては、神経細胞死のメカニズムが複雑なため単剤による神経保護剤の治療では限界があることが挙げられる。本研究により、急性疾患のモデルである挫滅モデルで神経保護合剤点眼によって効果が得られる治療が開発される可能性が示された。点眼であれば慢性疾患であっても継続使用が可能であり、慢性の難治性疾患も含めた網膜・視神経疾患の管理において治療戦略の1つとして本研究の治療戦略が臨床応用されることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to determine the effectiveness of combined topical neurotrophic factors in neuroprotection and regeneration in the optic nerve crush model. The neurotrophic factors studied were TUDCA, citicoline, NT-4, TUDCA+citicoline (doublet-1), TUDCA+NT-4 (doublet-2), and citicoline+TUDCA+NT-4(triplet). After two weeks, the number of RGCs and neurofilaments were counted. In all groups except for NT-4, the number of RGCs and neurofilaments were significantly increased. In the triplet group, the numbers were significantly higher than that in all of the single treatment group. In the triplet group, regenerating axons were significantly longer than the control. In conclusion, the combination of the three neurotrophic factors was the most effective way to protect RGCs and regenerate axons after the optic nerve crush.

研究分野：神経保護・再生

キーワード：神経保護 視神経再生 視神経挫滅モデル 点眼 神経保護合剤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

網膜・視神経疾患の多くは病態の最終像に神経細胞死を伴うため、病態の進行は不可逆的でかつ難治性である。そのため神経細胞死を抑制し、神経を保護する治療が数多く検討されてきたが、いまだに有効な治療法が確立されていないのが現状である。1つの理由は神経細胞死の経路が複雑なためある特定の細胞死経路をブロックしても別の経路が活性化され、最終的に神経細胞死が誘導されてしまうことが考えられる。また、もう1つは軸索が変性すると生理的環境下では再生できないため細胞体を保護しても視機能の回復が得られないことが考えられる。我々は単剤による神経保護治療には限界があると考え、神経保護剤併用による神経保護・再生促進効果を *in vitro* の網膜培養システムで検討してきた (Oshitari et al. Invest Ophthalmol Vis Sci 2002, Neuroreport 2002, 2003, Neurosci Lett 2005, Brain Res 2010, Brain Res Bull 2014, Bikbova et al. Brain Res 2013, J Diabetes Res 2015)。また、*In vivo* で神経保護剤を投与する場合、頻回投与が必要になることを考慮すると硝子体投与ではなく点眼による投与が理想的であり、点眼で有効に作用し得る神経保護剤の選択が重要である。また、神経細胞死制御だけでなく軸索を保護し再生させる再生治療戦略を同時に検討しない限り真の神経保護はなし得ないと考えられる。

2. 研究の目的

今回我々は、今までの網膜培養で得られた知見をもとに神経保護剤点眼による神経保護・再生促進効果を *in vivo* の視神経挫滅モデルを用いて検討し、網膜・視神経疾患に対する新しい神経保護剤点眼開発を最終目的とした translational research として本研究を計画した。

3. 研究の方法

in vitro の検討では生後7週のSDラット網膜をコラーゲンのゲルに3次元培養し、培養7日で再生突起数の観察、切片固定後凍結切片を作成しTUNEL染色を施行、同時にJNK・caspase-9の免疫染色を施行した。無血清培養液のみで培養したコントロール群と、高濃度AGEを付加した群を作成、さらにAGE群に種々の栄養因子100 μ M citicoline, 100 μ M TUDCA, 10ng/ml NT-4, citicoline+TUDCA(doublet-1), citicoline+TUDCA (doublet-2), citicoline+TUDCA+NT-4(triplet)を付加した群を作成した。各々の群の再生突起数・GCLにおけるTUNEL陽性率・免疫陽性率を比較検討しANOVAで統計解析を行った。

In vivo の検討ではSDラットの視神経挫滅モデルを用いて、神経保護剤点眼による神経保護・軸索再生効果の検討をした。具体的には視神経挫滅モデルは動脈瘤クリップを用いて常に同じ負荷がかかるように作成した。眼球後方1mmの部位の視神経を10秒間クリップした。クリップ中網膜血流が保たれていることは眼底検査で確認した。視神経挫滅後速やかに神経保護剤の点眼を1日2回開始した。PBS点眼をコントロールとし、100mM citicoline, 100mM tauroursodeoxycholic acid (TUDCA), 10ng/ml neurotrophin-4 (NT-4), citicoline+TUDCA (doublet-1), TUDCA+NT-4 (doublet-2), citicoline+TUDCA+NT-4 (triplet) 7群(各6匹)を作成した。挫滅後2週間で屠殺した群はwhole mount retina標本を作成しBrn3a染色を施行し残余網膜神経節細胞(RGCs)数をカウントした。また、視神経レベルのneurofilament染色で残余軸索数をカウントし、GAP-43染色で再生線維の距離を計測した。屠殺後1週間の群はTUNEL染色で細胞死の計測に用いた。

4. 研究成果

まず、*in vitro* のラット網膜3次元培養の予備実験では、高濃度AGEを負荷した培養群でコントロールに比べ有意に細胞死が増加し、再生突起数が減ることがわかっているが、AGE負荷群で各々の神経栄養因子付加した群100 μ M citicoline, 100 μ M TUDCA, 10ng/ml NT-4, citicoline+TUDCA(doublet-1), citicoline+TUDCA (doublet-2), citicoline+TUDCA+NT-4(triplet)ともに培養7日でTUNEL陽性率・再生突起数は有意に改善したが、tripletは単剤に比べ有意に再生突起数が増加した。また各々の群でJNK, caspase-9免疫活性も有意に減少した。JNK, caspase-9は人糖尿病網膜の変性神経で活性が確認されている細胞死関連因子である(Oshitari et al. Br J Ophthalmol 2008)。これらの結果からいずれの神経保護剤も有意に細胞死を救済し、再生突起数を促進させるが、栄養因子の3種混合剤は他の群に比べて最も有効に細胞死を救済し、再生を促進することが示唆された。また、細胞死経路が培養網膜と人糖尿病網膜で共通していることから、この培養で有用であった神経保護剤は人糖尿病網膜でも有用である可能性が示唆された。*In vitro* の本研究はBioMed Res Intに掲載された(Bikbova G, Oshitari T, Baba T, Yamamoto S. Neuronal changes in the diabetic cornea: perspectives for neuroprotection. BioMed Res Int: Ophthalmology 2016;ID5140823:8 pages)。

次に *in vivo* の視神経挫滅モデルにおいては、NT-4を除いた全ての群で残存RGC数が有意に増

加し、残存軸索数も有意に増加した。また3種混合群(triplet)は単剤投与群に比べ残存神経細胞数及び軸索数は有意に増加した。3種混合群ではTUNEL陽性数は有意に減少し、再生距離数も有意に増加した。ただし、2種混合群の1つ(doublet-1)では副作用として血管新生が網脈絡膜・虹彩に発生した。これは追加での検討も含めた13匹中6匹(62%)で観察された。そのほかの群では血管新生の発生は1匹も見られなかった。Doublet-1の群において強膜・脈絡膜・増殖膜の免疫染色を施行したところVEGFの発現が増加していることが確認され、血管新生の発生にVEGFの発現増加が関与していることが示唆された。このことから、今回試した神経保護剤の点眼は視神経の生存・再生に有用であるが、3種混合剤が神経保護・再生促進に最も有用であった。

Citicolineは神経の脂質2重膜の主要な構成成分であるphosphatidylcholineの中間代謝産物であり、外的に投与されるとphosphatidylcholineに代謝され膜を安定化させる。それと同時にphospholipase A₂の活性を抑えミトコンドリア膜を安定化させると言われておりミトコンドリア安定剤として神経保護作用を発揮している可能性が示唆されている。TUDCA(tauroursodeoxycholic acid)は低分子シャペロンで小胞体ストレスを抑制する作用が示唆されている。NT-4はNGFファミリーの一員で培養で最も神経保護作用・再生促進作用が強かったことが確認されている。点眼においてはciticolineやTUDCAは低分子であり、眼球内や眼球後方から回って視神経に作用すると考えられNT-4より薬剤が作用しやすかったと思われる。今回NT-4点眼は単剤では有意な保護作用を発揮できなかったが、単に濃度が少ないか薬剤が作用しづらかったことが考えられる。しかしながら、3種混合剤では単剤に比べ有意に神経保護・再生促進作用が確認されたことから、低濃度であっても混合剤に含まれていた方がよいことが確認された。また、doublet-1で血管新生が高頻度に発生したがtripletでは血管新生が見られなかったことからNT-4は低濃度であっても血管新生を抑制する効果を持っていることが示唆された。このことから3種混合剤がより安全で有効な治療薬になりうることが示唆された。また、Citicoline+TUDCAの併用群は培養でも試しているが培養では血管新生は見られずin vivoでのみ観察されたが、これは培養では無血清培養液を用いているため血管細胞の維持・増殖が困難であったこと、培養切片がコラーゲンに包埋されているためcontact inhibitionの効果で増殖が抑制されたことが考えられる。一連の研究から薬剤の安全性を考慮するときは培養だけでは不十分で、in vivoでの検討がより重要であることが確認された。

今後は特許申請や慢性疾患モデルへの応用など神経保護剤点眼による様々な視神経・網膜難治性疾患に対する神経保護・再生促進治療の実現に向けて研究を継続していく予定である。

なお、in vivoの本研究はScientific Reports 2019;9:101に掲載された(Kitamura Y, Bikbova G, Baba T, Yamamoto S, [Oshitari T](#). In vivo effects of single or combined topical neuroprotective and regenerative agents on degeneration of retinal ganglion cells in rat optic nerve crush model. Sci Rep 2019;9:101)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計10件)1-10すべて査読有り

1. Kitamura Y, Bikbova G, Baba T, Yamamoto S, [Oshitari T](#). In vivo effects of single or combined topical neuroprotective and regenerative agents on degeneration of retinal ganglion cells in rat optic nerve crush model. Sci Rep 2019;9:101.
2. Tatsumi T, [Oshitari T](#), Takatsuna Y, Arai M, Baba T, Sato E, Yamamoto S. Comparison of efficacy of sub-Tenon versus intravitreal injection of triamcinolone acetonide during cataract surgery for diabetic macular edema. Ophthalmologica 2019;241:17-23.
3. Miura G, Baba T, [Oshitari T](#), Yamamoto S. Relationship between cataract and pupil size on flicker electroretinograms recorded with RETeval system. Clin Ophthalmol 2018;12:427-432.
4. Bikbova G, [Oshitari T](#), Baba T, Bikbov M, Yamamoto S. Diabetic corneal neuropathy: clinical perspectives. Clin Ophthalmol 2018;12:981-987.
5. Baba T, Nizawa T, [Oshitari T](#), Yamamoto S. Surgical outcome of intrascleral fixation of in-the-bag dislocated intraocular lens with or without replacement. J Ophthalmol 2018;ID 7342917:4 pages.
6. Kaiho T, [Oshitari T](#), Tatsumi T, Takatsuna Y, Arai A, Shimizu N, Sato E, Baba T, Yamamoto S. Efficacy of one-year treatment with aflibercept for diabetic macular edema with practical protocol. BioMed Res Int 2017;ID7879691:6 pages.
7. Shimizu N, [Oshitari T](#), Tatsumi T, Takatsuna Y, Arai M, Sato E, Baba T, Yamamoto S. Comparisons of efficacy of intravitreal aflibercept and ranibizumab in eyes with diabetic macular edema. BioMed Res Int: Ophthalmology 2017;ID1747108:7 pages.
8. Bikbova G, [Oshitari T](#), Baba T, Yamamoto S. Combination of neuroprotective and regenerative agents for AGE-induced retinal degeneration (in vitro study). BioMed

Res Int: Ophthalmology 2017;ID8604723:9 pages.

9. Bikbova G, Oshitari T, Baba T, Yamamoto S. Mechanisms of neuronal cell death in AGEs exposed retinas - research and literature review. Curr Diabetes Rev 2017;13(3):280-288.
10. Bikbova G, Oshitari T, Baba T, Yamamoto S. Neuronal changes in the diabetic cornea: perspectives for neuroprotection. BioMed Res Int: Ophthalmology 2016;ID5140823:8 pages.

〔学会発表〕(計13件)

1. 北村裕太 Guzel Bikbova 馬場隆之 山本修一 忍足俊幸 視神経挫滅モデルにおける神経保護薬合剤点眼による視神経再生効果の検討 第123回日本眼科学会総会 2019年04月18日～2019年04月21日(東京国際フォーラム、東京、日本)
2. Oshitari T. Intravitreal Anti-vascular Endothelial Growth Factor Therapies for Diabetic Macular Edema with Practical Protocol. XXVIII Biennial Meeting of the International Society for Eye Research 2018(国際学会)2018年09月09日～2018年09月13日(Belfast, North Ireland)
3. Oshitari T, Kaiho T, Tatsumi T, Takatsuna Y, Arai M, Sato E, Baba T, Yamamoto S. Predictive markers for visual outcomes after one-year treatment with intravitreal aflibercept injection for diabetic macular edema. World Ophthalmology Congress 2018(国際学会)2018年06月16日～2018年06月19日(Barcelona, Spain)
4. Kitamura Y, Oshitari T, Bikbova G, Baba T, Yamamoto S. Neuroprotective effects of topical neurotrophic factors applied individually or in combination on retinal ganglion cells of rats after optic nerve crush. Association of Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting 2018(国際学会)2018年04月29日～2018年05月3日(Honolulu, USA)
5. 北村裕太 忍足俊幸 Guzel Bikbova 山本修一 神経保護合剤点眼によるラット視神経挫滅モデルでの神経保護効果の検討 第122回日本眼科学会総会 2018年04月19日～04月22日(大阪国際会議場、大阪、日本)
6. 忍足俊幸 網膜における糖尿病神経症(Diabetic neuropathy in the retina) 第23回日本糖尿病眼学会総会(招待講演)2017年10月27日～2017年10月29日(京王プラザホテル、東京、日本)
7. Oshitari T, Bikbova G, Baba T, Yamamoto S. Regenerative therapies with combined axoprotectants in AGE-exposed retinas. European Association for Vision and Eye Research 2017(国際学会)2017年09月27日～09月30日(Nice, France)
8. 忍足俊幸 Bikbova Guzel 山本修一 AGE誘導神経細胞死に対する神経栄養因子による神経保護・再性促進効果の検討 第121回日本眼科学会総会 2017年04月06日～2017年04月09日(東京国際フォーラム、東京、日本)
9. Oshitari T, Shimizu N, Tatsumi T, Takatsuna Y, Arai M, Sato E, Yamamoto S. Comparison of efficacy of intravitreal ranibizumab and aflibercept in eyes with diabetic macular edema. European Association for Vision and Eye Research 2016(国際学会)2016年10月05日～10月08日(Nice, France)
10. Oshitari T. Three dimensional retinal cultures for evaluation of neuronal cell death and regeneration. XXII Biennial Meeting of the International Society for Eye Research(招待講演)(国際学会)2016年9月25日～2016年9月29日(Keio Plaza Hotel, Tokyo, Japan)
11. Bikbova G, Oshitari T, Yamamoto S. Neuroprotective and regenerative approach for diabetic retinopathy (in vitro study). XXII Biennial Meeting of the International Society for Eye Research(国際学会)2016年9月25日～2016年9月29日(Keio Plaza Hotel, Tokyo, Japan)
12. 忍足俊幸 網膜神経変性と再生の分子機構 第27回日本緑内障学会(招待講演)2016年09月17日～2016年09月19日(パシフィコ横浜、横浜、日本)
13. 忍足俊幸 ビクビバゲゼル 山本修一 AGE 負荷培養網膜における神経生存・再生と JNK 及び p38 発現の関係 第120回日本眼科学会総会 2016年04月07日～2016年04月10日(仙台国際センター、仙台、日本)

6. 研究組織

(1)研究協力者

研究協力者氏名:グゼル ビクボバ

ローマ字氏名:Guzel Bikbova

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。