

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年5月29日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20302

研究課題名(和文) 緑内障臨床応用を見据えた網膜・眼表面におけるRho kinase阻害薬の作用解明

研究課題名(英文) Investigation of effect of Rho kinase inhibitor on retina and ocular surface for clinical application.

研究代表者

横山 悠 (Yokoyama, Yu)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：00597312

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)：マウスの視神経軸索挫滅モデルにおいて、K115点眼投与において神経保護効果が得られるか検証した。点眼投与で軸索挫滅後7日でのOCTによる網膜厚、PCRを用いた網膜神経節細胞(RGC)マーカーの定量を行った。その結果、明らかな神経保護効果を認めなかった。次に硝子体内投与においてRGC保護効果を検証したところK115による保護効果を認めた。K115の持つ抗炎症作用が神経保護と関連があるとの仮説を立てて、K115投与によりIba-1陽性細胞の変化、定量的PCRによる炎症性サイトカインの発現量を検証した。K115投与でいくつかの炎症性サイトカインの発現に変化を認めたとはいえ、抗炎症作用ははっきりしなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

緑内障はそのRGCの不可逆的障害によって生じる失明疾患で眼圧下降治療以外のエビデンスに基づいた治療はない。

本研究では抗緑内障薬として使用されるリパスジル(K115)の持つ神経保護薬としての効果を検証した。本研究でK115硝子体内投与によりマウスの視神経軸索挫滅モデルで神経保護効果を確認することができた。K115の持つ抗炎症作用が神経保護に関与するという仮説を立てて、Iba-1陽性細胞の変化と炎症性サイトカインの発現を検証した。K115投与でいくつかの炎症性サイトカインの発現に変化をみとめたが抗炎症作用ははっきりしなかった。K115の持つ神経保護効果の検証にはさらに研究が必要と思われた。

研究成果の概要(英文)：In the present study, I examined whether K115 eye drop administration could provide a neuroprotective effect in an optic nerve crush model in mice. For assessment of neuroprotection, the retinal thickness were measured by OCT and quantification of retinal ganglion cell marker using PCR were performed 7 days after optic nerve crush in mice which were administrated K115. As a result, no clear neuroprotective effect was observed. Next, when the retinal ganglion cell protective effect was examined in intravitreal administration, the protective effect by K115 was observed. The changes in Iba-1 positive cells and the expression of inflammatory cytokines by qPCR were examined in nerve crush model with K115 administration, on the hypothesis that the anti-inflammatory effect of K115 is related to neuroprotection. Although K115 administration changed the expression of some inflammatory cytokines, the anti-inflammatory effect was not clear.

研究分野：神経保護

キーワード：緑内障 神経保護 Rho kinase阻害薬 K115 リパスジル

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

### 1. 研究開始当初の背景

緑内障は眼圧に依存して進行する視野障害を来す疾患である。緑内障は失明原因第一位の疾患であり、40歳以上の有病率は約5%と非常に高い。加齢とともにその有病率は増加することから、超高齢化社会を迎える日本において大きな社会問題となっている。現在、エビデンスのある治療法は眼圧を下げるのみであり、眼圧下降療法による病状進行の抑制が、唯一の治療戦略である。しかしながら、眼圧を下降させても視野障害が進行する症例も見られる。このことは、緑内障が多因子疾患であることを示唆しており、緑内障病態の解明と新たな治療法の開発が求められている。申請者らの所属する東北大学では早くよりこの問題に取り組み、その研究成果を社会に貢献するべく発表してきた。緑内障における不可逆的視野障害は軸索障害より生じる網膜神経節細胞(RGC)死によりもたらされる。その病態は非常に複雑であり、これまでの研究では、圧障害、軸索障害、慢性虚血、興奮毒性、慢性炎症、酸化ストレス、ERストレスの病態への関与が報告されている。この相互に関連しあう複雑な障害メカニズムを解明するために、以前に東北大学ではマウスの視神経挫滅モデルを用いて網膜内のトランスクリプトームを網羅的に調べ、ERストレスや、酸化ストレスが重要であることを報告した。しかしながら世界中で様々な病態解明のための研究がなされているにもかかわらず、依然として緑内障病態には不明な点が多い。超高齢化社会を迎え、状況は切迫しており、眼圧下降治療とともに新たな緑内障治療戦略が求められている。

ROCKは分子量約160kDaのセリンスレオニンリン酸化酵素である。ROCKの生体内における役割は平滑筋の収縮弛緩、細胞遊走、細胞骨格への作用、遺伝子発現など非常に多岐にわたる。RGCにもROCKは分布しているがその役割は解明されていない。近年、我が国より世界に先駆けてROCK阻害薬による眼圧下降作用を有する点眼薬が市販された。線維柱帯の房水流出抵抗を下げ、房水排出の主経路であるシュレム管からの房水排出を促進する作用を有する。Rho-ROCKパスウェイが関与する系は非常に複雑で眼組織においても眼圧下降作用以外にも多様な作用を持つことが考えられ、緑内障の複雑な病態に関与する可能性が考えられている。既に申請者のグループでは緑内障病態因子の一つと考えられる酸化ストレスにRho-ROCKパスウェイが関与していることを見だし、神経保護薬としての可能性を報告している。本研究ではこの研究をさらに前進させたものであり、緑内障治療としてのROCK阻害薬の可能性を探る。本研究では、マウスを用いて、RGC障害モデルを作成し、様々な病態により惹起されるRGC障害に対して、Rho-ROCKパスウェイがどのように関与するか調べる。また、緑内障術後管理薬として新たな可能性を探るべく検討する。

### 2. 研究の目的

本研究では緑内障治療においてROCK阻害薬が眼圧下降作用以外に緑内障病態においてどのような薬効作用があるかに焦点を当て1) RGC障害におけるRho kinase (ROCK)の神経保護効果の検討を行う。ROCK阻害薬の神経保護薬としての効果を検証しそのメカニズムを解明する。これにより、ROCK阻害薬点眼液の眼科領域での新たな臨床応用を見出すことを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 1) RGC障害におけるROCK阻害薬(K115)の神経保護効果の検討

RGC障害の誘導の手法として、マウス(C57BL/6)の視神経挫滅モデルを、ROCK阻害薬としてK115を用いた。濃度の異なるK115点眼液とプラセボを1週間点眼投与して、視神経挫滅を行う。1週間後にRGCを形態学的評価(RGCカウント、光干渉断層計(optical coherence tomography: OCT)による神経節細胞層の厚みの定量化)、定量的PCRを用いたRGCマーカーや関連遺伝子の発現評価などを行う。

#### 2) 神経挫滅モデルにおける炎症発現とK115の炎症反応に与える効果

視神経挫滅により誘導される炎症性細胞の分布、サイトカインの発現も定量する。またROCKを阻害することで、これらの下流の変化を定量し、Rho-ROCKパスウェイの役割を明らかにすることで神経保護薬としてのROCK阻害薬の可能性を探る。

### 4. 研究成果

K115の点眼濃度を0.4%、0.8%、またプラセボを点眼液として、マウス1日2回1週間投与のち視神経挫滅を行った。1週間後にフルオロゴールドで網膜神経節細胞(RGC)を逆行性染色したのち網膜フラットマウント標本作製しRGC密度を計測した。また、OCTによる生体内での網膜厚の評価、採取した網膜の定量的PCRを用いたRGCマーカーの発現比較を行った。その結果RGC密度、網膜厚、RGCマーカーの発現頻度において3群間に有意差を認めなかった。

点眼回数を4回に変更して同様の実験をおこなったが、3群間に有意差を認めなかった。

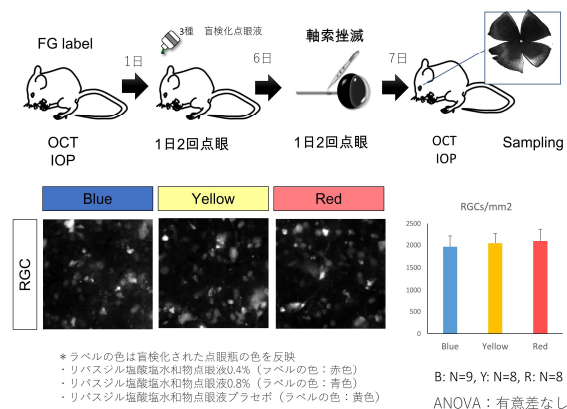


図1 K115点眼投与と軸索挫滅後RGC密度

そのため投与方法を再検討して硝子体注射で K115 を投与し、視神経挫滅後 5 日での RGC の染色を行い、生存 RGC の評価を行ったところ PBS 硝子体投与群と 30 $\mu$ M/2 $\mu$ l の K115 硝子体投与群では有意差を認めた (図 2)。

既報より ROCK 阻害薬が抗炎症に働くことより着想を得て、神経保護効果が K115 の抗炎症作用によるものという仮説を立てて上記の研究の方法 2) を行うこととした。予備実験において軸索挫滅後のマイクログリア、マクロファージは軸索挫滅後 5 日で最も眼内において多く発現していることを確認した。そこでマウスに 30 $\mu$ M/2 $\mu$ l の K115 硝子体投与群と PBS 硝子体投与群に割り付けて軸索挫滅後 5 日で Iba-1 陽性細胞と定量的 PCR で各種炎症性サイトカイン発現を比較したところ明らかな抗炎症作用を認めなかった (図 4, 図 5)。

そこで評価する時点を視神経軸索挫滅後 4 日として、硝子体注射と腹腔内投与併用、また経口投与でも同様の実験を行った。経口投与において IL-1b に有意差を認めたが、他の炎症性サイトカインでは有意差を認めなかった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：なし

ローマ字氏名：なし

所属研究機関名：なし

部局名：なし

職名：なし

研究者番号 (8 桁)：

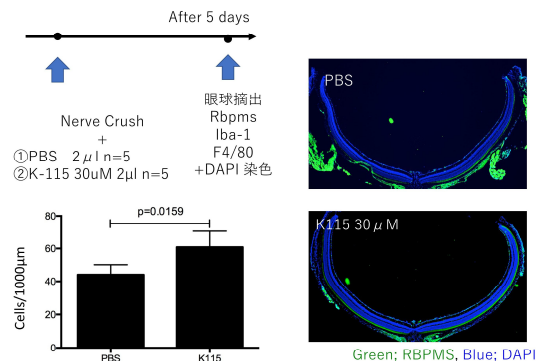


図 2 K115 硝子体投与と軸索挫滅後 RGC 密度

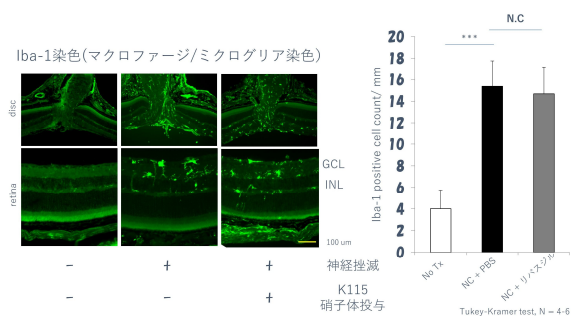


図 3 軸索挫滅 5 日後の Iba-1 陽性細胞

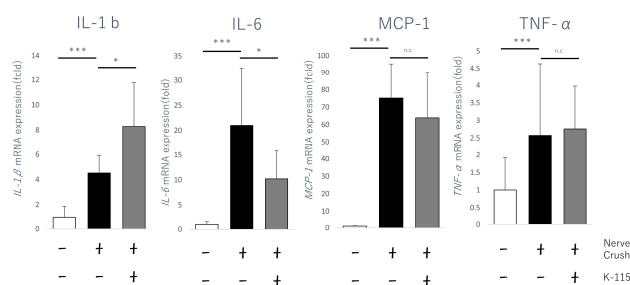


図 4 軸索挫滅 5 日後の炎症性サイトカイン発現硝子体投与

(2)研究協力者

研究協力者氏名：なし

ローマ字氏名：なし

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。