

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2006～2008

課題番号：18209053

研究課題名（和文）網膜神経節細胞障害：局所・中枢における高次細胞障害機構とその保護・再生治療の研究

研究課題名（英文）Damage of retinal ganglion cells: Mechanism of the cell death in the local and central nervous system and protection and regeneration of the neural cells.

研究代表者

新家 眞（ARAIE MAKOTO）

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：00092122

研究成果の概要：

(1) **マウス、ラット眼を用いた緑内障性神経細胞障害の in vitro での解析**: 各種ストレス(酸化ストレス、低酸素ストレス、グルタミン酸負荷)による RGC 障害に対する保護作用を各種薬剤(遮断薬、Bax inhibitory peptide、フラボノイド)について検討した。(2) **マウス眼を用いた緑内障性神経細胞障害の in vivo での解析**: 網膜神経節細胞(RGC)に特異的蛍光を発する CFP マウスの眼底撮影により網膜細胞を直接観察し、虚血再灌流による神経細胞死を生体内で評価できた。マウスの加齢に伴う RGC の自然減少を検討した。(3) **マウス及び猿緑内障モデル眼の中枢神経系における機能及び構造の解析**: サル緑内障眼では脳内で障害を受けたマイクログリアに集積する末梢方ベンゾジアゼピンのトレーサーの集積と c-fos 遺伝子の発現などの変化を脳内で検討した。マウスでは NMDA 投与 7 日以降に、対側の LGN において特異的に NeuN 陽性細胞の細胞体の収縮が認められた。(4) **金魚とマウスでの視神経障害時に発現する遺伝子・分子の解析**: 視神経が再生可能な魚の損傷網膜から再生関連分子を見つけ、その再生に果たす役割を調べると共に視神経が再生できないラットの眼球に導入し、その再生効果を検証した。IGF-1、プルプリン、トランスグルタミナーゼといった分子が金魚の視神経再生に重要な役割を果たすことが分かった。これら再生分子の挙動をラット損傷モデルで調べた所、金魚とは異なり、むしろ活性或いは発現が損傷後速やかに消退・消失した。そこでこれら再生分子をラット網膜内へ蛋白、遺伝子レベルで導入した所 in vitro、in vivo 両面でラットの視神経再生を促進し有用であることが証明された。(5) **網膜幹細胞、間葉系幹細胞を用いた RGC 再生の検討**: 網膜幹細胞、間葉系幹細胞を用いた RGC 再生の検討: 骨髄間葉系幹細胞の分泌する因子が、培養されたにおいて視細胞前駆細胞に保護的に作用することを見いだした。RCS ラットにおいて骨髄間葉系幹細胞の網膜下移植により、形態学的、機能的に網膜変性が抑制されることが判明した。さらに、骨髄幹細胞が錐体視細胞、桿体視細胞の両方に対して保護効果があることが判明した。

交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	15,800,000	4,740,000	20,540,000
2007 年度	14,800,000	4,440,000	19,240,000
2008 年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
年度			
年度			
総計	38,000,000	11,400,000	49,400,000

研究分野: 医歯薬学

科研費の分科・細目: 外科系臨床医学・眼科学

キーワード: 脳・神経、網膜神経節細胞、緑内障、神経保護、神経再生

### 1. 研究開始当初の背景

最近、緑内障においては網膜神経節細胞 (RGC)のみならず視皮質に至る中枢にまで不可逆的な神経病変及びニューロン・シナプス系の再構築が存在することを示唆する研究結果が複数報告され、又、視神経切断後に神経が再生する金魚の視神経再生に関与する多くの分子や遺伝子を見出されている。これらの結果は中枢まで及ぶ高次細胞的な影響を及ぼす RGC 障害に対する真に有効な神経保護治療の開発・評価のためには単科(眼科)的なアプローチや従来のマウス、猿、家兎などを用いた研究だけでは限界があること、及び、脳神経科学や脳代謝学などを含めた多方向からの検討や異なる動物種から得られた知見の応用などが不可欠であることが明らかになりつつあった。

### 2. 研究の目的

新築らがこれまで進めてきた RGC を主たるターゲットとしたマウス、ラット、家兎及び猿を用いた研究をより発展させるとともに、魚類を主たる対象とし RGC を含めた神経細胞の再生に関する研究を行ってきた加藤、猿の実験緑内障モデルにおける脳の組織的・機能的変化の検討などを進めてきた原との共同研究により、RGC 障害を視覚系全体の一次・二次ニューロンやグリア系を含む高次細胞障害としてとらえ、その機構を眼科及び神経科学的手法を駆使して多方面から解明し、それに基づいて RGC - 中枢神経系障害のより有効な神経保護的治療法の確立し、更に再生医療の可能性につき検討するものである。

### 3. 研究の方法

(1) 各種ストレスによる RGC 障害に対する保護作用を各種薬剤について検討した。

酸化ストレス負荷に対する 遮断薬の神経保護効果

酸化ストレス、低酸素、グルタミン酸負荷に対する HMGCoA 合成酵素阻害薬ピタバスタチンの神経保護効果

酸化ストレス、低酸素、グルタミン酸負荷に対するプリモニジンの神経保護効果

グルタミン酸および酸化ストレス負荷に対する Bax inhibitory peptide の神経保護効果

イオンチャネル型グルタミン酸受容体を介した細胞死に対する Bax inhibitory peptide の神経保護効果

酸化ストレス、低酸素、グルタミン酸負荷に対するフラボノイドの神経保護効果

(2) CFP の発現の組織学的検討と眼底カメラによる in vivo 経時的 RGC 撮影方法

視神経挫滅モデルおよび虚血再灌流モデルによる神経細胞死の in vivo 経時的变化

経時的 RGC 撮影による自然減少率の検討

(3) マウス及びサル緑内障モデル眼の中枢神経系における機能及び構造の解析

(4) 網膜神経細胞死における小胞体ストレスの関与

(5) 金魚の視神経切断網膜と正常網膜とのディファレンシャルハイブリダイゼーション

(6) 網膜幹細胞、間葉系幹細胞を用いた RGC 再生の検討

### 4. 研究成果

(1) **酸化ストレス負荷による細胞死の形態**: 酸化ストレス負荷による細胞死の形態を確認するため、負荷後2時間でネクローシス、アポトーシスの判別を行った。アポトーシス細胞はコントロール群  $17.0 \pm 7.7\%$ 、酸化ストレス群  $22.3 \pm 3.6\%$ 、E-64-d 群  $22.0 \pm 4.9\%$ 、Ca-074 Me 群  $26.6 \pm 5.5\%$ 、staurosporine 群  $40.1 \pm 7.1\%$  となり、staurosporine 群でアポトーシス細胞率が有意に高かった。 ( $p < 0.05$  by Tukey test). cathepsin B 阻害薬(E-64-d) thiol protease 阻害薬 (Ca-074 Me) 共に細胞死に影響がなかった。ネクローシス細胞はコントロール群、酸化ストレス群、E-64-d、Ca-074 Me、staurosporine 群それぞれ  $14.3 \pm 4.9\%$ 、 $49.6 \pm 7.6\%$ 、 $22.5 \pm 4.7\%$ 、 $21.8 \pm 3.9\%$ 、 $36.3 \pm 13.1\%$ であった。酸化ストレス群と staurosporine 群のネクローシス細胞率はコントロール群より有意に高かった。 ( $p < 0.05$  by Tukey test). E-64-d and Ca-074 Me 群のネクローシス細胞率はコントロール群より有意に低かった ( $p < 0.05$ )がコントロール群と差がなかった。従って、酸化ストレスによる細胞死は主にネクローシスであることが判明した。 **1-2 酸化ストレス負荷による細胞死と 遮断薬の抑制効果**: **チモロール**: 酸化ストレスに対してチモロール無添加群での RGC 生存率は  $58.3 \pm 5.6\%$ 、一方チモロール添加 1nM, 10nM, 100nM 群ではそれぞれ  $62.5 \pm 6.2\%$ 、 $68.4 \pm 6.8\%$ 、 $75.2 \pm 6.5\%$ であった ( $n=8$ )。10nM, 100nM のチモロールは有意に RGC 生存率を増加させた(Dunnet test,  $p < 0.01 - 0.05$ )。 **ベタキソロール**: 酸化ストレスに対してベタキソロール無添加群での RGC 生存率は  $59.8 \pm 4.8\%$ 、一方ベタキソロール添加 10nM, 100nM, 1 $\mu$ M 群ではそれぞれ  $63.2 \pm 8.8\%$ 、 $69.2 \pm 8.6\%$ 、 $71.0 \pm 7.2\%$ であった ( $n=8$ )。100nM, 1 $\mu$ M のベタキソロールは有意に RGC 生存率を増加させた (Dunnet test,  $p < 0.01 - 0.05$ )。 **カルテオロール**: 酸化ストレスに対してカルテオロール無添加群、添加 10nM, 100nM, 1 $\mu$ M 群の RGC 生存率は  $52.5 \pm 9.9\%$ 、 $53.2 \pm 15.3\%$ 、 $55.0 \pm 14.4\%$ 、 $53.1 \pm$

18.5%であった。(n=8)カルテオロールは酸化ストレスに対して全く効果がなかった。**ニブラジロール**:酸化ストレスに対してニブラジロール無添加群でのRGC生存率は $57.8 \pm 6.2\%$ 、一方ニブラジロール添加10nM, 100nM, 1 $\mu$ M 群ではそれぞれ $63.0 \pm 7.2\%$ ,  $69.3 \pm 7.2\%$ ,  $73.7 \pm 7.1\%$ であった(n=8)。100nM, 1 $\mu$ Mのニブラジロールは有意にRGC生存率を増加させた(Dunnett test,  $p < 0.01$  -  $0.05$ )。

**酸化ストレス、低酸素、グルタミン酸負荷に対するHMGCoA合成酵素阻害薬ピタバスタチンの神経保護効果**:酸化ストレス負荷1日後、RGC生存率は、無添加群で55.8%、添加群(濃度10-6, 10-7, 10-8M)でそれぞれ、74.2%、69.2%、60.5%であった。10-6, 10-7M添加群は無添加群に比べ有意に生存率が高かった( $P < 0.05$ )。酸化ストレス負荷、低酸素負荷、グルタミン酸負荷を加えたラットRGCに対し、ピタバスタチンは用量依存的に生存率を上昇させ、神経保護効果を有する可能性が示唆された。また、メバロン酸追加により、ピタバスタチンによる生存率は有意に低下し、保護効果が消失した。

**酸化ストレス、低酸素、グルタミン酸負荷に対するプリモニジンの神経保護効果**:酸化ストレス負荷:酸化ストレス負荷群の細胞生存率は $59.3 \pm 4.1\%$ であったのに対し、プリモニジン0.01 M, 0.1 M, 1.0 M添加群では $61.8 \pm 7.1\%$ ,  $68.3 \pm 6.2\%$  and  $79.8 \pm 4.7\%$ であり、プリモニジン1.0 M添加群で有意に生存率が上昇した。(n=7,  $P=0.845$ ,  $0.064$  and  $< 0.001$  respectively)。酸化ストレス負荷に効果的な1.0 $\mu$ Mプリモニジンに対するヨヒンピンの効果を検討したところ、プリモニジン単独添加群で有意に生存率が上昇したが( $P < 0.001$ )ヨヒンピン、プリモニジン両添加群は $37.8 \pm 5.1\%$ となり、プリモニジン無添加群と有意差がなかった。(P=0.215)。ヨヒンピン単独添加群( $38.4 \pm 4.1\%$ )でも有意差がなかった(P=0.342)。従って、プリモニジンの酸化ストレスに対する保護効果は $\alpha$ 2受容体を介していることが判明した。低酸素負荷:低酸素負荷群の細胞生存率は $52.4 \pm 6.2\%$ であったのに対し、プリモニジン0.01 M, 0.1 M, 1.0 M添加群では $57.6 \pm 5.9\%$ ,  $72.3 \pm 9.9\%$ ,  $77.4 \pm 7.7\%$ であり、プリモニジン0.1 M, 1.0 M添加群で有意に生存率が上昇した。(n=7,  $P=0.429$ ,  $0.004$  and  $< 0.001$  respectively)。低酸素負荷に効果的な1.0 $\mu$ Mプリモニジンに対するヨヒンピンの効果を検討したところ、プリモニジン単独添加群で有意に生存率が上昇したが( $P < 0.001$ , 図 )ヨヒンピン、プリモニジン両添加群はプリモニジン無添加群と有意差がなかった。(P=0.9263)。ヨヒンピン単独添加群( $38.4 \pm 4.1\%$ )でも有意差がなかった(P=0.9628)。従って、プリモニジンの低酸素に対する保護効果も $\alpha$ 2受容体を介していることが判明した。グルタミン酸負荷:  
グルタミン酸負荷群の細胞生存率は $58.2 \pm 12.5\%$ であったのに対し、プリモニジン

0.01 M, 0.1 M, 1.0 M添加群では $56.8 \pm 11\%$ ,  $64.5 \pm 11\%$ ,  $80.6 \pm 7.7\%$ であり、プリモニジン0.1 M, 1.0 M添加群で有意に生存率が上昇した。(n=7,  $P=0.990$ ,  $0.564$  and  $=0.002$  respectively)。グルタミン酸負荷に効果的な1.0 $\mu$ Mプリモニジンに対するヨヒンピンの効果を検討したところ、プリモニジン単独添加群で有意に生存率が上昇したが( $P < 0.001$ , 図 )ヨヒンピン、プリモニジン両添加群( $51.9 \pm 7.4\%$ )はプリモニジン無添加群と有意差がなかった。(P=0.9263)。ヨヒンピン単独添加群( $58.2 \pm 7.7\%$ )でも有意差がなかった(P=0.9628)。従って、プリモニジンのグルタミン酸に対する保護効果も $\alpha$ 2受容体を介していることが判明した。

**グルタミン酸および酸化ストレス負荷に対するBax inhibitory peptideの神経保護効果**:グルタミン酸負荷に対するBIPの濃度依存的細胞死抑制効果:72時間25 $\mu$ Mグルタミン酸負荷により、80.2%であったRGC細胞生存率は、VPTLK10 $\mu$ M添加群、88.4%、50 $\mu$ M添加群92.8%、200 $\mu$ M添加群95.7%と濃度依存的に増加した。VPTLK添加50 $\mu$ Mおよび200 $\mu$ Mではコントロール群と比べ有意に細胞死を抑制した( $p < 0.05$  vs. control by Dunnett test)。一方negative control peptideのKLPVTは全く効果がなかった。酸化ストレス負荷に対するBIPの濃度依存的細胞死抑制効果:72時間25 $\mu$ M酸化ストレス負荷により、77.4%であったRGC細胞生存率は、VPTLK10 $\mu$ M添加群、73.7%、50 $\mu$ M添加群75.7%、200 $\mu$ M添加群74.7%であり、コントロール群と比べ有意差がなかった。またnegative control peptideのKLPVTも全く効果がなかった。

**イオンチャンネル型グルタミン酸受容体を介した細胞死に対するBax inhibitory peptideの神経保護効果**:ラットin vivoにおけるNMDA負荷による網膜障害に対するBIPの効果:内網状層の厚みはNMDA群で $23.2 \pm 1.9 \mu\text{m}$  (n=13)、コントロール群 $43.2 \pm 2.0 \mu\text{m}$  (n=12)、VPTLK同時投与群、 $32.0 \pm 0.95 \mu\text{m}$  (n=11)、KLPVT同時投与群 $26.6 \pm 1.1 \mu\text{m}$  (n=7)であり、VPTLK同時投与によりNMDAによる網膜障害を有意に抑制した( $p=0.006$  by Dunnett test)。MK-801同時投与群では $38.1 \pm 2.4 \mu\text{m}$  (n=10)であり、NMDA群より有意に厚く障害が抑制されていた( $p=0.005$  by Dunnett test)。NMDA群での網膜RGC細胞数は $1746 \pm 51/\text{mm}^2$  (n=10)でありコントロール群より有意に減少した。(2696  $\pm$  75/ $\text{mm}^2$ , n=10;  $P=0.004$  by Dunnett test)。NMDAおよびVPTLKまたはKLPVT同時投与群では $2158 \pm 87/\text{mm}^2$  (n=9)または $1813 \pm 107/\text{mm}^2$  (n=10)であり、VPTLK同時投与群ではNMDA単独群より有意に多かった( $p=0.003$  by Dunnett test, respectively)。NMDAおよびMK801同時投与群では( $2372 \pm 82/\text{mm}^2$ ; n=10)NMDA単独群より有意に多かつ

た ( $p=0.003$ , by Dunnett test).従って、VPTLK はNMDAによる網膜障害を組織レベルでも細胞数計数でも有意に抑制した。ラット in vivoにおける Kinase 負荷による網膜障害に対する BIP の効果:内網状層の厚みは KA 群で  $19.3 \pm 1.5\mu\text{m}$  ( $n=13$ )、コントロール群  $40.9 \pm 1.5\mu\text{m}$  ( $n=12$ )、VPTLK 同時投与群、 $33.2 \pm 1.8\mu\text{m}$  ( $n=13$ )、KLPVT 同時投与群  $21.9 \pm 1.1\mu\text{m}$  ( $n=13$ )であり、VPTLK 同時投与により KA による網膜障害を有意に抑制した ( $p=0.004$  by Dunnett test). DNQX 同時投与群では  $37.8 \pm 1.4\mu\text{m}$ ;  $n=9$  であり、KA 群より有意に厚く障害が抑制されていた ( $p=0.003$  by Dunnett test). KA 群での網膜 RGC 細胞数は  $1787 \pm 71/\text{mm}^2$  ( $n=10$ )でありコントロール群より有意に減少した。( $2894 \pm 100/\text{mm}^2$ ,  $n=5$ ;  $P=0.003$  by Dunnett test). KA および VPTLK または KLPVT 同時投与群では  $2488 \pm 57.8/\text{mm}^2$  ( $n=9$ )または  $1798 \pm 66.0/\text{mm}^2$  ( $n=10$ )であり、VPTLK 同時投与群では NMDA 単独群より有意に多かった( $p=0.003$  by Dunnett test, respectively). KA および DNQX 同時投与群では ( $2711 \pm 104/\text{mm}^2$ ;  $n=5$ ) KA 単独群より有意に多かった ( $p=0.003$ , by Dunnett test).従って、VPTLK は KA による網膜障害を組織レベルでも細胞数計数でも有意に抑制した。

**酸化ストレス、低酸素、グルタミン酸負荷に対するフラボノイドの神経保護効果:**酸化ストレスに対するフラボノイドの効果:酸化ストレス負荷無添加群の生存率は 42.5%であったのに対し、Kaempferol 3-o-rutinoside 1nM, 10nM, 100nM 添加群の生存率は 46.5%, 58.3%, 66.3%であった。Quercetin 3-o-rutinoside 0.01nM, 0.1nM, 1nM 添加群の生存率は 42.6%, 70.2%, 72.7%であった。Quercetin 3-o-rhamnoside 10nM, 100nM, 1000nM 添加群の生存率は 67.4%, 80.0%, 76.5%であった。Kaempferol 3-o-rutinoside 10nM, 100nM 添加群, Quercetin 3-o-rutinoside 0.1nM および 1nM 添加群, Quercetin 3-o-rhamnoside 100nM および 1000nM 添加群は有意に生存率が高かった。 ( $p<0.05$  vs. control by Dunnett test,  $n=10$ ). Kaempferol 3-o-rutinoside, Quercetin 3-o-rutinoside, Quercetin 3-o-rhamnoside いずれも酸化ストレス負荷に対して保護効果を示したが、特に Quercetin 3-o-rutinoside は 0.1nM の極めて低濃度で効果を示した。低酸素に対するフラボノイドの効果  
低酸素負荷無添加群の生存率は 55.0%であったのに対し、Kaempferol 3-o-rutinoside 0.1nM, 1nM, 10nM 添加群の生存率は 54.3%, 62.3%, 73.8%であった。Quercetin 3-o-rutinoside 0.1nM, 1nM, 10nM 添加群の生存率は 58.4%, 64.3% and 76.7%であった。 Quercetin 3-o-rhamnoside 10nM, 100nM, 1000nM 添加群の生存率は 56.9%, 72.0% and 76.0%であった。 Kaempferol 3-o-rutinoside, Quercetin 3-o-rutinoside 1nM

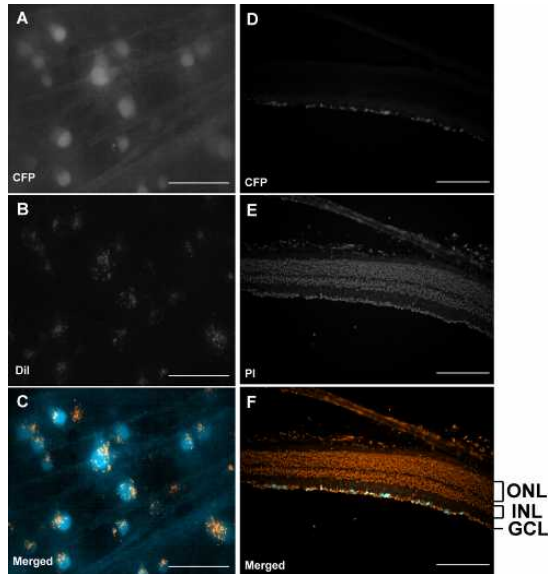
および 10nM 添加群, Quercetin 3-o-rhamnoside 100nM および 1000nM 添加群は有意に生存率が高かった。 ( $p<0.05$  vs. control by Dunnett test,  $n=8$ ). Kaempferol 3-o-rutinoside, Quercetin 3-o-rutinoside, Quercetin 3-o-rhamnoside いずれも低酸素負荷に対して保護効果を示したが、特に Kaempferol 3-o-rutinoside, Quercetin 3-o-rutinoside は 1nM の低濃度で効果を示した。グルタミン酸負荷に対するフラボノイドの効果  
グルタミン酸負荷無添加群の生存率は 61.8%であったのに対し、Kaempferol 3-o-rutinoside 0.1nM, 1nM, 10nM 添加群の生存率は 56.7%, 69.0%, 77.9%であった。 Quercetin 3-o-rutinoside 0.1nM, 1nM, 10nM 添加群の生存率は 68.5%, 79.5%, 87.6%であった。 Quercetin 3-o-rhamnoside 10nM, 100nM, 1000nM 添加群の生存率は 58.2%, 73.0%, 80.0%であった。 Kaempferol 3-o-rutinoside, Quercetin 3-o-rutinoside 1nM および 10nM 添加群, Quercetin 3-o-rhamnoside 100nM および 1000nM 添加群は有意に生存率が高かった。 ( $p<0.05$  vs. control by Dunnett test,  $n=10$ ). Kaempferol 3-o-rutinoside, Quercetin 3-o-rutinoside, Quercetin 3-o-rhamnoside いずれもグルタミン酸負荷に対して保護効果を示したが、特に Kaempferol 3-o-rutinoside, Quercetin 3-o-rutinoside は 1nM の低濃度で効果を示した。

(2) CFP の発現の組織学的検討と眼底カメラによる in vivo 経時的 RGC 撮影方法

**視神経挫滅モデルおよび虚血再灌流モデルによる神経細胞死の in vivo 経時変化:** in vivo において、既存の眼底カメラを用いて鮮明な CFP の蛍光をとらえることができ、RGC を可視化することができた。(図 A,B)現在の主流は網膜 whole mount 標本を作製して、蛍光顕微鏡で観察し数を数える方法であるため、今回は同一部位を撮影したものと比較した(図 C)。B と C を比較してわかるように、眼底写真による細胞イメージと whole mount に全く差がないことがわかった。また、本法では経時的に同一眼同一部位の細胞を追うことが可能であるために、DE のように一週間で消失する単一細胞までも確認することができた。

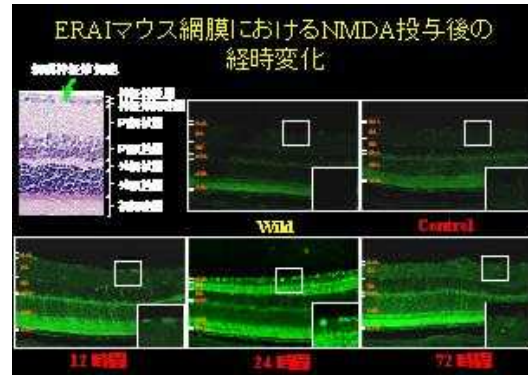
**経時的 RGC 撮影による自然減少率の検討:** 0 週から 4 週まで経時的に測定した。モデルマウス 5 匹を用いた。コントロール群とくらべ 1 週間以降有意に細胞減少していることがわかる。 ( $p<0.01$ , paired t-test) 術前を 100%とすると、1 週間以降隔週  $34.2 \pm 7.5\%$ ,  $24.1 \pm 9.1\%$ ,  $23.0 \pm 9.3\%$ ,  $22.2 \pm 8.4\%$  (mean  $\pm$  S.D.,  $n=5$ ) と減少した。一方コントロール群は変化がなく、 $100.5 \pm 4.1\%$ ,  $100.4 \pm 3.5\%$ ,  $101.4 \pm 2.3\%$ ,  $100.0 \pm 3.0\%$  (mean  $\pm$  S.D.,  $n=7$ ) であっ

た。



(3) マウス及びサル緑内障モデル眼の中樞神経系における機能及び構造の解析: マウス網膜組織障害は NMDA 投与 1 日後から観察され、その障害の大半は 7 日後までに観察された。視索は NMDA 投与 7 日後から厚み及び面積に有意な減少が認められた。NMDA 投与 7 日以降に、対側の LGN において特異的に NeuN 陽性細胞の細胞体の収縮 (soma size の減少) が認められ、投与 90 日以降に細胞死が認められた。また、この LGN 領域における神経変性過程において NMDA 投与 7 及び 30 日後に GFAP 陽性細胞の有意な増加が認められ、BDNF 陽性細胞の発現の上昇が対側の LGN で NMDA 投与 7、90 及び 90 日後に認められた。しかしながら、同側の LGN において有意な変化は認められなかった。カニクイサルを用いてレーザー照射による片眼慢性眼圧上昇モデルを作成し、処置眼の眼圧上昇並びに視神経乳頭には緑内障に特徴的な形態的变化の生じていること形態学的に確認した。さらに、レーザー照射 4 ヶ月後に屠殺して脳内で障害を受けたマイクログリアに集積する末梢方ベンゾジアゼピンのトレーサー [11C](R)-PK11195 の集積と c-fos 遺伝子の発現などの変化を脳内で検討した。視覚経路にある外側膝状体において、トレーサーの蓄積、並びに皮質視覚野において c-fos 遺伝子の発現上昇が認められた。

(4) 網膜神経細胞死における小胞体ストレスの関与: 本研究においては既に確立している In vitro (網膜神経節細胞、PC12 細胞) 及び In vivo (網膜神経細胞の病理組織学的評価) のモデルを用いて、ツニカマイシンまたは NMDA による神経細胞における小胞体ストレスの詳細な機序について明らかにした。ERA1 マウスを用いて、網膜神経障害と小胞体ストレスの関係を個体レベルで経時的に検討した。



(5) 金魚の視神経切断網膜と正常網膜とのディフェレンシャルハイブリダイゼーション: 金魚の視神経再生分子として IGF-1、プルプリン、トランスグルタミナーゼを見つけた。ラット視神経損傷網膜では、これら分子は損傷後速やかに発現が減少した。そこでリコンビナント再生蛋白をラットの眼球、損傷部位に直接投与または AAV ベクターを介して投与した所、視神経の再生が促進された。以上、金魚で見つけた再生分子が哺乳類にも有用であることが判明した。

(6) 網膜幹細胞、間葉系幹細胞を用いた RGC 再生の検討: 骨髄間葉系幹細胞の分泌する因子が、培養されたにおいて視細胞前駆細胞に保護的に作用することを見いだした。更に、骨髄間葉系幹細胞を網膜変性モデルの RCS ラット網膜下に移植し、組織学的および電気生理学的に検討したところ、RCS ラットにおいて骨髄間葉系幹細胞の網膜下移植により、形態学的、機能的に網膜変性が抑制されることが判明した。さらに、骨髄幹細胞が組織学的検討および遺伝子発現の検討により錐体視細胞、桿体視細胞の両方に対して保護効果があることが判明した。

## 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 39 件)

1. Koriyama Y, yasuda R, Homma K, Mawatari K, Nagashima M, Sugitani K, Matsukawa T, Kato S., Nitric oxide-cGMP signaling regulates axonal elongation during optic nerve regeneration in the goldfish in vitro and in vivo. J. Neurochem. in press. (査読有り)
2. Murata H, Aihara M, Chen YN, Ota T, Numaga J, Araie M. Imaging Mouse Retinal Ganglion Cells and Their Loss in vivo by a Fundus Camera in the Normal and Ischemia-Reperfusion Model. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2008 49:5546-5552. (査読有り)
3. Yu ZK, Chen YN, Aihara M, Mao W, Uchida S, Araie M Effects of beta-adrenergic receptor

antagonists on oxidative stress in purified rat retinal ganglion cells. Mol Vis 2007 Jun 11;13:833-9. (査読有り)

4. Chen YN, Aihara M, Mao W, Yamada H, Matsuyama S, Araie M Effects of Bax-inhibiting Peptides in Retinal Ganglion Cell Death Induced by Glutamate or Oxidative Stress In Vitro Brain Res 2007 1148:28-37. (査読有り)

5. Shimazawa M, Inokuchi Y, Ito Y, Murata H, Aihara M, Miura M, Araie M and Hara H: Involvement of ER stress in retinal cell death. Mol Vis 13: 578-587, 2007 (査読有り)

6. Shimazawa M, Ito Y, Inokuchi Y, and Hara H: Involvement of double-stranded RNA-dependent protein kinase in ER stress-induced retinal neuron damage. Invest Ophthalmol Vis Sci 48: 3729-3736, 2007. (査読有り)

7. Shimazawa M. and Hara H. Inhibitor of double stranded RNA-dependent protein kinase protects against cell damage induced by ER stress. Neurosci. Lett., 409, 192-195, 2006. (査読有り)  
(他 32 件)

(学会発表) (計 38 件)

1. Koriyama Y, Saito J, Matsukawa T, Kato S., A retinol binding protein, purpurin protects injury-induced apoptosis and regenerateXons in rat CNS neurons. Neuroscience 2008 USA. WashingtonDC;2008 年 11 月.

2. Suemori S, Shimazawa M, Yamamoto T and Hara H, Involvement of endoplasmic reticulum stress in retinal cell death. The ARVO Annual Meeting. Fort Lauderdale, Florida; 2007 年 5 月

3. 井口勇太、嶋澤雅光、中島佳美、工藤喬、今泉和則、原英彰、網膜細胞死における小胞体誘導シャペロンの関与、第 80 回日本薬理学会年会。名古屋;2007 年 3 月

4. 村田博史、陳逸寧、太田貴史、相原一、新家真。虚血再灌流モデルを用いた生体内網膜神経節細胞の経時的変化の評価。第 17 回日本緑内障学会。熊本; 2006 年 10 月

5. 毛蔚、陳逸寧、相原一、新家真。 et al. pitavastatin (NK104) のラット網膜神経節細胞保護効果。第 26 回眼薬理学会。福井; 2006 年 7 月

6. 毛蔚、陳逸寧、相原一、新家真。 et al. pitavastatin のラット網膜神経節細胞保護効果。Ophthalmoneuroprotection。東京; 2006 年 7 月  
(他 32 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)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

新家 真 (ARAIE MAKOTO)  
東京大学・医学部附属病院・教授  
研究者番号 : 00092122

### (2) 研究分担者

相原 一 (AIHARA MAKOTO)  
東京大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号 : 80222462

富所 敦男 (TOMIDOKORO ATSUO)  
東京大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号 : 80227628

柏木 賢治 (KASHIWAGI KENJI)  
山梨大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号 : 30194723

原 英彰 (HARA HIDEAKI)  
岐阜薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号 : 20381717

加藤 聖 (KATO SATORU)  
金沢大学・医学(系)研究科・教授  
研究者番号 : 10019614

(以下空欄)