

平成 21 年 5 月 13 日現在

研究種目：	若手研究(B)
研究期間：	2006 ～ 2008
課題番号：	18791307
研究課題名(和文)	NMDA および虚血による緑内障モデルに対するジアゾキシドの神経保護効果
研究課題名(英文)	The neuroprotective effects of diazoxide for the glaucoma model by NMDA and ischemia
研究代表者	
	奥野 高司 (Okuno Takashi)
	大阪医科大学・医学部・非常勤講師
	研究者番号： 20411366

研究成果の概要：

まず、in vitro 研究により、ジアゾキシド(diazoxide)はラット網膜神経節細胞由来細胞株に対し細胞死の抑制効果があり、この効果はミトコンドリア内膜に存在する ATP 感受性カリウムチャンネルを介していることが確認できた。

また、経時的に測定した視覚誘発電位や眼組織標本などを用いた in vitro 研究においても、NMDA による緑内障モデルの神経障害の回復を促進させ、神経保護作用を持つことがウサギおよびサル の両者において示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
18年度	1,100,000	0	1,100,000
19年度	1,100,000	0	1,100,000
20年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	360,000	3,760,000

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：神経保護

緑内障

網膜神経節細胞

視覚誘発電位

網膜電図

視神経萎縮

ウサギ

サル

1. 研究開始当初の背景

緑内障の治療として眼圧下降が有効であることは明らかであるが、日本では正常眼圧緑

内障のしめる割合が非常に大きく、眼圧下降と同時に、視神経乳頭循環改善や神経保護作用を併せ持つ緑内障治療薬の開発が望まれ

る。
ジアゾキサイド(diazoxide)はミトコンドリア内膜に存在するATP感受性カリウムチャンネルのオープナー(opener)である。ジアゾキサイドは心臓などの眼以外の臓器において多く研究されており、心筋保護作用を持つことが報告されている。ジアゾキサイドはカリウムチャンネルを解放し、ミトコンドリア内カルシウム濃度の上昇を抑制し、ミトコンドリアの脱分極を抑制し、虚血に続発する過剰グルタミン酸による細胞内カルシウム濃度の上昇に続発する細胞死を抑制するとされている。

中枢神経系でも心筋の6-7倍のATP感受性カリウムチャンネルが存在し、中枢神経系での神経保護作用についての報告も少ないながらも、眼科領域においてもジアゾキサイドが視神経、網膜面に到達できれば、視神経や網膜でも神経保護作用が期待でき、緑内障治療に寄与する研究となる可能性がある。しかし、眼科領域ではこれまで *in vitro* の報告がごく少数あるのみである。

2. 研究の目的

(1) *in vitro* 研究

網膜神経節細胞由来細胞株に対するジアゾキサイドの神経保護作用について検討する。

(2) *in vivo* 研究

ジアゾキサイドの緑内障などのモデル動物に対する神経保護作用を検討し、緑内障などの視神経を障害する疾患に対する治療への応用可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* 研究

①ラット網膜神経節細胞由来細胞株(RGC-5)に対するoxygen glucose deprivation (OGD)誘発細胞死をWST-8 assayで検討し、ジアゾキサイドの用量依存性を検討した。

②RGC-5のOGD誘発細胞死に対するジアゾキサイドの神経保護効果と、その神経保護効果に対するミトコンドリア内膜に存在するATP感受性カリウムチャンネルを特異的に遮断する5-hydroxydecanoic acid (5HD)の併用の効果をFACS (fluorescence activated cell sorting) (flow cytometry)を用い、annexinとヨウ化プロピジウムで2重染色し、生細胞の%を基準に測定した。

(2) *in vivo* 研究

①ウサギ

ジアゾキサイド(200nmol)もしくは溶媒をウサギの硝子体に注入後 NMDA (1 μ mol)を注入

し、視機能変化を視覚誘発電位(VEP)と網膜電図(ERG)をNMDA投与の2週間まで測定した。

②硝子体手術モデル

虚血による視神経障害に対するジアゾキサイドの神経保護効果を、術後の障害についても検討するために実験を行った。ウサギに白内障および硝子体手術を行い、術中に高眼圧負荷(80 mmHg、30分)をかけた群と手術のみ行った対照群とを比較した。

③サル

ウサギと同様にジアゾキサイド(200nmol)もしくは溶媒をサルの硝子体に注入後 NMDA (1 μ mol)を注入し、視機能変化を視覚誘発電位(VEP)と網膜電図(ERG)をNMDA投与の2週に測定した。組織切片を作成し、神経節細胞層の細胞数を比較した。

4. 研究成果

(1) *in vitro* 研究

①ジアゾキサイドは10 μ Mで有意な細胞死の抑制効果が認められた。

②OGDで67%に低下した生細胞が、ジアゾキサイドで84%に増加し、その効果は5HDにより、69.3%に減少した。結論：ジアゾキサイドの効果はミトコンドリア内膜に存在するATP感受性カリウムチャンネルを介していることが確認できた。

(2) *in vivo* 研究

①ウサギ

NMDAによりVEP振幅は投与3時間後には基準値の20%程度に減弱するが、ジアゾキサイドの併用により投与1,2週間後にはVEP振幅の回復が促進されるのが確認された。ERGには両群とも有意な変化を認めなかった。ウサギにおいて、ジアゾキサイドはNMDAによる神経障害の回復を促進させ、神経保護作用を持つことが示唆された。

②硝子体手術モデル

高眼圧負荷群では対照群に比べ有意なVEP潜時の延長と神経節細胞層細胞数の減少がみられた。したがって、この実験モデルは術中虚血による術後神経障害モデルとなると考えられた。

③サル

ウサギと同様にNMDAにより投与2週間後のVEP振幅は減弱するが、ジアゾキサイドの併用によりVEP振幅の回復が促進され、平均振幅は併用しない場合の約1.3倍となった。ERGには両群とも有意な変化を認めなかった。神経節細胞の細胞数は、正常対照に比べNMDA

により 20%以下に減少するが、ジアゾキサイドの併用により 30%程度に減少するのみとなった。ジアゾキサイドはウサギだけではなくサルにおいても、NMDA による神経障害の回復を促進させ、神経保護作用を持つことが示唆された。

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 11 件)

1. Okuno T, Oku H, Sugawara J, Utsumi T, Ikeda T.

Shift of temporal responsivity curve of pattern reversal visually evoked potentials to lower frequencies in patients after recovery from optic neuritis.

Acta Ophthalmol. 査読あり
2009 in press

2. Okuno T, Oku H, Kurimoto T, Oono S, Ikeda T.

Peripheral cone dystrophy in an elderly man.
Clin Experiment Ophthalmol. 査読あり
36: 897-9. 2009

3. Shimazawa M, Inokuchi Y, Okuno T, Nakajima Y, Sakaguchi G, Kato A, Oku H, Sugiyama T, Kudo T, Ikeda T, Takeda M, Hara H.

Reduced retinal function in amyloid precursor protein-over-expressing transgenic mice via attenuating glutamate-N-methyl-d-aspartate receptor signaling.

J Neurochem. 査読あり
107: 2008 279-90.

4. Oku H, Fukuhara M, Kurimoto T, Okuno T, Sugiyama T, Ikeda T.

Endothelin-1 (ET-1) is increased in rat retina after crushing optic nerve.
Curr Eye Res. 査読あり
33: 2008 611-20.

5. Okuno T, Oku H, Sugiyama T, Ikeda T. Electoretinographic study of spontaneously diabetic Torii rats.
Doc Ophthalmol. 査読あり

117: 2008 191-6.

6. Oku H, Fukuhara M, Komori A, Okuno T, Sugiyama T, Ikeda T.

Endothelin-1 (ET-1) causes death of retinal neurons through activation of nitric oxide synthase (NOS) and production of superoxide anion.

Exp Eye Res. 査読あり
86: 2008 118-30.

7. Sugiyama T, Okuno T, Fukuhara M, Oku H, Ikeda T, Obayashi H, Ohta M, Fukui M, Hasegawa G, Nakamura N.

Angiotensin II receptor blocker inhibits abnormal accumulation of advanced glycation end products and retinal damage in a rat model of type 2 diabetes.

Exp Eye Res. 査読あり
85: 2007 406-12.

8. Minami M, Oku H, Okuno T, Fukuhara M, Ikeda T.

High infusion pressure in conjunction with vitreous surgery alters the morphology and function of the retina of rabbits.

Acta Ophthalmol Scand. 査読あり
85: 2007 633-9.

9. Okuno T, Oku H, Sugiyama T, Ikeda T.

Glutamate level in optic nerve head is increased by artificial elevation of intraocular pressure in rabbits.

Exp Eye Res. 査読あり
82: 2006 465-70.

10. Okuno T, Oku H, Kondo M, Miyake Y, Sugawara J, Utsumi T, Ikeda T.

Abnormalities of visual-evoked potentials and pupillary light reflexes in a family with autosomal dominant occult macular dystrophy.

Clin Experiment Ophthalmol. 査読あり
35: 2006 781-3.

11. Okuno T, Sugiyama T, Kohyama M, Kojima S, Oku H, Ikeda T.

Ocular blood flow changes after dynamic exercise in humans.

Eye. 査読あり
20: 2006 796-800.

〔学会発表〕(計 12 件)

1. 奥英弘、福原雅之、奥野高司、勝村浩三、松尾純子、小寫祥太、杉山哲也、池田恒彦
低酸素状態における一酸化窒素の神経毒性
第 112 回日本眼科学会 横浜 2009. 4. 16-19
2. 柴田真帆、杉山哲也、奥英弘、奥野高司、小林正人、平尾真美、池田恒彦
視神経乳頭循環自動調節能に対するグリア細胞の関与
第 112 回日本眼科学会 横浜 2009. 4. 16-19
3. 松尾純子、奥英弘、勝村ちひろ、杉山哲也、神原裕子、小林崇俊、福原雅之、奥野高司、池田恒彦
最終糖化産物 (AGE) による網膜周皮細胞死に対するスタチンの抑制効果
第 112 回日本眼科学会 横浜 2009. 4. 16-19
4. 奥英弘、勝村浩三、松尾純子、奥野高司、小林崇俊、小寫祥太、福原雅之、杉山哲也、池田恒彦
網膜神経節細胞株 (RGC-5) に対するスタチンの神経保護作用の検討
第 112 回日本眼科学会 横浜 2008. 4. 17-20
5. 嶋澤雅光、井口勇太、奥野高司、坂口岳、加藤晃、奥英弘、杉山哲也、工藤喬、池田恒彦、武田雅俊、原英彰
アミロイド β 蛋白質の網膜機能および細胞死に対する影響
第 112 回日本眼科学会 横浜 2008. 4. 17-20
6. 奥野高司、奥英弘、杉山哲也、小森麻子、池田恒彦
SDT ラットの網膜電図に対するアンジオテンシン II 受容体拮抗薬の効果
第 55 回日本臨床視覚電気生理学会 名古屋 2007. 11. 03
7. Shimazawa M, Inokuchi Y, Okuno T, Sakaguchi G, Kato A, Sugiyama T, Kudo T, Ikeda T, Takeda M, Hara H.
Involvement of Amyloid- β in Retinal Function.
79th Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology. 2007, 5, 6-10, Florida, USA.

8. Oku H, Fukuhara M, Komori A, Okuno T, Sugiyama T, Ikeda T.
Endothelin-1 (ET-1) Causes Death of Retinal Neurons Through Activation of Nitric Oxide Synthase (NOS) and Production of Superoxide Anion.
79th Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology. 2007, 5, 6-10, Florida, USA.
9. 奥野高司、奥英弘、福原雅之、杉山哲也、池田恒彦
ラット視神経挫滅モデルにおける網膜内エンドセリン-1 の変化
第 111 回日本眼科学会 大阪 2007. 04. 19-22
10. 奥野高司、奥英弘、杉山哲也、小森麻子、池田恒彦
NMDA 誘発網膜内層障害に対するミトコンドリア内膜カリウムチャンネル開口薬の効果
第 110 回日本眼科学会 大阪 2007. 04. 13-16
11. 杉山哲也、奥野高司、福原雅之、小森麻子、奥英弘、池田恒彦、太田光熙、尾林博
SDT ラット眼内・蛋白糖化最終産物に対するアンジオテンシン II 受容体拮抗薬の作用
第 110 回日本眼科学会 大阪 2007. 04. 13-16
12. Okuno T, Oku H, Sugawara J, Utsumi T, Ikeda T.
Temporal frequency changes in the pattern reversal visual evoked potential (PVEP) amplitude in optic neuritis. 16th International Neuron-Ophthalmology Society (INOS) Congress, 2006. 11. 29-12. 2, Tokyo, Japan

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥野 高司 (Okuno Takashi)
大阪医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号 : 20411366