

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791682

研究課題名（和文） ラットモデルを用いたアルツハイマー病治療薬による緑内障に対する神経保護治療の開発

研究課題名（英文） Development of neuroprotective therapy for glaucoma with anti-Alzheimer's agent using rat model.

研究代表者

三木 篤也（ Miki Atsuya ）

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：30437404

研究成果の概要（和文）：

ラットの上強膜静脈を2本結紮した時の平均眼圧は処置前の13.2mmHgに対し、1週後20.6mmHg、5週後19.4mmHgと上昇した。上強膜静脈3本を結紮した時の平均眼圧は処置前の14.6mmHgに対し、1週後19.3mmHg、5週後20.7mmHgと、2本結紮と大差なかった。結紮では結紮が弱いと血流が再疎通する、強いと出血を来し、眼球瘻を起こしやすい、という問題があるため、焼灼を行った。ラットの上強膜静脈3本を焼灼した処置前平均眼圧が10.3±1.5mmHgに対して、処置1週後眼圧は10.0±2.3mmHgと、有意な眼圧上昇をもたらさなかった。しかし、1眼ずつを見れば、眼圧上昇を来したものもあった。他の眼圧上昇モデルとして、隅角の光凝固モデル、トリアムシノロン硝子体内注入も行ったが、有意な眼圧上昇は得られなかった。

研究成果の概要（英文）：

By ligation of rat episcleral veins, elevation of intraocular pressure (IOP) from 13.2mmHg preoperatively to 19.4mmHg at 5 weeks after operation after ligation of 2 veins, and from 14.6mmHg to 20.7 mmHg after ligation of 3 veins, was observed. By cauterizing rat episcleral veins, mean IOP was 10.3 mmHg preoperatively, and 10.0 mmHg at 1 week after operation. We did not observe any significant change in IOP after anterior chamber angle photocoagulation or after intravitreal injection of steroids.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	400,000	120,000	520,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	1,400,000	420,000	1,820,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：眼科学

キーワード：眼細胞生物学

1. 研究開始当初の背景

緑内障は本邦における中途失明原因の首位を占めている疾患であり、失明による社会的損失を防ぐには緑内障の克服は必須の課題である。緑内障においては、眼圧依存性に網膜神経節細胞（RGC）がアポトーシスに陥る

ことにより、視野障害が出現し、進行すれば失明に至る。現在のところ、臨床的にエビデンスがある緑内障治療は、眼圧下降のみである。しかし、眼圧を十分に下降させても、視野障害を抑制できない症例が存在する。RGCの細胞死を直接抑制する神経保護治療が必

要とされる由縁だが、緑内障に対する神経保護治療は臨床応用には至っていない。

一方、中枢神経系では、アルツハイマー病などの神経変性疾患において、神経保護治療が既に臨床応用されている。中でも、アセチルコリンエステラーゼ (AChE) 阻害薬は、元来はコリン作動性ニューロンの活動を高める目的で開発されたものであるが、その後、基礎研究レベルでも、臨床レベルでも、神経保護作用を持つことが報告されてきた。アルツハイマー病と慢性の緑内障では、中年以降に慢性的持続的に、目立った炎症所見を伴わずに徐々に神経細胞が失われていくという過程が非常に似通っている。

実際、我々は既に、アルツハイマー病治療薬である AChE 阻害薬ドネペジルが、ラット培養 RGC のグルタミン酸負荷、あるいは神経栄養因子除去に誘発される細胞死およびラット視神経切断による RGC 細胞死を有意に抑制する効果を持つことを発見した。これらの *in vitro*、*in vivo* の研究により、AChE 阻害薬は RGC に対しても神経保護効果を有し、眼科領域にも応用できる可能性が示された。しかし、グルタミン酸負荷、視神経切断モデルは、緑内障性視神経障害と深い関与があると考えられているが、非常に極端な実験的環境における細胞死の誘発系であり、この薬剤を臨床応用するためには、より生理的なモデルにおける検討が不可欠である。

2. 研究の目的

ドネペジルを初めとした AChE 阻害薬の緑内障への臨床応用を念頭に置き、ラット上強膜静脈の焼灼による眼圧上昇モデルを用いて、AChE 阻害薬の RGC 保護効果を検討すること。

3. 研究の方法

緑内障に対する神経保護治療のスクリーニング系として確立するために上強膜静脈焼灼ラットモデルの眼圧上昇および RGC 細胞死の時間経過を検討し、薬剤の投与スケジュールの基礎データとする。また、実際にドネペジルを動物に投与し、経時的な薬剤濃度変化を測定する。上記の経時変化解析結果に基づき、決定したスケジュールで薬剤を硝子体内に投与し、生存 RGC 数を検討する。また、神経保護作用の容量依存性の検討を行う。AChE 阻害薬や抗アポトーシス因子阻害薬の投与、タンパクの定量的解析を用いて、神経保護機序の検討を行う。また、ドネペジル以外にも、他の AChE 阻害薬を投与し、ドネペジルと効果を比較する。これらの実験を通して、緑内障に対する AChE 阻害薬の神経保護効果の有無、もっとも安全かつ有効な薬剤および投与量について明らかにし、臨床応用への基礎データとする。更に、薬理学的、分子生物学的に、眼圧上昇および薬剤投与によって起こる変化を捉えることにより、緑内障性

視神経障害およびその抑制法を、より基礎的な観点から解明する。

4. 研究成果

まず 4 匹 4 眼の上強膜静脈を 2 本結紮し、5 週間経過観察した。平均眼圧は処置前の 13.2mmHg に対し、1 週後 20.6mmHg、2 週後 20.2mmHg、3 週後 13.8mmHg、4 週後 18.8mmHg、5 週後 19.4mmHg (5 週後は 2 匹が死亡したため 2 眼の平均) と、眼圧上昇傾向を見せたが、効果が弱かったため、次に 8 匹 8 眼の上強膜静脈 3 本を結紮した。8 眼のうち、2 眼が眼球瘻に陥ったため 6 眼の経過を観察した。平均眼圧は処置前の 14.6mmHg に対し、1 週後 19.3mmHg、2 週後 17.8mmHg、3 週後 19.3mmHg、4 週後 20.0mmHg、5 週後 20.7mmHg と、2 本結紮と大差なかった。結紮では 1) 結紮が弱いと血流が再疎通する、2) 逆に強いと出血を来とし、眼球瘻を起しやすいため、という問題があるため、上強膜静脈の焼灼を行った。

ラットの上強膜静脈 3 本を焼灼した。既報では結膜を切開して上強膜静脈を分離して焼灼すると報告されているが、実際には直接焼灼をすると高率に強膜穿孔を生じた。ブレードを用いて上強膜静脈を強膜から持ち上げて焼灼すると穿孔しないが、両手を用いる手技のため制御糸の設置が必要となり、制御糸設置時に房水の漏出を生じて眼圧が下降すること、静脈単離時に高率に静脈損傷、出血を伴うことが欠点であった。手術用マイクロスコプを用いれば、結膜上から上強膜静脈の視認が可能のため、結膜上から焼灼した。9 匹 9 眼にたいして施行したが、処置前平均眼圧が 10.3 ± 1.5 mmHg に対して、処置後 (1 週後) 眼圧は 10.0 ± 2.3 mmHg と、有意な眼圧上昇をもたらさなかった。しかし、1 眼ずつを見れば、眼圧上昇を来したのものもあった (最も大きいもので処置後の処置眼の眼圧が 14.4mmHg に対して対側の対照眼の眼圧が 10.2mmHg)。

上強膜静脈の結紮においても、焼灼においても眼圧上昇を得ることは可能であった。しかし、処置を行った動物すべてが眼圧上昇を維持できるわけではなく、半数強にとどまること、術前に眼圧上昇の有無を予測できないことから、処置群と対照群に分けて神経保護治療の効果を検討する研究の手段としてふさわしくなかった。そのため、報告されている他の眼圧上昇誘発モデルについても検討した。

他の眼圧上昇モデルとして、隅角の光凝固モデルも検討した。処置前平均眼圧が 9.7mmHg に対して処置 1 週間後が 12.5mmHg (n=3) であったが、すべての眼で合併症 (出血もしくは角膜混濁) を伴っていた。また、ステロイド誘発性の眼圧上昇を検討するため、トリアムシノロン硝子体内注入も行ったが、注入前平均眼圧が 8.6mmHg に対して、注

入1週後眼圧は9.1mmHg (n=6)と有意な上昇を認めず、各個体のレベルでも十分な眼圧上昇を来した個体はなかった。

また、ドネペジル投与法の至適化のため、既に検討した経口投与法と、硝子体投与、背部浸透圧ポンプ留置法の効果を視神経切断モデルを用いて検討した。視神経切断後1週間で生存網膜神経節細胞数は1135/mm²となるが(n=6)、ドネペジル10μMの硝子体内投与で1251.8/mm²と生存が促進された(n=5)。これは、すでに報告した1mg/kgの経口投与(1330.3/mm²)より劣るものの、有意な保護効果を示し、研究スタイルによっては使用してよい投与法と考えられた。

焼灼モデル以外の薬物スクリーニング手段として、ラット培養網膜神経節細胞に対するpigment epithelium-derived factor (PEDF)の神経保護効果の検討を行った。培養開始3日後の生存細胞数は、PEDFを投与しなかった群(n=18)を1とした生存率で、PEDF1ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml, 1μg/mlでは1.13±0.53(n=8)1.52±0.54(n=6)2.40±0.52(n=6)3.45±1.08(n=16)4.31±1.34(n=8)であり、濃度依存性に保護効果を有した。有望な神経保護薬剤と考えられたが、臨床応用のためにはin vivoモデルの確立が必要であるが、in vivoモデルは既報どおりの手技で行っても安定した眼圧上昇を得ることが難しかった。

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4件)

- ① Usui S, Ikuno Y, Miki A, Matsushita K, Yasuno Y, Nishida K: Evaluation of the choroidal thickness using high-penetration optical coherence tomography with long wavelength in highly myopic normal-tension glaucoma. Am J Ophthalmol 153:10-16, 2012 査読有
- ② Sasamoto Y, Oshima Y, Miki A, Wakabayashi T, Song D, Matsushita K, Hamasaki T, Nishida K: Clinical Outcomes and Changes in Aqueous Vascular Endothelial Growth Factor Levels After Intravitreal Bevacizumab for Iris Neovascularization and Neovascular Glaucoma: A Retrospective Two-Dose Comparative Study. J Ocul Pharmacol Ther. 2011 28: 41-48 査読有
- ③ Miki A, Oshima Y, Otori Y, Matsushita K, Nishida K. One-year results of intravitreal bevacizumab as an adjunct to trabeculectomy for neovascular glaucoma in eyes with

previous vitrectomy. Eye 2011; 25: 658-9. 査読有

- ④ Tominaga A, Miki A, Yamazaki Y et al. The assessment of the filtering bleb function with anterior segment optical coherence tomography. J Glaucoma 2010; 19: 551-5. 査読有

[学会発表] (計9件)

- ① スペクトラルドメインOCTによる神経線維層およびganglion cell complex厚と視野の相関 三木篤也、三浦聡子、松下賢治、西田幸二…第22回緑内障学会、2011.9.24、秋田
- ② Anterior chamber measurements by Fourier-domain and time-domain anterior segment optical coherence tomography in eyes with narrow angle A. Miki, Y. Sasaki, M. Haruta, K. Matsushita, N. Maeda, K. Nishida… ARVO annual meeting, 2011.5.5, Ft. Lauderdale, USA
- ③ アバスチンを併用した手術の適応、問題点 シンポジウム2「血管新生緑内障」三木篤也…第16回糖尿病眼学会、2010.11.27、大阪
- ④ タイムドメインおよびフーリエドメイン光干渉断層計による狭隅角眼の前眼部解析の比較 佐々木有紀子、三木篤也、春田真実、松下賢治、前田直之、西田幸二…第64回日本臨床眼科学会、2010.11.11、神戸
- ⑤ 強度近視を伴う原発開放隅角緑内障に対するトラベキュlectミー、水晶体再建術同時手術 三木篤也、照林彩、白井審一、松下賢治、生野恭司、西田幸二…第21回日本緑内障学会、2010.9.24、福岡
- ⑥ Combined Phaco-Trabeculectomy for Progressive Normal-Tension Glaucoma Associated with High Myopia Atsuya Miki, Aya Terubayashi, Shinichi Usui, Kenji Matsushita, Yasushi Ikuno… World Ophthalmology Congress 2010. 6. 8, Berlin, Germany
- ⑦ 前眼部画像診断による緑内障手術の評価 (シンポジウム2 緑の若葉) 三木篤也…第20回日本緑内障学会、2009.11.13、沖縄
- ⑧ 血管新生緑内障-病期別の治療指針 (シンポジウム1 スローダウン緑内障: 病型別アプローチ) 三木篤也…第20回日本緑内障学会、2009.11.13、沖縄
- ⑨ Bevacizumab-assisted trabeculectomy for neovascular glaucoma: One-year results. Atsuya Miki, Yusuke Oshima, Kenji Matsushita, Motohiro Kamei, Yasumasa Otori… World Glaucoma Congress 2009. 7. 8, Boston, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三木 篤也 (Miki Atsuya)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：30437404

(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：