

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5月29日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2010～2011

課題番号：22689045

研究課題名（和文） 緑内障における総合的神経保護治療の開発

研究課題名（英文） Development of an integrated neuroprotective treatments in glaucoma

研究代表者

中澤 徹（NAKAZAWA TORU）

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：30361075

研究成果の概要（和文）：

中途失明原因第1位である緑内障は、有病率が増加傾向にある眼疾患である。緑内障において高眼圧は重要なリスクファクターであるが、本研究では新たに緑内障診断における眼底血流評価の有効性、網膜神経節細胞死の抑制への酸化ストレス防御機構とカルパインの関与、そして抗酸化物質とカルパイン阻害剤の網膜神経節細胞保護能を明らかにした。これらは眼圧に依存しない緑内障の病態解明、早期診断、そして神経保護治療実現の一助となる知見である。

研究成果の概要（英文）：

The glaucoma is an eye disease that is the primary cause of vision loss in Japan, and its prevalence rate is still increasing. Although high intraocular pressure was an important risk-factor in glaucoma, in this research, the clinical validity of the ocular fundus blood flow evaluation in glaucoma diagnosis, participation of the oxidant stress defense mechanism and calpain to control of mouse retinal ganglion cell death, and mouse retinal ganglion cell protection ability of antioxidants and calpain inhibitor were newly clarified. These results will be important for pathological elucidation, an early detection, and development of nerve protection treatments in the field of glaucoma.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2011年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
年度			
年度			
年度			
総計	13,200,000	3,960,000	17,160,000

研究分野：眼科学

科研費の分科・細目：若手研究（A）

キーワード：緑内障、視神経乳頭循環不全、乳頭陥凹拡大、軸索流障害、カルパインインヒビター、Laser Speckle Flowgraphy

1. 研究開始当初の背景

緑内障は中途失明原因の第1位で我が国では40歳以上の実に約5%が緑内障患者である。加齢に伴って発症率が増す疾患で高度

高齢化に伴って今後大きな社会問題になる可能性が高い。また網膜視神経線維が不可逆的に減少して視野が欠損してゆく疾患であり、根治的な治療法はない。原因は主に高眼圧とされており、進行を遅延させるために眼

圧を低下させることが唯一エビデンスに基づいた治療法である。眼圧低下治療は良好な成果を上げている。しかしながら緑内障による失明者は依然増加の一途をたどっており、抜本的な解決の必要がある。特に日本人では眼圧が正常であっても緑内障の症状を呈する患者（正常眼圧緑内障）が大半を占めている。また高眼圧を低下させ、適正值に保っても緑内障が進行する患者が存在することも確認されている。つまり眼圧測定だけに頼ったリスク評価、診断、治療では不十分である。

研究代表者は事前調査として眼圧以外の要素として循環を検討した。正常眼圧緑内障で最も失明に至る傾向のある近視型乳頭患者における乳頭近傍の毛細血管の状態を把握するため蛍光眼底造影検査を行った。すると血液循環が低下している部位を認め、時に血管が閉塞している症例を認めた。以上より失明に至る緑内障患者で、眼圧が充分低値にコントロールされている際には循環不全による慢性虚血が緑内障の失明状態への進展に関与していることが強く示唆された。同様の結果はアメリカの大規模多施設研究によっても報告されている。30%の眼圧降下が得られても20%の緑内障患者は進行し（*Am J Ophthalmol.* 1998,126,4,498-505）、特に循環不全（乳頭出血や全身に動脈硬化病変）を有する患者では眼圧降下の治療効果は期待できないと言われている（*Am J Ophthalmol.* 2003, 136,5,820-9）。日本を代表する緑内障疫学調査である多治見スタディーにより、日本人は諸外国と比較して正常眼圧緑内障の頻度が極めて高く（*Ophthalmology.* 2004, 111,9,1641-8）、更に近視の有病率が欧米諸国の5倍前後もいることが判明している（*Ophthalmology.*）。

2. 研究の目的

本研究では眼圧に依存しない新しい着眼点に基づく病態解明、診断法、神経保護治療の確立を目指した。まず、事前調査で明らかになった眼循環と緑内障との関係を臨床研究で明らかにすること目標にした。またモデル動物を用いた基礎研究にて視神経細胞死に関与する様々な障害による網膜の変化を多角的かつ細胞レベルで解析し、眼圧に依存しない病態解明と神経保護治療に繋げることを目指した。

3. 研究の方法

・ 眼循環に関する臨床研究

近年 Laser Speckle Flowgraphy (LSFG) により眼底血流を非侵襲的に定量評価することができる様になった。本研究では東北大学における倫理委員会の承認を得て、正常眼、緑内障を対象とし、LSFGで撮影した血流マップより mean blur rate (MBR) を算出した。全乳頭 MBR を組織流量 (MT) と血管流量 (MV) に分けて部位別 MBR との関連を検討した。さらに光干渉断層計 (OCT) 等の他の測定機器を併用して眼底形状と血流との関係性を評価した。

・ 内在性カルパイン阻害遺伝子欠損マウスを用いた緑内障モデル研究

野生型の C57BL/6 マウスと、内在性カルパイン阻害タンパク質・カルパスタチン遺伝子欠損 (Cast-KO) マウスを用い、片眼の視神経の機械的な挫滅およびビンブラスチンの微小管の障害作用を利用して視神経の軸索流を障害するモデルを作成した。この軸索流の障害によって網膜神経節細胞の細胞死が起こり、障害後七日目に生存細胞数を数えて定量した。細胞培養実験では、上記同様野生型と Cast-KO マウスから網膜を採取し、網膜神経節細胞培養を行った。カルパイン阻害剤 (SNJ-1945) をそれぞれ動物あるいは培養細胞に投与して網膜神経節細胞に対する保護効果を評価した。

・ 酸化ストレス防御転写因子欠損マウスを用いた緑内障モデル研究

野生型マウス (WT, 12週齢、雄、C57BL/6) と酸化ストレス防御機構で鍵となる転写因子 (Nrf2) ノックアウトマウス (Nrf2KO) を用いた。網膜神経節細胞を逆行性染色し、軸索挫滅7日後の蛍光陽性細胞密度を計測した。軸索挫滅後の網膜における生体防御酵素群の発現変化をリアルタイム定量 PCR 法で検討した。蛍光陽性細胞をセルソーターで純化回収し、軸索挫滅群と対照群における生体防御酵素群の発現変化をリアルタイム定量 PCR 法にて検討した。

4. 研究成果

(1) まず LSFG の臨床研究にて、視神経乳頭の MBR の平均値が正常群では 27.1 ± 4.2 であるのに対して、緑内障群では 21.2 ± 5.3 に有意に低下していた。また、視神経乳頭 MBR は既知の緑内障診断の他覚的検査として有用で

あるOCTによる乳頭周囲視神経線維層厚とも相関関係を認めた。特に緑内障初期におけるLSFGによる血流評価の有効性が示唆された。

(2) 次にGeneralized Enlargement(GE)型視神経乳頭を有する緑内障群と視神経乳頭陥凹拡大のみを有する群、正常群の視神経乳頭部の血流を測定した。正常群と比較して視神経乳頭陥凹拡大群とGE型緑内障群は有意な血流低下を認め、視神経乳頭陥凹の拡大に視神経乳頭血流が関与する可能性が示唆された。さらに健常者における視神経乳頭部の血流波形形状を解析した。血流波形の形状変化と年齢に強い相関を認め、緑内障の発症と進行にも影響する加齢の指標となる可能性が示唆された。

(3) 一方、内在性カルパイン阻害遺伝子欠損マウスを用いた緑内障モデル研究では、研究神経挫滅と同様にビンブラスチン投与でも軸索流障害を起こし、網膜神経節細胞死が観察された。Cast-KO マウスや、その培養細胞ではより多くの網膜神経節細胞死が認められた(図1、図2)。それに対し、SNJ-1945の投与によって、病態モデル動物の網膜神経節細胞の生存率が有意に上昇し、培養した網膜神経節細胞にも保護効果を認めた。

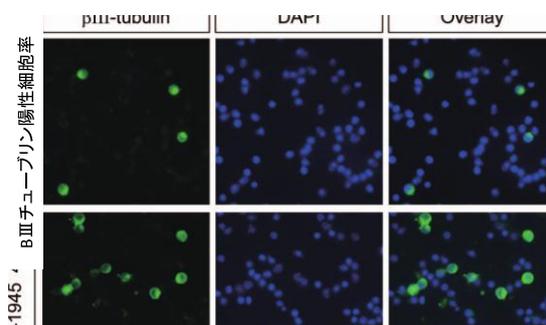


図1. WTとCAST-KO網膜由来培養細胞に対するビンブラスチン障害下におけるカルパイン阻害剤の神経保護効果

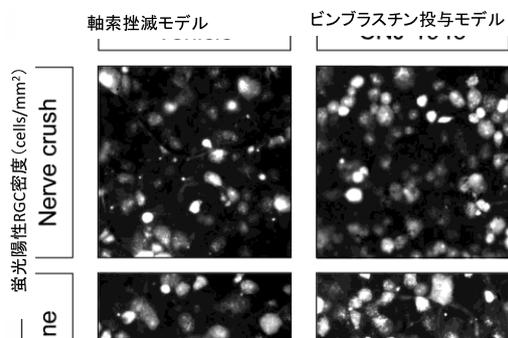


図2. 軸索挫滅モデルおよびビンブラスチン投与モデルにおけるカルパイン阻害剤の神経保護効果

(4) 次に正常眼圧緑内障モデルとして本研究で確立した軸索流障害で発現される分子を詳細に検討した。障害を受けた網膜神経節細胞を単離して解析したところ、酸化ストレスの無毒化に関わる分子群(HO-1等)の発現が確認された。またNrf2OKマウスに対して同様の障害を与えたところWTと比較して有意に網膜神経節細胞死が亢進された。そこで抗酸化作用を有する薬剤2剤をこのモデルに供したところ有意に網膜神経節細胞死が抑制されることを確認した。

緑内障診断における眼底血流評価の有効性、網膜神経節細胞死の抑制への酸化ストレス防御機構とカルパインの関与、そして抗酸化物質とカルパインの網膜神経節細胞保護能が明らかとなった。これらは眼圧に依存しない緑内障の病態解明、早期診断、そして神経保護治療の実現の一助となる知見である。

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12件)

- ① Nakazawa T, Shimura M, Ryu M, Himori N, Nitta F, Omodaka K, Doi H, Yasui T, Fuse N, Nishida K: Progression of visual field defects in eyes with different optic disc appearances in patients with normal tension glaucoma. J Glaucoma. 査読有、2012、印刷中。
- ② Otani T, Yasuda K, Aizawa N, Sakai F, Nakazawa T, Shimura M: Over 10 years follow-up of Coats' disease in adulthood. Clin Ophthalmol. 査読有、2011;5:1729-32. Epub 2011 Dec 8.
- ③ Yokoyama Y, Aizawa N, Chiba N, Omodaka K, Nakamura M, Otomo T, Yokokura S, Fuse N, and Nakazawa T, Significant correlations between optic nerve head microcirculation and visual field defects and nerve fiber layer loss in glaucoma patients with myopic glaucomatous disk. Clin Ophthalmol. 査読有、2011, 5, 1721-1727.
- ④ Chiba N, Omodaka K, Yokoyama Y, Aizawa N, Tsuda S, Yasuda M, Otomo T, Yokokura S, Fuse N, Nakazawa T. Association between optic nerve blood flow and objective examinations in glaucoma patients with generalized enlargement disc type. Clin Ophthalmol. 査読有、

2011;5:1549-56.

- ⑤ Ryu M, Yasuda M, Shi D, Shanab AY, Watanabe R, Himori N, Omodaka K, Yokoyama Y, Takano J, Saido T, Nakazawa T: The critical role of calpain in axonal damage-induced retinal ganglion cell death. *J Neurosci Res*、査読有、2011;5:1721-7.
- ⑥ Aizawa N, Yokoyama Y, Chiba N, Omodaka K, Yasuda M, Otomo T, Nakamura, M, Fuse N, Nakazawa T. Reproducibility of ocular circulation measurements obtained using Laser Speckle Flowgraphy-NAVI in patients with glaucoma. *Clin Ophthalmol*. 査読有、2011;5:1171-6.
- ⑦ Shimura M, Yasuda K, Nakazawa, T, Hiranon Y, Sakamoto T, Ogura, Y, Shiono T, Visual outcome after intravitreal triamcinolone acetate depends on optical coherence tomographic patterns in patients with diffuse diabetic macular edema. *Retina*, 査読有, 2011, 31, 1729-1732.
- ⑧ Kunikata H, Uematsu M, Nakazawa T, Fuse N: Successful Removal of Large Intraocular Foreign Body by 25-Gauge Microincision Vitrectomy Surgery. *J Ophthalmology*. 査読有、2011:940323
- ⑨ Nakazawa T, Kayama M, Ryu M, Kunikata H, Watanabe R, Yasuda M, Kinugawa J, Vavvas D, Miller JW: Tumor Necrosis Factor- α Mediates Photoreceptor Death in a Rodent Model of Retinal Detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci*、査読有、52:1384-1391, 2011.
- ⑩ Kayama M, Nakazawa T, Thanos A, Morizane Y, Murakami Y, Theodoropoulou S, Abe T, Vavvas M, Miller JW: Heat Shock Protein 70 is critical for the photoreceptor stress response after retinal detachment via modulating anti-apoptotic Akt kinase. *Am J Pathol*、査読有、178:1080-1091, 2011.
- ⑪ Shimura M, Yasuda K, Miyazawa A, Otani T, Nakazawa T. Pre-seasonal treatment with topical olopatadine suppresses the clinical symptoms of seasonal allergic conjunctivitis. *Am J Ophthalmol*. 査読有、2011 Apr;151(4):697-702. e2.
- ⑫ Ryu M, Nakazawa T, Akagi T, Tanaka T, Watanabe R, Yasuda M, Himori N, Maruyama K, Yamashita T, Abe T, Akashi M, Nishida K: Suppression of phagocytic cells in retinal disorders using amphiphilic poly(γ -glutamic acid) nanoparticles containing dexamethasone. *J Control Release*、査読有、151:65-73, 2011.

[学会発表] (計18件)

- ① Neuroprotective treatment for glaucoma, 中澤 徹など、避難所往診体制の総括と問題点、第54回日本神経化学学会大会、2011/9/28、金沢。
- ② 中澤 徹など、軸索障害による網膜神経節細胞死の基礎的実験成果、第24回日本緑内障学会、2011/9/24、秋田。
- ③ 中澤 徹など、神経(New論)保護治療の可能性について(招待講演)、第24回日本緑内障学会、2011/9/24、秋田。
- ④ 中澤 徹など、軸索障害による網膜神経節細胞死の基礎的実験成果、第24回日本緑内障学会、2011/9/23、秋田。
- ⑤ 中澤 徹など、 γ PGA ナノ粒子による内眼炎ステロイド治療、第31回日本眼薬理学会、2011/9/18、松江。
- ⑥ 中澤 徹など、緑内障と酸化ストレス、第11回日本抗加齢医学学会総会、2011/5/28、京都。
- ⑦ Toru Nakazawa et al. NTGにおける神経保護治療戦略。(招待講演)。Santen Private Seminar. 2011/06/28. Paris, France.
- ⑧ Toru Nakazawa et al. Establish the drug delivery system for the suppression of phagocytic cells with nanoparticles. (招待講演)。EGA2011. 2011/06/12. yeongju, Korea.
- ⑨ Toru Nakazawa et al. Critical role of Nrf2 in the oxidative stress-induced retinal ganglion. ARVO2011. 2011/5/3. Ft. Lauderdale FL, U.S.A
- ⑩ Morin Ryu, Toru Nakazawa et al. A NEW RESEARCH MODEL OF NORMAL TENSION GLAUCOMA BY BLOCKING AXOPLASMIC TRANSPORT OF RETINAL GANGLION CELLS. Asia-Pacific Joint Glaucoma Congress (APJGC) 2010. 2010 Dec 3rd-5th Taipei, Taiwan.
- ⑪ Naoki Chiba, Toru Nakazawa et al. Association of optic nerve head blood flow and optic disc structure in the normal and glaucoma patients. Asia-Pacific Joint Glaucoma Congress (APJGC) 2010. 2010 Dec 3rd-5th, Taipei, Taiwan.
- ⑫ Toru Nakazawa et al. The development of new glaucoma mice model with the obstruction of axonal flow. 日本神経科学学会 Neuro2010. 2010 Sep 2nd-4th. 神戸市
- ⑬ 中澤 徹など、近視型乳頭を伴う正常眼圧緑内障におけるOCT, レーザースペックルを用いた他覚的検査の有用性、第64回日本臨床眼科学会 2010 Nov 11th-14th、

神戸市。

- ⑭ 中澤 徹 など、軸索流低下による新しい正常眼圧緑内障モデル、第 64 回日本臨床眼科学会、2010 Nov 11th-14th、神戸市。
- ⑮ 相澤 奈帆子、中澤 徹 など、緑内障病期別にみたレーザースペックルフローグラフィによる視神経乳頭循環の比較、第 64 回日本臨床眼科学会、2010 Nov 11th-14th、神戸市。
- ⑯ 千葉真生、中澤徹など、レーザースペックル眼底血流計の GE 型乳頭を持つ緑内障患者における他覚的検査としての有用性、第 21 回日本緑内障学会、2010 Sep 24th-26th、福岡市。
- ⑰ 中澤 徹 など、OCT による網膜神経線維層厚と HRTII 乳頭パラメータとの相関、第 21 回日本緑内障学会、2010 Sep 24th-26th、福岡市。
- ⑱ 相澤 奈帆子、中澤 徹など、蛍光眼底造影とレーザースペックルフローグラフィによる乳頭循環の比較、第 21 回日本緑内障学会、2010 Sep 24th-26th、福岡市。

[図書] (計 8 件)

- ① 中澤 徹、基礎研究から難治眼疾患のブレイクスルーをねらえ、緑内障の神経保護治療、臨床眼科、64 pp. 1974-84、2010.
- ② 中澤 徹、連載：眼科医にもわかる生理活性物質と眼疾患の基本：BDNF、臨床眼科、64, pp. 1664-7, 2010.
- ③ 中澤 徹、連載：眼科医にもわかる生理活性物質と眼疾患の基本：MCP-1、臨床眼科., 64, 9, pp. 1470-3, 2010.
- ④ 中澤 徹、特集：lower Normal Pressure Glaucoma、「神経保護治療の可能性」、Medical View Point, 31, 8, pp. 3, 2010.
- ⑤ 中澤 徹、翻訳：動画でわかる緑内障手術、第 6 章「弁なし一重プレートチューブシャント術」、中山書店, pp. 85-116, 2010.
- ⑥ 中澤 徹、特集 緑内障治療の現状と課題：1 原発開放隅角緑内障の治療戦略、医薬ジャーナル, 46, 4, pp. 97-100, 2010.
- ⑦ 中澤 徹、IV 網膜のグリア細胞はどんな働きをしているのか？、文光堂 眼のサイエンス 視覚の不思議, pp. 156-8, 2010.
- ⑧ 中澤 徹、連載：眼科医にもわかる生理活性物質と眼疾患の基本：TNF・、臨床眼科, 64, 2, pp. 178-80, 2010.

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

東北大学眼科ホームページ

<http://www.opht.med.tohoku.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中澤 徹 (NAKAZAWA TORU)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：30361075