

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10日現在

機関番号：14301
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2010 ～ 2011
 課題番号：22791656
 研究課題名（和文） 緑内障に対する神経保護剤による新たな治療法の開発
 研究課題名（英文） Development of new neuroprotective treatments for glaucoma
 研究代表者
 池田 華子 （IKEDA OHASHI HANAKO）
 京都大学・医学研究科・助教
 研究者番号：20372162

研究成果の概要（和文）：現在日本において失明の第一位の原因である緑内障は、網膜の神経節細胞が脱落する事により視野欠損をきたす疾患である。Valosin-containing protein(VCP)という蛋白質に対する阻害剤により、緑内障モデルマウスにおいて、網膜神経節細胞に対して保護効果があること、緑内障の進行が緩やかになることが明らかになった。緑内障の進行予防を目的とした、新たな神経保護薬剤となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Glaucoma, the most major cause of vision loss in Japan, is characterized by progressive visual field loss due to loss of retinal ganglion cells. Inhibitors for VCP has been elucidated to have neuroprotective effect and to delay disease progression on mouse models of glaucoma. They might be new neuroprotective drugs for glaucoma patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学13

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学7310

キーワード：眼科 緑内障 治療 神経保護

1. 研究開始当初の背景

現在日本において、緑内障は中途失明の一番の原因であり、高齢化に伴い、患者は増加しており、大きな社会問題となりつつある。緑内障は、網膜の神経節細胞が変性脱落することにより視野欠損をきたす疾患で、40歳

以上の5%で罹患していることが明らかになっている¹⁾。

現状では眼圧降下のみが有効な治療とされているため、患者ごとに病期に応じて目標眼圧を設定し、その値になるべく眼圧を近づけるのが、診療の目的となっている。近年眼

圧降下剤の種類は飛躍的に増え、点眼薬である程度眼圧を低い状態にコントロールできる症例もあるが、点眼では十分に眼圧がコントロールできない場合には、手術加療が必要となる。しかし、十分に眼圧を下げてもおお、徐々にあるいは急激に視野障害が進行する例が少なくない。また、緑内障のなかでもかなりの割合を占める正常眼圧緑内障患者に関しては、眼圧を下げるだけでは十分に視野障害の進行を予防できない場合が多い。

したがって、眼圧下降以外に、神経節細胞の脱落・神経線維の委縮脱落を予防すべく、新しい観点からの治療法・治療薬の開発が切望される場所である。

近年、緑内障治療薬として、血管拡張剤をはじめ、眼圧降下作用以外の作用を持ついくつかの薬剤が注目されつつあるが、未だ、著明な効果をしめすものはない。緑内障の病態としては、網膜神経節細胞の軸索の、視神経乳頭部・篩状板位での機械的刺激・微細血流障害、神経節細胞自体の酸化ストレス、グルタミン酸障害など、いろいろな仮説があるが、いずれも単一で疾患を引き起こすわけではなく、いろいろな要因が組み合わさって神経節細胞の機能不全および、細胞死がもたらされると考えられている。したがって、神経節細胞の機能不全・細胞死を抑制できれば、緑内障進行を予防することができるはずである。

一方、京大生命科学研究所高次生体統御学講座で、長年研究対象としている VCP(valocin-containing protein)²⁾ は、AAA (ATPase associated with various cellular activities) class の ATPase であり、細胞がストレスに反応して小胞体ストレス応答等を引き起こす過程で重要な働きをすると推測されている。当該研究室では、この VCP に対する阻害剤の合成・開発に成功しており、

その中に、神経細胞に対して強い細胞死保護効果をもつものがいくつか見つかっている。

したがって、これらの薬剤が、網膜神経節細胞に対して、細胞保護効果を持てば、神経保護という、新たな緑内障治療薬となりうる。

近年、京都大学眼科学教室では、人での網膜・視神経の画像解析に力を入れており、光干渉断層計などにて、網膜各層の状況、厚さの経時変化がとらえられるようになっていいる。特に、解像度の改善などによって、網膜神経節細胞層の厚さをかなり正確に測定できるようになっている。この手法を実験動物に応用することで、今まで組織切片を作成しないと分からなかった網膜の形態変化を、生体の状態で同一個体での経時変化として追うことが可能になっている。

1) Iwase A, et al. The prevalence of primary open-angle glaucoma in Japanese: the Tajimi Study. *Ophthalmology*, 111:1641-8, 2004.

2) Mori-K C, Kakizuka A, et al. p97/valosin-containing protein(VCP) is highly modulated by phosphorylation and acetylation. *Genes Cells*, 14: 483-97, 2009.

2. 研究の目的

本研究では以上の背景を踏まえ、緑内障モデルマウスにおいて、新規薬剤効果の評価系をイメージングの手法を用いて確立するとともに、新規化合物の中から網膜神経節細胞障害を抑制する薬剤を決定し、緑内障の進行予防効果があるかを明らかにすることを目的とした。

1) 神経保護効果があると思われる VCP 阻害剤が、網膜神経細胞である神経節細胞の保護に効果があるか否かを検討する。

網膜器官培養にて、神経節細胞死が抑制されるか検討し、疾患の進行予防につながる神経保護作用のある物質を決定する。

2) 動物用の光干渉断層計を用いて、マウス・ラットにて、網膜神経節細胞および網膜神経線維層が、きれいに描写されるか検討する。また、緑内障モデルマウスで、実際に網膜神経節細胞・神経線維層の経時変化をとらえられるか検討する。

3) 網膜細胞・組織で保護効果が証明された薬物を、緑内障モデルマウスに投与することで、生体内で実際に疾患の進行予防ができるか否か検討する。また、投与方法（経口、点眼、硝子体注射）や投与量を検討する。

3. 研究の方法

1) 網膜器官培養での検討

網膜を器官培養すると、網膜の微小環境がある程度 vitro で再現できる。この培養系に NMDA を加えると、網膜神経節細胞、および、網膜内顆粒層の神経細胞死がおこる。この系に、細胞保護効果のある VCP 阻害剤を加えることで、網膜神経節細胞死が抑制されるかどうか検討した。

2) 光干渉断層計を用いた、マウス神経節細胞の経時変化の検出法確立

網膜神経節細胞に保護作用をもつ薬剤を、マウスモデルに投与するにあたって、同一個体での、神経節細胞および神経線維層の経時変化を見ることは、大変重要である。その目的のために、2色の蛍光眼底撮影との同時撮影が可能な動物用最新型光干渉断層計

(Optical Coherence Tomography: OCT)

Multiline OCT™ (Heidelberg Engineering) を用い、マウスで網膜神経節細胞や網膜神経

線維層が描写されるかを確認した。その後、網膜神経節細胞の急性傷害として使われる NMDA 硝子体注射モデルマウス、眼圧上昇・続発緑内障モデルとしては、DBA/2J を、正常眼圧モデルとしては、グルタミン酸トランスポーターのノックアウトマウスなどを用いて、神経節細胞・網膜神経線維層の菲薄化の経時変化を、画像としてとらえられるかを検討した。また、画像取得後に、実際に眼球摘出後、組織像と、光干渉断層計での網膜描写像とを比較し、今までの組織学的な評価と同等の評価が光干渉断層計でも可能かを検討した。

3) 緑内障モデルマウスへの薬剤投与

網膜器官培養で、保護効果の確認できた薬剤について、緑内障モデルマウスへ投与し、神経節細胞の障害を抑制できるかを確認した。

Thy 1-CFP マウスに対し、NMDA 硝子体内投与1週間前より VCP 阻害剤および対照として生理食塩水を毎日経口投与した。NMDA 硝子体内投与後1、2、4、7、14日に、Multiline OCT (Heidelberg Engineering) を用いて CFP 画像における RGC 数と OCT 画像における Ganglion cell complex (GCC) 厚を計測した。

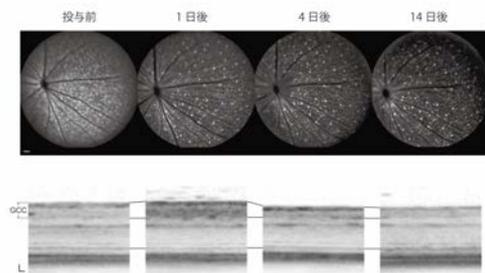
4. 研究成果

1) VCP 阻害剤を加えた網膜では、コントロール網膜に比べて、残存神経節細胞が多く、や神経線維層の厚みが保たれている事がわかった。したがって、VCP 阻害剤に、網膜神経節細胞保護効果があることが明らかになった。

2) マウスにおいても、ヒトと同様に、網膜各層が OCT にて描出可能であった。また、網膜神経節細胞が蛍光標識されている Thy1-CFP トランスジェニックマウスでは、個々の神経節細胞の可視化が可能であった。

NMDA を眼球の硝子体内へ注射した Thy1-CFP トランスジェニックマウスでは、NMDA 注射一日後、CFP 陽性網膜神経節細胞は著明に減少したが、網膜内層厚は変化しなかった。網膜内層は NMDA 注射 4 日以降徐々に菲薄化した。

(図 1) 網膜神経節細胞数および網膜内層厚は、2~20 nmol の間で NMDA の用量依存的に減少した。また、摘出眼球との比較により、OCT での評価は、組織での評価と同等以上である事を確認できた。以上より、神経節傷害の状況をリアルタイムで評価できる系を構築できた。 図 1



DBA/2J マウスにおいては、徐々に網膜内層厚が菲薄化し、視神経乳頭陥凹が拡大していく状況が描出可能であった。GLAST ノックアウトマウスにおいても、網膜内層厚が徐々に菲薄化した。以上より、各モデルにおいて、神経節細胞傷害状態を客観的かつ経時的に評価する系が構築できた。

3) NMDA 硝子体内投与後 1 日目の RGC 数は対照群において 37.4 ± 6.6 個であったのに対し、VCP 阻害剤投与群では 49.2 ± 6.7 個と有意な RGC 数減少の抑制を認め ($p < 0.0001$)、以後全評価日においても同様であった。GCC 厚においても NMDA 硝子体内投与後 7 日目に対照群で $59.3 \pm 2.6 \mu\text{m}$ であったのに対し、VCP 阻害剤投与群では $62.4 \pm 4.2 \mu\text{m}$ と有意な菲薄化の抑制を認めた ($p=0.009$)。

以上より、緑内障モデルマウスにおいて、VCP 阻害剤が実際に神経節細胞保護効果

をもつことが明らかになった。

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 1 件)

1) Nakano N, Ikeda OH, Hangai M, Muraoka Y, Toda Y, Kakizuka A, Yoshimura N. Longitudinal and simultaneous imaging of retinal ganglion cells and inner retinal layers in a mouse model of glaucoma induced by *N*-methyl-D-aspartate. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 52, 8754-62, 2011
Doi:10.1167/iovs.10-6654、査読あり。

[学会発表] (計 4 件)

1) 中野紀子、池田華子、ら 4 名、VCP 阻害剤によるマウス 網膜神経節細胞傷害モデルにおける 神経保護効果の検討、第 116 回 日本眼科学会総会、平成 23 年 4 月 6 日、東京

2) 中野紀子、池田華子、ら 4 名、HRA、OCT 同時撮影による GLAST 欠損マウス網膜神経節細胞障害の経時変化、第 115 回日本眼科学会総会、平成 22 年 5 月 16 日、東京

3) Hanako Ohashi Ikeda, Imaging of retinal nerve fiber layer and inner retinal segment in the DBA/2J mouse model of glaucoma by using spectral-domain optical coherence tomography with speckle noise reduction. (スペクトラルドメイン OCT を用いた緑内障モデルマウス DBA/2J の網膜神経線維層および網膜内層のイメージング)、2010 ARVO (The Association for Research in Vision and Ophthalmology) meeting (国際視覚眼科学会)、2010 年 5

月2日、アメリカ、フロリダ州
4) Noriko Nakano, Hanako Ohashi Ikeda,
ら他2名、Retinal ganglion cells and
ganglion cell layer imaging in Thy
1-CFP mice by HRA and
Speckle-noise-reduced Spectral-domain
Optical coherence tomography. (Thy1-CFP
マウスを用いた網膜神経節細胞および網膜
内層のイメージング)、2010 ARVO (The
Association for Research in Vision and
Ophthalmology)meeting (国際視覚眼科学会)、
2010年5月2日、アメリカ、フロリダ州

〔産業財産権〕

○出願状況 (計2件)

名称：眼疾患処置薬

発明者：垣塚彰 池田華子 ら他5名

権利者：京都大学 ダイソーケミックス

種類：特許

番号：特願 2010-221873

出願年月日：平成22年9月30日

国内外の別：国内

名称：眼疾患処置薬

発明者：垣塚彰 池田華子 ら他5名

権利者：京都大学 ダイソーケミックス

種類：特許

番号：PCT/JP2011/073160

出願年月日：平成23年9月30日

国内外の別：国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 華子 (IKEDA OHASHI HANAKO)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：20372162