

平成 21 年 6 月 17 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007 ～ 2008
 課題番号：19791265
 研究課題名 (和文) モデル動物を用いた緑内障に対するアルツハイマー病治療薬による神経保護治療の開発
 研究課題名 (英文) Development of neuroprotective therapy with anti-Alzheimer's agent using model animal system.
 研究代表者
 三木 篤也 (MIKI ATSUYA)
 大阪大学・医学部附属病院・医員
 研究者番号：30437404

研究成果の概要: のべ116匹232眼のDBA/2Jマウスの眼圧測定及び前眼部観察を行った。結果、眼圧は平均12mmHgと正常値であり、経時的な上昇傾向もなかった。一方、虹彩色素脱失および虹彩萎縮、瞳孔異常はほとんどの動物に見られた。結果、我々の導入したDBA/2Jマウスでは、既報に見られる虹彩の異常は発症しているが、既報と異なり、それに伴う眼圧上昇が生じないことがわかった。また、4匹の動物に薬剤を徐放するための浸透圧ミニポンプを埋植したが、2匹は死亡し、1匹はポンプの脱落を生じた。神経保護治療の効果確認のためには、DBA/2Jマウスは眼圧値の個体差が大きく、眼圧上昇を来たす個体を簡便に区別出来ない点で、適していない。より確実、定量的な眼圧上昇を見込むことが出来るモデルの確立が必要である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	400,000	0	400,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,100,000	210,000	1,310,000

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：眼科学・緑内障・神経保護・モデルマウス・アルツハイマー病

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上位を占める疾患である。緑内障においては、眼圧依存性に網膜神経節細胞がアポトーシスに陥り、視野障害が出現する。現在緑内障に対する臨床的に明確なエビデンスがある治療は、眼圧下降のみである。しかし、眼圧下降を十分に行っても、視野障害の進行が止まらず、失明に至る症例が存在する。

そこで、現在、眼圧下降治療に加えて、網膜神経節細胞の細胞死を直接抑制する神経保護治療が必要とされている。

2. 研究の目的

アセチルコリンエステラーゼ阻害薬は、アルツハイマー病においては、基礎研究レベルでも、臨床レベルでも、神経保護作用があることが証明されている。アルツハイマ

一病と慢性の緑内障では、神経細胞死を起こす原因は異なっているが、中年以降に慢性的持続的に、目立った炎症所見などを伴わずに徐々に神経細胞が失われていくという過程は非常に似通っている。よって、アルツハイマー病に対して効果のある神経保護治療は、緑内障に対する神経保護治療として期待される。実際、我々のこれまでの研究から、アセチルコリンエステラーゼ阻害薬である塩酸ドネペジルの投与により、ラットの培養網膜神経節細胞に対するグルタミン酸投与およびラット視神経切断により誘発される網膜神経節細胞死が有意に減少することがわかった。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、この薬剤が緑内障性の網膜神経節細胞死を抑制するかどうかは明確ではないため、臨床応用するには、眼圧依存性の細胞死を抑制することを証明する必要がある。そこで、私は今回、アセチルコリンエステラーゼ阻害薬の緑内障への臨床応用を念頭に置き、まず虹彩色素脱失により色素性緑内障を発症する自然発症の眼圧上昇モデル動物である DBA/2J マウスを用いて、アセチルコリンエステラーゼ阻害薬の網膜神経節細胞保護効果を検討することとした。

3. 研究の方法

1) DBA/2J マウス眼圧の時間経過

過去の報告で、DBA/2J マウスの眼圧は生後 6 ヶ月後ごろから上昇し始め、性別ではメスの眼圧が、オスより有意に高いとされている。その経過を再検するため、まずメスの生後 18 週から 30 週の眼圧をトノラボ眼圧計により 1 週ごとに測定する。眼圧の経過をグラフにプロットし、眼圧上昇の変遷を可視化して下記実験 2) に役立てる。

後述のように、既報と異なり、殆どの動物で有意な眼圧上昇を認めなかったため、生後 1 年を超えるより高齢の動物における眼圧の検討を追加で行った。また、DBA/2J マウスの眼圧上昇の原因とされる虹彩の異常（色素脱失、委縮、瞳孔異常）と、眼圧との間に相関があるかどうかとも検討した。

2) DBA/2J マウスに対するドネペジル持続投与

マウスの背部皮下にアセチルコリンエステラーゼ阻害薬塩酸ドネペジルを注入した浸透圧ミニポンプを留置する。開始後 4 週間ごとにミニポンプの入れ替えを行う。また眼圧は開始後 1 週間ごとに測定する。開始 11 週後に、上丘から蛍光トレーサーの逆行

性ラベルを行う。開始 12 週後に細隙灯顕微鏡写真の撮影、眼圧の測定の後、マウスを安楽死させて網膜フラットマウント標本を作成し、生存網膜神経節細胞数を測定する。最初の実験で投与する薬剤は、これまでの実験で最も強い神経保護効果を発揮したドネペジルとし、投与量はラット視神経切断モデルに対して経口投与した量

(10mg/kg/day) と体重あたり同一の量とする。ドネペジル投与を行ったマウスの生存網膜神経節細胞数を、同週齢の無投薬および溶解液のみ投与した対照マウスの生存網膜神経節細胞数と比較し、ドネペジルの神経保護効果を評価する。また、ドネペジル投与およびポンプ埋植による副作用、合併症の有無もモニタリングする。

3) ドネペジルの眼圧、虹彩色素脱失に対する影響

上記 2) の実験で得られた眼圧経過と実験終了時点の前眼部細隙灯顕微鏡所見を無投薬の対照マウスと比較し、塩酸ドネペジルの投与によって眼圧に変化が見られないかを統計学的に検討する。また、虹彩色素脱失に影響が見られないかを、各マウスの虹彩色素脱失の程度をグレード分類することによって検討する。

4. 研究成果

1) DBA/2J マウス眼圧の時間経過

生後 18 週から 31 週のメスマウスのべ 95 匹 190 眼のマウス用トノラボ眼圧計による眼圧測定を行った。結果、眼圧は平均 12mmHg であり、既報と異なり、正常値であった。既報では、眼圧は年齢とともに上昇すると報告されているが、我々の再検では、

18 週 14.5 \pm 2.9mmHg (n=18)

19 週 20.2 \pm 4.6mmHg (n=16)

20 週 13.9 \pm 3.3mmHg (n=14)

21 週 10.6 \pm 1.5mmHg (n=6)

24 週 10.4 \pm 1.3mmHg (n=24)

25 週 11.7 \pm 1.4mmHg (n=28)

26 週 10.5 \pm 1.2mmHg (n=26)

27 週 9.6 \pm 1.0mmHg (n=26)

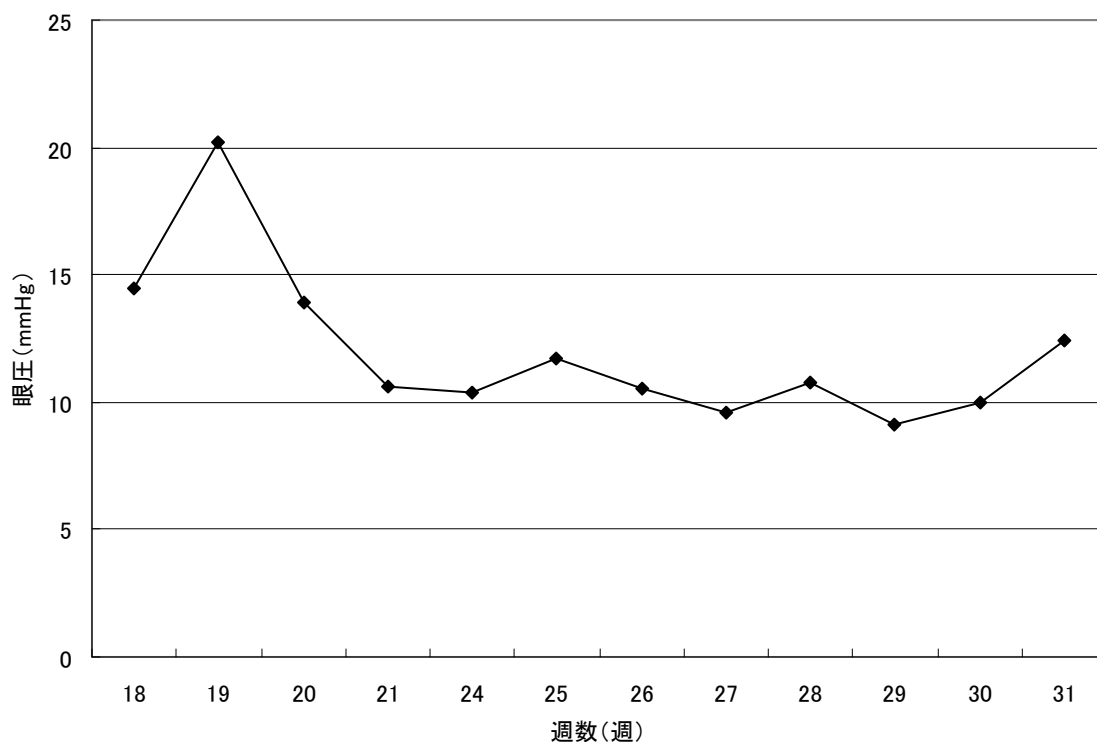
28 週 10.8 \pm 1.6mmHg (n=18)

29 週 9.1 \pm 0.8mmHg (n=6)

30 週 10.0 \pm 1.4mmHg (n=6)

31 週 12.4 \pm 2.5mmHg (n=6)

であり、経時的な上昇傾向はなく、またどの時点においても平均眼圧は正常範囲内であった。(グラフ)



そこで、より高い年齢のマウスの眼圧測定及び前眼部観察を行ったが(すべてメス)、64週では 9.1 ± 2.3 mmHg (n=9), 75週では 8.5 ± 1.8 mmHg (n=12)であり、22mmHg以上の高眼圧を呈した動物はなかった。一方、既報で見られる虹彩色素脱失および虹彩萎縮は全動物に、瞳孔異常は19眼(90.5%)に見られた。また眼球瘍による眼圧測定不能は64週の1眼に見られた。この結果から、我々の導入したDBA/2Jマウスでは、既報に見られる虹彩の異常は例外なく発症しているが、既報と異なり、それに伴う眼圧上昇が生じないことがわかった。

また、9週齢オスマウスでの検討では、検討した10眼のうち21mmHg以上の高眼圧を呈したものが1眼あり、48mmHgの著明な高値を示していたが、眼圧上昇の時点では虹彩の異常は伴っていなかった。この結果も、虹彩萎縮と眼圧に相関がない点で既報と矛盾している。

神経保護治療の効果確認のためには、同等の視神経負荷をかけた動物間で治療の有無による神経細胞生存率の相違を比較する必要があり、DBA/2Jマウスは眼圧値の個体差が大きく、眼圧上昇が見られる個体数が少なく、眼圧上昇を来たす個体を所見上区別することが出来ない点で、適していない。

2) DBA/2Jマウスに対するドネペジル持続投与

4匹の動物に塩酸ドネペジル(25mg/ml)を徐放するための浸透圧ミニポンプを背部皮下に埋植したが、埋植後3週間の間に2匹は死亡し、1匹はポンプの脱落を生じて以後の観察不能となった。投与量は、以前のラットでの検討で投与した量より少ない量であったので(体重換算)、埋植に伴う問題と考えられる。

3) ドネペジルの眼圧、虹彩色素脱失に対する影響

ポンプ埋植実験が予定通りに進まなかったため、観察できた個体数が少なかったが、観察できた個体の眼圧はすべて正常範囲であり、虹彩の異常も生じていなかった。これは同程度の週齢の対照マウスと同様の所見である。

4) 総括

今回の研究の結果により、少なくとも我々の導入した系においては、DBA/2Jマウスにおける眼圧上昇はほとんど見られないことがわかった。ごく一部の動物に眼圧上昇がみられたが、神経保護効果の検討に供するためには、薬剤を投与した動物と、投与しなかった対照との間で眼圧などの条件を同一にそろえねば、細胞死の比較を行うことができない。そのため、眼圧上昇をきたす個体が少なく、また、その眼圧経過にばらつきがあるこのモデルは、神経保護効果の評価に応用するのは難しい。

既報では、DBA/2Jマウスにおける眼圧上昇

は報告があるが、すべての個体に眼圧上昇が生じるかどうかについては記載がないものが多い。50%程度の個体に眼圧上昇がみられたとの報告はある。これまでの報告はほとんど、眼圧上昇がみられた個体における組織学的な変化などを調べたものであり、眼圧上昇が得られる頻度や時間経過に実験結果が左右されない種類の研究が多いため、眼圧の個体差が大きくとも影響が少なかったと考えられる。また、最近になって、眼圧上昇の見られない DBA/2J マウスでも、神経節細胞死は同様に起こっていたという報告があり、これは、虹彩異常と眼圧に相関がなかったという我々の研究結果と一致する内容である。DBA/2J マウスは、虹彩異常を呈し、一部の個体では眼圧上昇、神経節細胞死が見られるが、その間の因果関係が不明確であり、緑内障モデルとして神経保護効果の評価に応用するには多くの難点があると考えられる。

5. 主な発表論文等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三木 篤也 (MIKI ATSUYA)
大阪大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：30437404

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし