

令和元年6月24日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16971

研究課題名(和文) 網膜・視神経の神経保護と軸索再生研究

研究課題名(英文) Neuroprotection and axon regeneration of retinal ganglion cells and optic nerves

研究代表者

仙波 賢太郎 (SEMBA, Kentaro)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：10745748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：緑内障は主要な失明原因の一つであり、網膜神経節細胞(RGC)とその軸索の変性を特徴とする。緑内障のrisk factorとして高眼圧があるが、日本人の場合は眼圧上昇がみられない正常眼圧緑内障(NTG)が全体の約7割を占める。グルタミン酸輸送体の一つであるEAAC1の遺伝子欠損マウスは、眼圧上昇なしにRGCの変性を来すことからNTGモデルとして用いられている。EAAC1欠損マウスを用いてRho/ROCK阻害剤であるRipasudilの効果を検討した。その結果、Ripasudilは眼圧下降効果に加え、神経保護効果を有することが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

緑内障は我が国における最大の失明原因だが、眼圧降下以外にエビデンスのある治療法は存在せず、新たな治療法が待たれる状況にある。特に日本人の場合は正常眼圧緑内障が全体の約7割を占めるが、眼圧降下が著効を示さないケースも多く、直接的な神経保護薬の開発などが期待される。

研究成果の概要(英文)：Glaucoma, one of the leading causes of irreversible blindness, is characterized by progressive degeneration of optic nerves and retinal ganglion cells (RGCs). In the mammalian retina, excitatory amino acid carrier 1 (EAAC1) is expressed in neural cells, including RGCs, and the loss of EAAC1 leads to RGC degeneration without elevated intraocular pressure. We demonstrated that the topical administration of ripasudil reduces intraocular pressure and exerts neuroprotective effects on glaucomatous degeneration in EAAC1 knockout mice.

研究分野：眼科学

キーワード：正常眼圧緑内障 神経保護

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国における失明原因の多くは網膜および視神経の変性疾患で占められており、Quality of Life の観点からも大きな社会的問題となっている(図1)。日本における最大の失明原因は緑内障であり、40歳以上の有病率は約6%にのぼる。年齢とともに有病率が増加することから、今後我が国においては緑内障患者のさらなる増加が予想される。緑内障は眼圧上昇によって網膜神経節細胞(RGC)死とその軸索である視神経の変性が起きて、結果的に回復不能な視野障害に陥るものと考えられてきた。しかし本邦では眼圧が正常であるにもかかわらず緑内障症状を発症する「正常眼圧緑内障(NTG)」が全体の約7割を占めるという、驚くべき事実が判明している(Iwase et al. *Ophthalmology*, 2004)(図2)。エビデンスに基づいた唯一確実な治療法は眼圧下降治療であるが、NTGの中には十分な眼圧降下が得られても病期が進行する症例もあり、治療上の問題となっている。近年では眼圧降下を目的とした複数の点眼薬が新たに発売され、中には神経保護効果を有するものも存在する。例えば、最近国内で発売されたbrimonidine点眼薬では眼圧降下作用、RGCへの直接的な効果に加えて、グリア細胞を介した間接的な神経保護効果が見られることを報告した(Semba et al. *Cell Death and Disease*, 2014)。しかしこのような効果は限定的であることから、今後の緑内障治療においては眼圧以外の病態寄与因子の解明や新たな神経保護療法の開発が求められる状況にある。

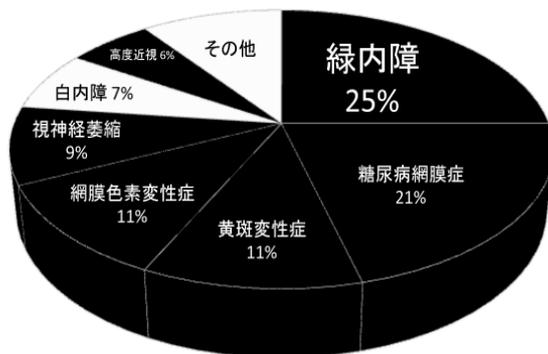
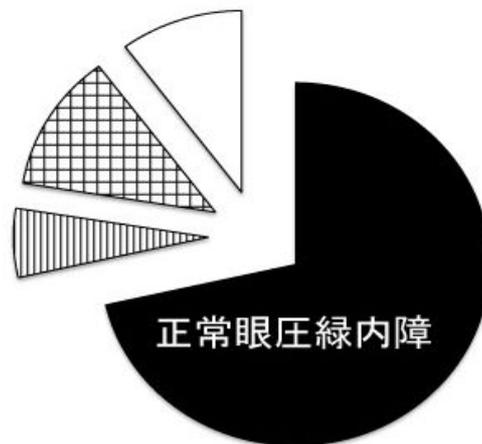


図1 我が国の失明原因。黒色部分は網膜と視神経の変性疾患。



- 正常眼圧緑内障
- ▨ 原発開放隅角緑内障
- ▤ 原発閉塞隅角緑内障
- 続発緑内障

図2 各緑内障病型の割合。

2. 研究の目的

緑内障の原因として注目されているものの一つにグルタミン酸毒性がある。グルタミン酸は中枢神経系における主要な神経伝達物質であり、学習や記憶などの他、視覚においても重要な役割を担っている。通常では細胞外グルタミン酸濃度はグルタミン酸輸送体により適切に制御されているが、虚血などの病的条件下では、過剰量のグルタミン酸による興奮毒性が細胞内への過剰なカルシウム流入をもたらし、神経細胞死を誘導することが知られている。網膜の内網状層においては双極細胞末端部に存在する glutamate transporter 1 (GLT-1)、RGC に存在する excitatory amino acid carrier 1 (EAAC1)、ミュラーグリア細胞に存在する glutamate/aspartate transporter (GLAST)の少なくとも3つのグルタミン酸輸送体がグルタミン酸濃度の調整に関与している。EAAC1 または GLAST の欠損(KO)マウスでは、眼圧が正常であるにもかかわらず慢性的なグルタミン酸毒性と酸化ストレスの亢進により、RGC 死と視神経変性が進行することが報告されている(Harada et al. *Journal of Clinical Investigation*, 2007; *Cell Death and Differentiation*, 2010)。グルタミン酸毒性や酸化ストレスは緑内障を含む様々な眼疾患において網膜障害との関係が報告されており、緑内障患者ではグルタミン酸輸送体やグルタチオンの減少がみられることなどから、これらのマウスはNTGの動物モデルとして有用であると考えられている。研究代表者はEAAC1 KOマウスを利用して、高血圧薬であ

る candesartan の内服が NTG 様症状の進行抑制に有用であることを見出した。そのメカニズムとして candesartan がアンジオテンシン受容体を介した酸化ストレスの産生を抑制することを報告している (Semba et al. *Cell Death and Disease*, 2014)。また解析法としては光干渉断層計 (OCT) による網膜イメージングと多局所網膜電位の測定 (VERIS) による視機能検査を組み合わせ、同一眼における非侵襲的かつ経時的観察を可能とした。この手法は実験動物数の抑制にもつながることから、極めて有用である。そこで本研究では、以上の NTG モデルマウスと網膜観察法を組み合わせ、既存薬を含めた様々な神経保護薬の探索を行う。

3. 研究の方法

本研究では NTG モデル動物を活用して、既存薬を含めた神経保護薬の探索と効果の検討を行う。候補薬については培養細胞における遺伝子や蛋白発現量の変化を、マイクロアレイや生化学的な手法で調べることによって選定する。投与後の網膜変性の状態を OCT や VERIS を利用して経時的に観察することにより、客観的なデータの取得を行う。

4. 研究成果

ROCK 阻害剤である Ripasudil (グラナテック®) はこれまでの緑内障点眼とは異なる新たな機序の緑内障点眼薬として使用されているが、眼圧降下以外の作用機序は必ずしも明確ではない。そこで EAAC1 KO マウスに対して 0.4% および 2% Ripasudil を、生後 5 週から 12 週にかけて毎日 1 回点眼投与して、その効果を検討した。その結果、Ripasudil 点眼群では PBS 点眼群よりも有意に RGC 死が抑制され、OCT にて網膜内層厚が保たれた。また、VERIS における振幅の減少も抑制された。両濃度における差は見られなかった。0.4% 点眼により眼圧は 13.2 ± 0.6 mmHg (平均値 \pm 標準誤差、 $n=12$) から 10.2 ± 0.5 mmHg へと有意に低下した。2% 点眼でも 0.4% 点眼と同等の眼圧低下を認めた。一方 EAAC1 欠損マウスでは網膜変性が始まる前の生後 5 週から、神経細胞死を誘導する p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) が網膜神経節細胞層で活性化されるが、Ripasudil 点眼群では生後 8 週において、その活性化が有意に抑制されていた。以上から Ripasudil 点眼の作用機序としては眼圧降下に加えて、神経保護効果も含まれることが予想される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- 1) Miki A, Sakurada Y, Tanaka K, **Semba K**, Mitamura Y, Yuzawa M, Tajima A, Nakatochi M, Yamamoto K, Matsuo K, Imoto I, Honda S. Genome-wide association study to identify a new susceptibility locus for central serous chorioretinopathy in the Japanese population. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 59:5542-5547, 2018. 査読あり, DOI 10.1167/iovs.18-25497.
- 2) Kinoshita T, Mitamura Y, Shinomiya K, Egawa M, Iwata A, Fujihara A, Ogushi Y, **Semba K**, Akaiwa K, Uchino E, Sonoda S, Sakamoto T. Diurnal variations in luminal and stromal areas of choroid in normal eyes. *Br J Ophthalmol* 101:360-364, 2017. 査読あり, DOI 10.1136/bjophthalmol-2016-308594.
- 3) Nishi T, Mizusawa Y, **Semba K**, Shinomiya K, Mitamura Y, Sakamoto T, Ogata N. Effect of optical correction on subfoveal choroidal thickness in children with anisohypermetropic amblyopia. *PLoS ONE* 12:e0189735, 2017. 査読あり, DOI 10.1371/journal.pone.0189735.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。