

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590090

研究課題名（和文）網膜血管の恒常性維持機構の分子基盤解明と新規緑内障治療薬開発への応用

研究課題名（英文）Molecular basis for the homeostatic mechanisms that maintain retinal blood vessels and the application for development of anti-glaucoma drugs

研究代表者

中原 努 (NAKAHARA TSUTOMU)

北里大学・薬学部・准教授

研究者番号：10296519

研究成果の概要（和文）：緑内障の発症と進行に、網膜循環障害の関与が示唆されている。本研究では、ラットの網膜虚血・再灌流及び NMDA 硝子体内投与網膜神経傷害モデルにおいて網膜血管が構造的・機能的に障害されることを示した。これらのモデルでは、視神経節細胞の脱落ならびに内網状層厚の減少により示されるように網膜内層に傷害が限局する。従って、網膜内層に存在する神経細胞が血管細胞にとっての成長因子・栄養因子の産生・遊離を介して血管構造を維持している可能性が考えられた。本研究において、視神経節細胞が血管内皮成長因子である VEGF を発現していることが明らかになった。視神経節細胞の脱落は、血管の機能と構造を維持するために十分な量の VEGF を供給できなくなるのかもしれない。このように網膜神経傷害は、網膜神経への血液供給の低下をもたらし更なる網膜神経傷害の悪化の原因になり得ることが示された。血管の構造と機能の維持は、緑内障、糖尿病網膜症、網膜虚血などの網膜疾患を防ぐ新たな治療戦略になり得るであろう。

研究成果の概要（英文）：It has been suggested that an impairment of retinal circulation contributes to the onset and progression of glaucoma. This study demonstrates that retinal blood vessels are damaged structurally and functionally in rat models of retinal degeneration induced by the retinal ischemia-reperfusion and by an intravitreal injection of NMDA. In these models, changes in retinal layer are limited in the inner retina as demonstrated by loss of retinal ganglion cells and thinning of inner plexiform layer. Therefore, it is likely that neuronal cells presented in the inner retina play a role in maintaining the vascular structure through production/release of growth factors and trophic factors for vascular cells. For example, in this study, we found that retinal ganglion cells express vascular endothelial growth factor (VEGF) in rat retina. The loss of retinal ganglion cells that are one of sources of VEGF in the retina may fail to provide sufficient amounts of VEGF for maintaining the vascular structure and function. Thus, neuronal cell damage may be an additional cause of progression of the retinal damage by reducing blood supply to retinal neurons. The protection of retinal vascular structure and function would be a novel strategy for preventing progression of glaucoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
21 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
22 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：薬理学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：薬理学、血管生物学、微小循環

## 1. 研究開始当初の背景

高齢社会を迎えた我が国では、糖尿病、高血圧症等の生活習慣病やアルツハイマー病等の老年病の克服に加え、Quality of Life (QOL) の改善・維持を指向した医薬品の開発が強く望まれている。外界から得られる情報の約 80% は視覚を介して入力されるため、QOL の改善・維持という点では、視機能の低下を伴う疾患への対応が特に重要である。糖尿病網膜症と緑内障は失明に至る可能性の高い疾患として知られるが、これら疾患の病態には網膜循環障害が深く関与しており、それによって生じる網膜虚血は、単に網膜神経細胞死をもたらすのみならず、血管透過性の高い脆弱な血管を新生させることによって循環動態をさらに悪化させるという悪循環を引き起こす。従って、網膜循環を正常化し、網膜虚血を解消することは、視覚障害の進行を阻止するうえで最優先されるべき治療法と言っても過言ではない。しかしながら、現在のところ、十分な効果が期待できる網膜循環改善薬／網膜血管保護薬は見出されていない。その理由として、網膜循環調節機構及び網膜血管の恒常性維持機構の理解が不十分である点が挙げられる。申請者らは、これまでに *in vivo* 網膜循環評価法、網膜血管イメージング法等、小動物を対象とした網膜循環・網膜血管に関する研究を行うための実験技術を開発し、基礎生理・薬理的検討を行ってきた。本研究において、緑内障モデル動物の網膜血管の構造と機能変化とその分子基盤を詳細に解析することにより、網膜血管の恒常性維持機構に関する新たな知見が得られるものと考えられた。

## 2. 研究の目的

網膜血管の恒常性維持機構の分子基盤を

解明し、新たな緑内障の予防・治療法を提案するために、1) 実験的緑内障モデルである高眼圧負荷網膜虚血・再灌流ラットにおいて観察される網膜血管の構造的・機能的変化の分子基盤の解明、2) 解明された機序に基づき網膜血管の構造的・機能的修復を行うことで網膜障害の進行抑制を試みる、さらに 3) 神経細胞保護が網膜血管の恒常性維持にいかに関与するか、の3点を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

ラット実験的緑内障モデル（高眼圧負荷網膜虚血・再灌流モデルと NMDA 硝子体内投与網膜傷害モデル）を使用した。高眼圧負荷網膜虚血・再灌流モデル：麻酔したラットの前眼房に刺入した注射針を介して 130 mmHg の高眼圧を負荷することで網膜への血流を遮断し（網膜虚血）、60 分後に眼圧を正常値に戻すことで網膜への血流を再開した（再灌流）。NMDA 硝子体内投与網膜傷害モデル：麻酔したラットの硝子体内に NMDA (200 mol) を投与した。両緑内障モデルの網膜血管の構造と機能変化を、申請者らが、これまでに確立してきた網膜血管イメージング法と *in vivo* 網膜循環評価法を用いて詳細に解析した。分子基盤については、血管の生存と機能調節に重要な役割を演じている vascular endothelial growth factor (VEGF) と transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) について、免疫組織化学的手法による網膜内発現分布と虚血再灌流による変化、及び各因子の作用抑制薬の血管と神経に対する効果について検討した。

## 4. 研究成果

1) 高眼圧負荷網膜虚血・再灌流ラットにおけ

る網膜血管の構造と機能の変化

#### ① 網膜血管の構造変化

網膜虚血・再灌流を行うと、その2日後から神経節細胞の脱落が観察されるが、7日目以降になると、網膜毛細血管内皮細胞の脱落が観察された。周皮細胞について4種類のマーカー ( $\alpha$ -SMA, desmin, NG2, PDGFR- $\beta$ ) に対する抗体を用いて染色様式を比較した結果、NG2抗体が網膜血管の周皮細胞を検討するのに適していると考えられた。そこで、NG2抗体を用いて検討を行ったところ、網膜のNG2陽性細胞は、網膜虚血・再灌流2日後に増加し、その後7、14日と経過するのに従い減少することが明らかになった。周皮細胞の減少は、内皮細胞のそれに遅れ、程度も小さいことから、内皮細胞が周皮細胞に先行して傷害される可能性が示唆された。一方、type IV collagenによって標識される血管基底膜の密度は今回の観察期間である網膜虚血・再灌流14日後まで、ほとんど影響を受けなかった。

#### ② 網膜血管の機能変化

眼底観察用デジタルマイクロスコープを用い、虚血・再灌流後の網膜血管径の変化を経日的に観察すると、2日後より、細動脈径の減少が認められた。また、7日後では、内皮依存性血管拡張薬の反応性の低下が認められた。血流中に投与したFITC-lectinで染色される毛細血管と、摘出後の免疫染色で染色される内皮細胞とを比較することから、虚血・再灌流14日後に残存している毛細血管の20%程度は、血液が流れていない無灌流血管であることが明らかになった。

### 2) 網膜虚血・再灌流による網膜血管の構造・機能的変化の機序

#### ① 神経細胞死の関与

網膜虚血・再灌流による網膜神経傷害に

NMDA受容体を介する経路が重要な役割を演じていることが知られている。そこで、NMDA硝子体内投与網膜神経傷害モデルにおいて検討を行ったところ、虚血・再灌流モデルに比べると軽度ではあるが、網膜血管の構造と機能が障害されることが見出された。過剰量のNMDAは、網膜神経に対して直接、傷害作用を示すため、網膜血管の構造・機能維持に網膜神経の存在が重要な役割を演じていることが示唆された。

#### ② VEGFの意義

血管内皮細胞の生存と機能維持に重要な役割を演じているVEGFのラット網膜における産生細胞と、虚血・再灌流の影響について免疫組織化学的に検討した。その結果、i) VEGFは視神経節細胞、ミュラー細胞、視細胞に強く発現していること、ii) 網膜虚血・再灌流は、VEGFの免疫活性を、網膜血管の退縮に先行して、血管が分布している視神経節細胞層から外網状層においては低下させるが、血管が分布していない外顆粒層においては低下させないことが明らかとなった。また、iii) 正常ラットの硝子体内にVEGF受容体チロシンキナーゼ阻害薬 (SU5416及びKRN633)を投与することにより、網膜表層部において毛細血管の一部が退縮することが明らかになった。以上の結果より、視神経節細胞により恒常的に産生・遊離されているVEGFが、網膜血管の構造維持に一部関与していることが示唆された。

#### ③ TGF- $\beta$ の意義

i) NMDA硝子体内投与7日後に観察される網膜毛細血管内皮細胞の脱落は、TGF- $\beta$ 阻害薬 (SB431542およびLY364947)をNMDAと同時に硝子体内に投与することによって、ほぼ完全に抑制された。同様に、網膜虚血・再灌流後に観察される毛細血管内皮細胞の脱落に対しても、TGF- $\beta$ 阻害薬は有意

な抑制効果を示した。正常ラットの硝子体内に TGF- $\beta$  阻害薬を投与しても網膜血管に対して影響は現れなかった。ii) 毛細血管内皮細胞の脱落が観察される NMDA 硝子体内投与 7 日後の網膜血管では、ペリサイトの配列や形態に異常が認められたが、TGF- $\beta$  阻害薬の処置によって認められなくなった。iii) 網膜における TGF- $\beta$  の発現分布について蛍光免疫染色法により検討を行った。TGF- $\beta$  の免疫活性は、網膜全層に認められたが、網膜虚血・再灌流および NMDA 硝子体内投与によって影響を受けなかった。TGF- $\beta$  受容体の発現分布については、幾つかの抗体を用いて検討を行ったが、十分な結果を得ることができず、今後の検討課題として残された。

以上の結果より、網膜が傷害性の刺激を受けると、何らかの機序を介して TGF- $\beta$  シグナルが増強し、網膜血管の恒常性維持機構が破綻することにより、血管が傷害される可能性が示唆された。網膜血管障害を阻止する上で、TGF- $\beta$  シグナル経路を標的とした分子が有望かもしれない。

## 総括

本研究によって、網膜神経細胞が傷害されると網膜血管が傷害され、網膜神経細胞への血液供給の低下と更なる網膜神経傷害という悪循環を招く可能性が示された。従って、網膜血管の構造と機能の維持は、緑内障をはじめ、糖尿病網膜症、網膜虚血などの網膜疾患の進行を抑制する上で有用な治療戦略になり得るものと考えられた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Ueda K, Nakahara T, Hoshino M, Mori A, Sakamoto K, Ishii K. Retinal blood vessels

are damaged in a rat model of NMDA-induced retinal degeneration. *Neurosci Lett*. 2010 Nov 12;485(1):55-9.

- ② Mori A, Miwa T, Sakamoto K, Nakahara T, Ishii K. Pharmacological evidence for the presence of functional  $\beta_3$ -adrenoceptors in rat retinal blood vessels. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2010 Aug;382(2):119-26.
- ③ Mori A, Suzuki S, Sakamoto K, Nakahara T, Ishii K. Role of calcium-activated potassium channels in acetylcholine-induced vasodilation of rat retinal arterioles in vivo. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2011 Jan;383(1):27-34.
- ④ Ogawa N, Mori A, Hasebe M, Hoshino M, Saito M, Sakamoto K, Nakahara T, Ishii K. Nitric oxide dilates rat retinal blood vessels by cyclooxygenase-dependent mechanisms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009 Oct;297(4):R968-77.
- ⑤ Mori A, Saigo O, Sakamoto K, Nakahara T, Ishii K. Hyperglycemia impairs acetylcholine-induced vasodilation of retinal arterioles through polyol pathway-independent mechanisms in rats. *J Pharmacol Sci*. 2009 Jun;110(2):160-8.

[学会発表] (計 5 件)

- ① 植田 香、中原 努、森 麻美、坂本謙司、石井邦雄、ラット網膜神経障害モデルにおける TGF- $\beta$  阻害薬の網膜血管保護効果、第 84 回日本薬理学会年会、2011.3.24.
- ② 植田 香、中原 努、森 麻美、坂本謙司、石井邦雄、緑内障モデルラットにおいて観察される網膜血管の構造的・機能的変化、第 11 回 Pharmacology-Hematology シ

ンポジウム、2010.6.18

- ③ 植田 香、中原 努、森 麻美、坂本謙司、石井邦雄、NMDA 硝子体内投与による網膜血管傷害の誘導、第 83 回日本薬理学会年会、2010.3.16
- ④ 中原 努、星野真耶、星野真一郎、植田香、森 麻美、坂本謙司、石井邦雄、緑内障モデルラットを用いた網膜血管の構造・機能維持機構の解析、生体機能と創薬シンポジウム 2009、2009.8.26
- ⑤ 星野真耶、中原 努、石井邦雄、網膜血管のペリサイトに及ぼす虚血再灌流の影響、第 82 回日本薬理学会年会、2009.3.16

〔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：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

中原 努 (NAKAHARA TSUTOMU)

北里大学・薬学部・准教授

研究者番号：10296519

(2) 研究分担者

森 麻美 (MORI ASAMI)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：80453504