

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 6 月 11 日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592262

研究課題名（和文） 網膜障害後の視覚野の形態学的機能的変化及びその薬理的治療

研究課題名（英文） Morphological and functional changes in visual cortex after retinal damage and its pharmacological approach

研究代表者 原 英彰（HARA HIDEAKI）

岐阜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：20381717

研究成果の概要（和文）：

緑内障の病態における網膜神経節細胞障害後の視路、すなわち視神経及び外側膝状体（LGN）の変性について、サル緑内障モデルを用いて、病態の早期における LGN の変化を PET (Positron Emission Tomography) により検討し、さらに眼圧上昇に伴う網膜・視神経障害と LGN の組織変化を比較した。本モデルにおける LGN の神経細胞死機序に小胞体ストレスが関与していることを明らかにした。また、緑内障早期の LGN において末梢型ベンゾジアゼピン受容体（PBR）陽性活性化ミクログリアが増加し、PET による非侵襲的な PBR イメージングが緑内障の早期診断に有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We examined lateral geniculate nucleus (LGN) degeneration secondary to experimental hypertensive glaucoma as an indicator for glaucoma in ocular hypertensive monkeys using positron emission tomography (PET), and validated glial activation by morphological and immunohistochemical examinations. Furthermore, we investigated whether endoplasmic reticulum (ER) stress was involved in the pathophysiological mechanisms underlying neuronal death of the LGN after intraocular pressure (IOP) elevation. In the present study, we showed that ER stress may play a pivotal role in neuronal death of the LGN after IOP elevation, that glial activation occurs in the LGN, and that the LGN degeneration could be detected by a PET imaging after unilateral ocular hypertension. Therefore, activated glial markers such as PBR in the LGN may be useful in noninvasive molecular imaging for diagnosis of glaucoma.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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

1. 研究開始当初の背景

緑内障は、『視神経と視野に特徴的变化を有し、通常、眼圧を十分に下降させることにより視神経障害を改善もしくは抑制しうる眼の機能的構造的異常を特徴とする疾患』と定義されており、本邦における中途失明原因の第1位を占める疾患である。緑内障は網膜神経節細胞(RGC)およびRGCから脳に投射している視神経軸索の変性・脱落を特徴とし、眼圧またはその他の原因により徐々にその変性が進行する。緑内障におけるRGC死は視神経の投射経路である外側膝状体(LGN)神経細胞の経シナプス変性を伴うことが知られている。しかしながら、緑内障の病態におけるRGC障害後の視路の変性、すなわち視神経変性並びにLGNの変性については、十分に明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、外側膝状体(lateral geniculate nucleus: LGN)における機能的変化を明らかにすることによって、緑内障などの網膜疾患の視野障害のメカニズムを解明することにあった。具体的には、アルゴンレーザー誘発サル高眼圧モデルLGN神経障害に対する小胞体(ER)ストレスの関与を検討した。さらに、ポジトロン断層撮影法(PET: Positron Emission Tomography)を用いてLGNの変化について検討した。

3. 研究の方法

実験方法は以下のとおりである。

- 1) 眼圧上昇は、カニクイザル左眼隅角部の線維柱帯アルゴンレーザー光凝固焼灼を行い誘発させた(サル緑内障モデル)。レーザー照射0から24週間後に眼底写真の撮影を行い、その後、脳を経時的に摘出し、切片を作製した。
- 2) LGN神経細胞数及び細胞体の面積は、抗parvalbumin抗体を用いて免疫染色を行い測定した。LGN細胞死の定量的解析は、terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) TUNEL染色を行い、その陽性細胞数を測定した。LGN細胞死に対するERストレス関連タンパク質の関与を調査するために、抗polyubiquitin、抗phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 (p-eIF2)及び抗C/EBP-homologous protein (CHOP)抗体を用いて免疫染色を行った。
- 3) 本モデルを用いて、病態の早期におけるLGNの変化をPETにより検討し、さらに眼圧上昇に伴う網膜・視神経障害とLGNの組織変化を比較した。緑内障モデルは雄性カニクイザル5頭の片眼の線維柱帯にアルゴンレーザーを照射し、慢性的な高眼圧を誘導することにより作製した。

4. 研究成果

- 1) 高眼圧サル視神経投射領域である対側のLGNの1、4、6層及び同側のLGNの2、3、5層においてparvalbumin陽性神経細胞数及び細胞体の面積は、アルゴンレーザー照射4週間後から有意な減少が認め

られた。これらの領域において、TUNEL、polyubiquitin、p-eIF2 及び CHOP 陽性細胞数がアルゴンレーザー照射 11 から 24 週間後に増加した。これらの結果より、サル高眼圧モデル LGN の神経細胞死機序に小胞体ストレスが関与していることを見出した。さらに、小胞体ストレス応答を標的とした治療が、緑内障における神経保護に有用である可能性を見出した。

2) レーザー照射 4 週目の早期において両側の LGN、特に高眼圧眼と同側において末梢性ベンゾジアゼピン受容体 (PBR) リガンドである [^{11}C] (R) PK11195 の結合活性の有意な増加が認められた ($n = 4$, $p < 0.05$)。病理組織解析により、レーザー照射 4 週目以降において高眼圧眼から投射を受けている LGN の各層に PBR 陽性細胞の強い発現が検出された。一方、正常対側眼から投射を受けている LGN の各層には PBR 陽性細胞はほとんど検出されなかった。同様に、高眼圧眼から投射を受けている LGN の各層に ionized calcium-binding adapter molecule-1 (Iba-1) 陽性活性化ミクログリアおよび glial fibrillary acidic protein (GFAP) 陽性活性化アストロサイトが検出された。さらに、Iba-1 陽性活性化ミクログリアの一部に PBR が発現していることが認められた。

3) 本研究はサル緑内障モデルを用いて、その病態における LGN の変化を PET により検討した。 [^{11}C] PK11195 を用いた活性化ミクログリアの非侵襲的な PET イメージングは多発性硬化症、アルツハイマー病、

パーキンソン病およびハンチントン病など、様々な神経変性疾患に広く利用されている。 PBR は正常脳のような活性化していないミクログリアやアストロサイトではその発現レベルは低いあるいは発現していないが、それらが活性化されることにより発現が増加する。

4) 研究代表者らはサル緑内障モデルにおいて高眼圧後の慢性期 (4-12 ヶ月) において LGN 内に [^{11}C] PK11195 の高い結合活性が検出されることを見出し、すでに報告している。今回さらに、同モデルにおいて緑内障の早期 (4 週間) においても [^{11}C] PK11195 の結合活性が有意に増加していることを見出した (平成 23 年度論文掲載、下記研究発表参照)。

以上より、緑内障早期の LGN において PBR 陽性活性化ミクログリアが増加し、PET による非侵襲的な PBR イメージングが緑内障の早期診断に有用である可能性が示唆された。ただし、本研究成果はあくまでも実験的緑内障モデルを用いたもので、緑内障患者において PBR のイメージングが早期診断に有用であるか否かは今後の検討課題である。

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 6 件)

- 1) Shimazawa M., Ito Y., Inokuchi Y., Yamanaka H., Nakanishi T., Hayashi T., Ji B., Higuchi M., Suhara T., Imamura K., Araie M., Watanabe Y., Onoe H. and Hara H. An alteration in the lateral geniculate nucleus of experimental glaucoma monkeys: In vivo positron emission tomography imaging of glial activation. PLoS ONE, 7, e30526, 2012.
- 2) Ito Y., Shimazawa M., Inokuchi Y., Yamanaka H., Tsuruma K., Imamura K.,

- Onoe H., Watanabe Y., Aihara M., Araie M. and Hara H. Involvement of endoplasmic reticulum stress on neuronal cell death in the lateral geniculate nucleus in the monkey glaucoma model. *European Journal of Neuroscience*, 33,843-855, 2011.
- 3) Ito Y., Nakamura S., Tanaka H., Tsuruma K., Shimazawa M., Araie M. and Hara H. Lomerizine, Ca²⁺-channel blocker, protects against neuronal degeneration within the visual center of the brain after retinal damage in mice. *CNS Neuroscience and Therapeutics*, 16, 103-114, 2010.
 - 4) Tanaka H., Ito Y., Nakamura S., Shimazawa M. and Hara H. Involvement of brain-derived neurotrophic factor in time-dependent neurodegeneration in the murine superior colliculus after intravitreal injection of N-methyl-D-aspartate. *Mol. Vision*, 662-669, 2009.
 - 5) 新家眞, 北澤克明, 山本哲也, 澤田明, 岩瀬愛子, 山本精一郎, 吉村健一, 原 英彰, 嶋澤雅光, 伊藤保志, 山嶋哲盛, 今村和幸, 笹岡正顕, 太田貴史, 水野憲, 川北耕二, 大橋靖雄, 白土城照, 山崎芳夫, 松本長太, 玉置泰裕, 相原 一, 富所敦男, 永原幸, 山上淳吉, 古関信之, 石井清, 高山淳, 長谷川智之, 間山千尋, 内田彩子, 山田秀之, 大橋正明, Yi-Ning Chen, 佐伯忠賜朗, 重枝崇史, 村田博, Kelvin Lee, 鶴我英和, Mao Nakayama, 山岸麗子, 緑内障：眼圧非依存障害因子への挑戦 —ネズミ・サル・そしてヒトへ—, 日本眼科学会雑誌, 115, 213-237, 2012.
 - 6) 嶋澤雅光, 原 英彰, PET を用いた緑内障早期診断法の確立, PET ジャーナル, 13, 10-11, 2011.
- [学会発表](計 19 件)
- 1) 嶋澤雅光, 原 英彰, 網膜疾患における小胞体ストレスの関与と新規治療戦略, 日本薬学会第 132 年会, 2012.3.28, 札幌
 - 2) 原 英彰, 網膜虚血障害の発症機序解明とその治療, 第 13 回 Japan Glaucoma Council, 2011.12.10, 東京
 - 3) 原 英彰, Brain imaging in laser-induced ocular hypertensive monkeys using PET and MRI. 浙江大学薬学院 招待講演, 2011.11.17, 中国、杭州
 - 4) 原 英彰, Brain imaging in laser-induced ocular hypertensive monkeys using PET and MRI. 中国薬科大学 招待講演, 2011.11.14, 中国、南京
 - 5) 嶋澤雅光, 原 英彰, 網膜・視神経障害に伴う視路変性およびその治療戦略, 第 54 回 日本神経化学大会, 2011.9.26, 金沢
 - 6) 原 英彰, 嶋澤雅光, PET および MRI を用いた緑内障モデルサルにおける分子脳イメージング, 第 34 回 日本神経科学大会, 2011.9.14-17, 横浜
 - 7) 嶋澤雅光, 鶴間一寛, 原 英彰, 緑内障性視神経症と神経変性疾患の関連, 第 115 回 日本眼科学会総会, 2011.7.8, 名古屋
 - 8) 三輪彰範, 伊藤保志, 鶴間一寛, 嶋澤雅光, 原 英彰, NMDA 誘発視神経障害における小胞体ストレスの関与, 第 119 回 日本薬理学会近畿部会, 2011.7.8, 名古屋
 - 9) 原 英彰, 眼疾患における脳内分子イメージング, 大阪医科大学眼科オープンカンファレンス 第 127 回特別講演, 2011.6.16, 高槻
 - 10) 嶋澤 雅光, PET を用いた緑内障早期診断法の確立, 第 5 回 日本分子イメージング学会学術集会, 2011.5.22, ピアザ淡海 (滋賀県)
 - 11) 原 英彰, Brain imaging in ocular hypertensive monkeys using PET and MRI. 3rd Ocular Diseases & Drug Discovery. 2011.5.26, Boston, MA, USA
 - 12) 林 拓也, 緑内障視神経障害モデル動物における拡散テンソル画像, 第 5 回 日本分子イメージング学会学術集会, 2011.5.22, ピアザ淡海 (滋賀県)
 - 13) 原 英彰, 緑内障における外側膝状体と大脳皮質の分子イメージング, 第 115 回 日本眼科学会総会, 2011.5.12, 東京
 - 14) 原 英彰, 視神経と中枢の変化, 第 12 回 Japan Glaucoma Council, 2010.12.11, 東京
 - 15) 嶋澤 雅光, 分子イメージングを用いた緑内障早期診断及び創薬研究, 第 2 回 異分野交流研究会, 2010.12.10, 岐阜薬科大学 (岐阜市)
 - 16) Hideaki Hara, Evaluations of retina and brain imaging in an experimental model for glaucomatous monkeys. Asia-Pacific Joint Glaucoma Congress 2010 Taipei, 2010.12.5, Taipei International Convention Center (Taipei, Taiwan)
 - 17) Takuya Hayashi, Modeling glaucomatous neurodegeneration using diffusion tensor, imaging. 2010 World Molecular Imaging Congress, 2010.9.9, Kyoto International Conference Center (国立京都国際会館) (京都府)
 - 18) 嶋澤 雅光, サル PET 及び MRI を用いたレーザー照射誘発高眼圧後の脳のイメージング, 第 84 回 日本薬理学会年会, 2010.3.23, パシフィコ横浜 (横浜市)
 - 19) 伊藤保志他, サル高眼圧モデルにおける視覚中枢の形態学的・経時的変化, 第 115 回 日本薬理学会近畿部会, 2009. 6. 26, 金沢

〔図書〕(計 1 件)

Imamura K., Shimazawa M., Onoe H., Watanabe Y., Ishii K., Mayama C., Akasaki T., Shimegi S., Sato H., Nakadate K., Hara H. and Araie M. InTech, Croatia, Central changes in glaucoma: Neuroscientific study using animal models, In: The Mystery of Glaucoma (eds. by Tomas Kubena), chapter 17, 2011 .

〔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

原 英彰 (HARA HIDEAKI)
岐阜薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：2 0 3 8 1 7 1 7

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

嶋澤 雅光 (SHIMAZAWA MASAMITSU)
岐阜薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：8 0 3 8 1 7 2 1

新家 眞 (ARAIE MAKOTO)
東京大学・医学部附属病院眼科・教授
研究者番号：0 0 0 9 2 1 2 2

渡辺 恭良 (WATANABE YASUYOSHI)
大阪市立大学・大学院医学研究科・システム神経科学・教授
研究者番号：4 0 1 4 4 3 9 9