

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 12 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22790260

研究課題名（和文） 緑内障モデルラットにおける網膜循環障害機序の解明と
新規緑内障治療薬の探索研究課題名（英文） Elucidation of the dysfunctional mechanisms of retinal circulation
in the rat models of glaucoma and exploration of novel therapeutic drugs for glaucoma.

研究代表者

森 麻美 (MORI ASAMI)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：80453504

研究成果の概要（和文）：緑内障モデル動物である網膜虚血再灌流及び N-メチル-D-アスパラギン酸硝子体内投与モデルラットにおいて、血管内皮細胞を介した網膜血管拡張機能障害が生じている一方で、血管平滑筋を介した機能は障害されていないことを明らかにした。従って、網膜循環不全が緑内障における網膜神経傷害を加速させる可能性がある。また、網膜虚血再灌流モデルラットにおける著しい網膜血管の攣縮に、エンドセリン-1 が関与していることも示唆された。プロスタノイド EP2 受容体刺激薬は、緑内障モデルの網膜血管を拡張させ、また網膜神経傷害を抑制した。このことから、プロスタノイド EP2 受容体刺激薬は緑内障の新規治療薬となりうる。

研究成果の概要（英文）： I revealed that vasodilator responses of retinal blood vessels mediated through the mechanism via activation of endothelial cells, but not those to direct stimulation of smooth muscle, was attenuated in the rat models of glaucoma, which was induced by retinal ischemia-reperfusion or intravitreal injection of N-methyl-D-aspartic acid. These results suggested that abnormal retinal circulation in glaucoma may accelerate retinal degeneration. It was also suggested that endothelin-1 played an important role to induce severe constriction of the retinal vasculature in the ischemia-reperfusion model. An agonist of prostanoid EP2 receptor dilated retinal blood vessels in the glaucoma model rats, as in the normal rats and inhibited the retinal nerve injury. These results suggest that prostanoid EP2 receptor agonists may be novel candidate drugs for prevention and/or treatment of glaucoma.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：薬理学・微小循環・緑内障・血管生物学・網膜

1. 研究開始当初の背景

わが国の主要な後天性失明原因疾患第一位は緑内障である。緑内障は、眼圧の上昇に

よって網膜神経細胞死が生じ、視覚障害をもたらす疾患と捉われてきた。そのため、緑内障の研究は、網膜神経細胞死の機序解明や神

経保護薬の探索の関するものがほとんどであり、網膜循環に着目した報告はほとんどない。しかし、近年、正常眼圧緑内障の増加に伴い、その機序として網膜循環障害が注目されつつあり、網膜循環不全の改善が、緑内障による視覚障害の発症と進行を抑制する上で極めて重要と考えられる。

申請者は、急性緑内障動物の高眼圧負荷網膜虚血・再灌流モデルラットの網膜血管が著しく収縮していること、また、内皮依存性網膜血管拡張反応が減弱することを明らかにしている。しかし、その作用機序に関しては不明なままであり、また他の緑内障モデルにおいても同様に網膜血管拡張機能障害が生じるかは明らかではない。緑内障時に網膜血管機能が障害されているか否かを検討し、網膜循環障害が生じているのであれば、網膜循環を改善することが緑内障の新規治療薬の開発へと繋がるのではないかと考え、本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究は、申請者らが独自に構築した各種網膜循環評価法を用いて、緑内障病態時に生じる網膜循環障害に関与する因子を同定し、その障害を正常化することによって、網膜神経傷害をも改善することを最終的な目的とした。

3. 研究の方法

(1) 網膜血管反応性の評価：ラットの眼底を、申請者らが作成した小動物用眼底撮影デジタルマイクロスコープを用いて経時的に撮影した。実験終了後に撮影した眼底像の画像処理を行い、網膜血管径を測定することにより評価した。

(2) 網膜血流量の測定：小動物用眼底撮影デジタルマイクロスコープを用い、ラットに青色色素を急速静脈内投与した際の眼底像を動画撮影した。撮影した動画から連続した静止画を書き出し、色調変化を画像処理することで網膜循環時間を算出した。さらに、同じ部位の網膜血管径を測定した。網膜血流量は測定した網膜循環時間と網膜血管径から算出した。

(3) 網膜虚血・再灌流 (I/R) モデルラットを用いた検討：麻酔下のラット前眼房部に 130 mmHg の圧を 1 時間負荷した後血流を再開させ、3 日後あるいは 14 日後に独自に構築した小動物用眼底撮影装置を用いて、網膜血管反応性を評価した。

(4) N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 硝子体内投与モデルラットを用いた検討：麻酔下の硝子体に 200 nmol/eye の NMDA を投与し、14 日後に血管反応性を同様に評価した。

4. 研究成果

(1) I/R モデルラットを用いた検討

①網膜血管攣縮におけるエンドセリン (ET-1) の役割：I/R 3 日後に ET_{A/B} 受容体遮断薬を静脈内投与すると、I/R モデルラットの網膜血管が著しく拡張した。この結果から、I/R モデルラットの網膜血管攣縮には、ET-1 の上昇が関与していることを示唆した。

②血管拡張性プロスタノイドの血管反応性：I/R モデルラットにおいて、プロスタノイド EP2 受容体を介した網膜血管拡張反応は健常ラットと同程度であったことから、内皮機能障害を生じている I/R モデルラットにおいて、EP2 受容体は障害されていない可能性を示唆した。この EP2 受容体刺激薬は、網膜循環改善作用のみならず、網膜神経傷害に対する保護作用も示している (Mori et al., *Eur J Pharmacol.*, 616: 64-67, 2009)。従って、EP2 受容体刺激薬は新規緑内障治療薬となりうる。

(2) NMDA 硝子体内投与モデルラットを用いた検討

①網膜血管内皮及び平滑筋細胞の機能的変化：NMDA 硝子体内投与モデルラットの網膜血管は、健常ラットと比較して収縮していなかった。しかし、血管内皮依存性拡張薬であるアセチルコリン (図1A) 及びアデノシン (図1B) による網膜血管拡張反応が減弱していた。また、アセチルコリンの内皮由来過分極因子様の網膜血管拡張反応も同様に弱まっていた (図1C)。

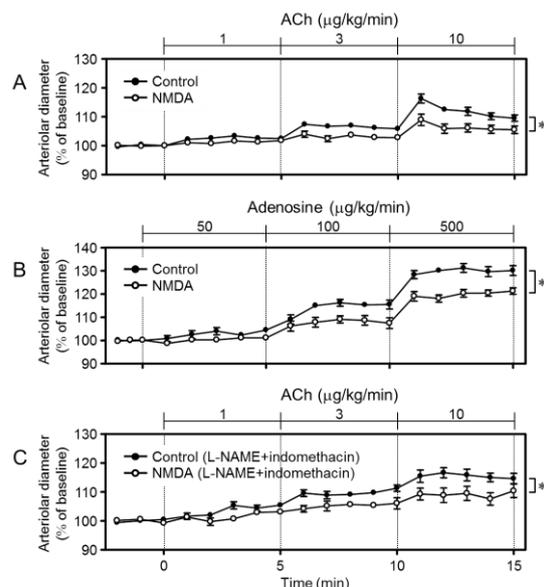


図 1: 緑内障モデルラットにおける ACh (A), adenosine (B) 及び ACh の EDHF (C) による網膜血管反応性の変化

緑内障 (NMDA) モデルラットにおける ACh, adenosine, NO 合成酵素及び COX 阻害薬存在下の ACh による網

膜細動脈増大反応は健常 (Control) ラットと比較して有意に減弱していた。

一方、NMDA 硝子体内投与モデルラットにおけるNO 供与体、 β_2 アドレナリン受容体及び β_3 アドレナリン受容体刺激薬による網膜血管拡張反応は、健常ラットにおける反応と同程度であった。これらの結果は、NMDA 硝子体内投与モデルラットにおいても網膜血管内皮を介した拡張機能障害が生じているが、網膜血管平滑筋を介した拡張機能は正常である可能性を示唆している。

②NMDA 硝子体内投与モデルラットにおける β_3 -AR 刺激薬の網膜循環及び網膜神経細胞に対する効果: NMDA 硝子体内投与モデルラットに β_3 -AR 刺激薬の投与により、健常ラットと同様の網膜血流量の増大が観察された(図2)。このことは、 β_3 -AR 刺激薬が緑内障においても有効な網膜循環改善薬であることを示唆している。 β_3 -AR 刺激薬は網膜神経傷害に対する保護効果を有するか否かについては今後の検討課題である。

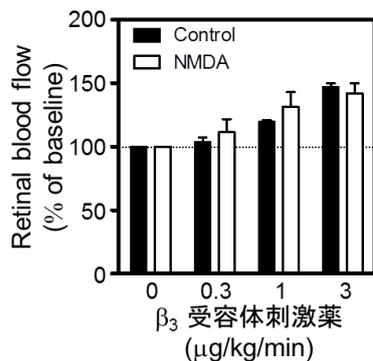


図2: 緑内障モデルラットにおける β_3 受容体刺激薬の網膜血流量に対する効果

健常 (Control) ラットで観察される β_3 受容体刺激薬による網膜血流量増大作用は、緑内障 (NMDA) モデルラットにおいても同様に観察された。

(3) 総括

緑内障モデルラットでは、網膜血管内皮機能障害に伴う網膜循環不全が生じることが明らかになった。緑内障モデルラットにおいては、処置 2 日後という早期の段階から網膜神経傷害が生じるが、この時点での網膜血管反応性は変化していないものと考えられる。しかし緑内障発症後、網膜循環障害が惹起されると、網膜神経に十分な酸素と栄養が供給できなくなることで網膜神経傷害をさらに加速させる可能性がある。従って、EP2 受容体刺激薬のような網膜神経保護作用を有し、さらには緑内障血管障害時にも網膜循

環を改善する薬物が、緑内障の病態進行を抑制する新規緑内障治療薬となるかもしれない。

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 0 件)

[学会発表] (計 9 件)

① Mori A, Takei T, Morita M, Nakagawa S, Sakamoto K, Nakahara T, Ishii K. L-Citrulline dilates retinal blood vessels in rats. 第 85 回日本薬理学会年会 (京都) 日本薬理学会 2012.3.15

② Takei T, Mori A, Morita M, Nakagawa S, Sakamoto K, Nakahara T, Ishii K. L-Citrulline ameliorates dysfunction of retinal circulation in diabetic rats. 第 85 回日本薬理学会年会 (京都) 日本薬理学会 2012.3.14

③ 森 麻美, 鈴木佐知, 坂本謙司, 中原 努, 石井邦雄 EDHF は BK_{Ca} チャネルを介してラット網膜血管を拡張させる 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2011 (東京) 日本薬学会薬理系薬学部会 2011.8.31

④ 森 麻美, 花田真幸, 坂本謙司, 中原 努, 石井邦雄 新規網膜血流量測定システムの構築とそれによる網膜循環改善薬の探索 第 12 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム 2011.6.18

⑤ 森 麻美, 花田真幸, 坂本謙司, 中原 努, 石井邦雄 NMDA 誘発緑内障モデルにおける網膜血管反応性の変化 第 124 回日本薬理学会関東部会 2011.6.4

⑥ Hanada M, Mori A, Sakamoto K, Nakahara T, Ishii K Changes in responsiveness of the retinal blood vessels induced by intravitreal injection of NMDA in rats 第 84 回日本薬理学会年会 2011.3.24

⑦ 森 麻美, 鈴木佐知, 坂本謙司, 中原 努, 石井邦雄 ACh 誘発 EDHF 様ラット網膜血管拡張反応における BK_{Ca} チャネルの役割 第 20 回日本循環薬理学会 (札幌) 日本循環薬理学会 2010.11.11 [第 38 回薬物活性シンポジウム・第 20 回日本循環薬理学会口演要旨集 P94. 2010.11]

⑧ 中原 努, 植田 香, 星野真耶, 星野真一郎, 森 麻美, 坂本謙司, 石井邦雄 緑内障モデル動物における網膜血管の構造・機能障害機序の解析と創薬への応用 第 28 回白金シンポジウム・北里大学薬学部「文部科学省ハイテク・リサーチ・センター整備事業研究報告会 ドラッグアブル化合物ライブラリーの構築とリード化合物の創生 (東京) 2010.12.22

⑨ Kunio Ishii, A Mori, K Sakamoto, T Nakahara. NO dilates rat retinal blood vessels through the

COX-1-dependent prostanoids-cAMP signalling pathway in vivo. 16th World Congress on Basic and Clinical Pharmacology WorldPharma 2010. (Copenhagen, Denmark) 2010.6.17-23

〔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

森 麻美 (MORI ASAMI)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：80453504

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：