

を抑制可能な事を示した。ラット眼における視神経近傍の血管系の解剖を明らかにした。

#### D. 考察

正常眼圧緑内障においては循環動態の不全を示唆する非眼圧要因が重要な病因となっている事は本症の眼圧下降以外の治療法開発の基礎となる重要な知見である。また、安全に負荷可能な装置による炭酸ガス負荷、既に高血圧症などに使用されているカルシウム拮抗薬が正常眼圧緑内障の視神経領域における循環動態改善に働く事は、本症に対して従来とは異なる治療法を行いうる事を示唆する重要な発見である。特に、乳頭出血が予後不良因子として重要である事を明らかにした事は、今後乳頭出血の出現のコントロールによる緑内障治療の可能性を示すものであり、意義は大きいと考える。一方、手術による十分な眼圧下降の有用性を従来例のない長期成績から確認できた事も本症に対する治療を考える上での大きな進歩であると考えられる。

原発開放隅角緑内障においても循環障害の関与が大きい事を示す事ができた事は、とすれば眼圧下降治療のみになりがちな本症の管理方針を転換させる事ができる可能性を示唆する。また、本症における遺伝子解析による新たな遺伝子変異の発見は緑内障の分類、治療を遺伝子レベルで考える可能性を示すものである。

MK-801やメマンチンなどのNMDA受容体遮断薬、FK-506(タクロリムス)、交感神経 $\beta$ 遮断薬(ベタキソロール)による緑内障性視神経症における網膜神経節細胞の神経保護作用の証明は、こうした薬物が将来の緑内障視神経症治療薬の候補者となりうる可能性を示すものである。また、ラットの血管系の精密な解剖を明らかにした事はこの方面の研究促進の上で、その意義はきわめて大きい。

#### E. 結論

正常眼圧緑内障においては非眼圧要因が眼圧要因とともに重要な病因となっている。カルシウム拮抗薬、炭酸ガスは正常眼圧緑内障の視神経領域における循環動態を改善させる。手術

による十分な眼圧下降は正常眼圧緑内障の視野障害進行の停止に有用である。NMDA受容体遮断薬、FK-506(タクロリムス)は緑内障による網膜神経節細胞の消失を用量依存性に抑制する。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Niwa Y, Harris A, Kagemann LE, Yamamoto T, Matsubara M, Takahashi D, Kitazawa Y: The effect of carbon dioxide on orbital hemodynamics determined by color Doppler imaging. *Jpn J Ophthalmol* 43: 16-19, 1999

Uchida H, Yamamoto T, Tomita G, Kitazawa Y: Peripapillary atrophy in primary angle-closure glaucoma: a comparative study with primary open-angle glaucoma. *Am J Ophthalmol* 127: 121-128, 1999

Daugeliene L, Yamamoto T, Kitazawa Y: Risk factors for visual field damage progression in normal-tension glaucoma eyes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 237: 105-108, 1999

Fingert JH, Heon E, Dickinson J, Liebmann JM, Yamamoto T, Craig JE, Rait J, Kawase K, Hoh ST, Buys YM, Dickinson J, Hockey RR, Williams-Lyn D, Trope G, Kitazawa Y, Ritch R, Mackey DA, Alward WL, Sheffield VC Stone EM: Analysis of myocilin mutations in 1703 glaucoma patients from five different populations. *Hum Mol Genet* 8: 899-905, 1999

Yamamoto T, Kitazawa Y, Ishida K, Daugeliene L: Role of trabeculectomy and calcium-channel blockers in the treatment of normal-tension glaucoma. *Glaucoma Update Vol VI*. Ed by Kriegelstein GK p163-166 Springer Verlag, Heidelberg, Germany, 1999

Kitazawa Y, Yamamoto T, Ishida K: Disc hemorrhage as a risk factor for progression of normal-tension glaucoma. *Pathogenesis and Risk Factors of Glaucoma*. Ed by Gramer E & Grehn F p145-154 Springer Verlag, Heidelberg, Germany, 1999

Kitazawa Y, Yamamoto T, Tomita G, Niwa Y: Calcium channel blockers and ocular blood flow

in normal tension glaucoma. Current Concepts on Ocular Blood Flow in Glaucoma. Ed by Pillunat LE, Harris A & Greve EL p235-240 Kugler Publications, The Hague, The Netherlands, 1999

Yamamoto T, Maeda M, Sawada A, Sugiyama K, Taniguchi T, Kitazawa Y, Oyama Z, Ichihashi N, Takagi H, Kitajima Y: Prevalence of normal-tension glaucoma and primary open-angle glaucoma in patients with collagen diseases. *Jpn J Ophthalmol* 43: 539-542, 1999

Sugiyama K, Gu ZB, Kawase C, Yamamoto T, Kitazawa Y: Optic nerve and peripapillary choroidal microvasculature of the rat eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40: 3084-3090, 1999

谷照斌、山本哲也、川瀬千鶴、松原正幸、川瀬和秀、澤田明、北澤克明: ラット実験的緑内障における N-メチル-D-アスパラギン酸受容体阻害薬の神経保護作用の検討. *日眼会誌* 104: 11-16, 2000

Hagiwara Y, Yamamoto T, Kitazawa Y: The effect of mitomycin C trabeculectomy on the progression of visual field defect in normal-tension glaucoma. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 238: 232-236, 2000

## 2. 学会発表

Kawase K, Gu Z, Matsubara M, Yamamoto T, Kitazawa Y: Memantine reduces the retinal ganglion cell loss in an experimental glaucoma model in the rat. The Fourth Annual Meeting of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics 1/30/99. Irvine, USA

北澤克明、山本哲也、富田剛司、谷照斌、川上秀昭、松原正幸: 緑内障視神経障害の発生機序. 第25回日本医学会総会. 4/3/99. 東京都  
丹羽義明、山本哲也、川上秀昭、北澤克明: 正常眼圧緑内障における二酸化炭素とニルバジピンの眼窩内血流動態への影響の関連. 第103回日本眼科学会. 4/21/99. 千葉市

石田恭子、杉山和久、山本哲也、北澤克明: 正常眼圧緑内障の視野進行因子としての乳頭出血. 第103回日本眼科学会学術展示. 4/21-22/99. 千葉市

別所京子、稲積幸介、山本哲也、北澤克明: 正

常眼圧緑内障における角膜厚と眼圧の関係. 第103回日本眼科学会学術展示. 4/21-22/99. 千葉市

堀暢英、山本哲也、北澤克明: マイトマイシンC併用トラベクレクトミーの長期成績. 第103回日本眼科学会学術展示. 4/21-22/99. 千葉市

松原正幸、川瀬和秀、谷照斌、山本哲也、北澤克明: ラット網膜挫滅モデルにおける memantine 投与後の網膜神経節細胞数変化. 第103回日本眼科学会学術展示. 4/21-22/99. 千葉市

川上秀昭、望月清文、川瀬和秀、川瀬千鶴、山本哲也、北澤克明: ラット網膜挫滅モデル眼におけるERGの経時変化. 第103回日本眼科学会学術展示. 4/22-23/99. 千葉市

杉山和久、谷照斌、川瀬千鶴、山本哲也、北澤克明: ラット視神経および乳頭周囲脈絡膜の微小血管構築について. 第103回日本眼科学会学術展示. 4/22-23/99. 千葉市

Kawase K, Alward WLM, Kawase C, Fingert JH, Udo M, Stone E, Yamamoto T, Sheffield VC, Kitazawa Y: Sequence variation of GLC1A (MYOC/TIGR) gene in Japanese patients with normal-tension glaucoma and ocular hypertension. ARVO 1999 poster presentation. 5/9/99. Ft. Lauderdale, USA

Kitazawa Y, Hori N, Yamamoto T: An eight-year follow-up result of trabeculectomy with adjunctive mitomycin C. ARVO 1999 poster presentation. 5/10/99. Ft. Lauderdale, USA

Matsubara M, Gu ZB, Kawase K, Yamamoto T, Kitazawa Y: Memantine reduces secondary degeneration of the retinal ganglion cell in a high intraocular pressure model and an optic nerve crush model in the rat. ARVO 1999 poster presentation. 5/10/99. Ft. Lauderdale, USA

Niwa Y, Yamamoto T, Kawakami H, Kitazawa Y: The relationship between the effect of carbon dioxide inhalation and that of nilvadipine on orbital blood flow in normal-tension glaucoma. ARVO 1999 poster presentation. 5/11/99. Ft. Lauderdale, USA

Sugiyama K, Gu ZB, Kawase C, Yamamoto T, Kitazawa Y: Optic nerve and peripapillary choroidal microvasculature of the rat eye. ARVO

1999 poster presentation. 5/12/99. Ft. Lauderdale, USA

Ishida K, Sugiyama K, Yamamoto T, Kitazawa Y: Disc hemorrhage is a significantly negative, prognostic factor in normal-tension glaucoma. ARVO 1999 oral presentation. 5/13/99. Ft. Lauderdale, USA

川上秀明、望月清文、川瀬和秀、川瀬千鶴、山本哲也、北澤克明:ラット視神経挫滅モデル眼におけるERGおよびVEPの経時変化. 第47回日本臨床視覚電気生理学学会. 7/2/99. 新潟市  
谷照斌、山本哲也、松原正幸、川瀬和秀、澤田明、北澤克明:ラット眼圧上昇モデルにおける網膜神経節細胞数の減少とタクロリムス(FK-506)によるその抑制. 第10回日本緑内障学会. 9/3/99. 三重県磯部町

辻明、谷照斌、川瀬和秀、澤田明、山本哲也、北澤克明:ラット眼圧上昇モデルにおけるbetaxolol投与後の網膜神経節細胞数の変化. 第10回日本緑内障学会. 9/3/99. 三重県磯部町

中井義幸、川瀬和秀、谷照斌、木村正志、岡野幸雄、山本哲也、北澤克明:ラット眼圧上昇モデルにおけるBax及びBcl-2RNAの変化. 第10回日本緑内障学会学術展示. 9/3-4/99. 三重県磯部町

谷照斌、松原正幸、川瀬和秀、澤田明、山本哲也、北澤克明:ラット眼圧上昇モデルを用いたmemantineの神経保護作用の研究(和訳). 1999年中国緑内障学会. 9/10/99. 中国湖南省大庸市

Sawada A, Tsuji A, Gu Z, Yamamoto T, Kitazawa Y: Neuroprotective effects of betaxolol against RGC death induced by elevated IOP in the rat. The Second Congress of the Asian-Oceanic Glaucoma Society. Symposium 10. Neuroprotection. 10/5/99. Tokyo (symposium coauthor)

石田恭子、杉山和久、山本哲也、北澤克明:正常眼圧緑内障における視神経乳頭出血出現部位と視野進行部位の関連. 第53回日本臨床眼科学会. 10/7/99. 東京都

近藤雄司、丹羽義明、山本哲也、北澤克明:正常眼圧緑内障における眼圧・視野の左右差と眼窩血流動態. 第53回日本臨床眼科学会. 10/7/99. 東京都

#### G.知的所有権の取得状況

- 1.特許取得なし
- 2.実用新案登録無し
- 3.その他なし

厚生科学研究費補助金(感覚器障害及び免疫アレルギー等研究事業)

緑内障の発症、経過解析、治療に関する研究

分担研究者 阿部春樹 新潟大学医学部眼科学教室教授

## 研究要旨

少なくとも完成された緑内障眼では網膜神経節細胞を障害するメカニズムはさまざま、したがって多くの異なった側面からのアプローチが必要であるため、細胞生物学的観点から緑内障における視神経障害、網膜神経節細胞(=視神経細胞)死のメカニズムについて検討し、緑内障治療に対する新たなアプローチの方向を探った。その結果、1)実験緑内障眼の視神経乳頭部では、少なくとも TGF- $\beta$ 、特に $-\beta 1$ 、 $-\beta 2$  の発現が増強しており緑内障眼における篩状板の再構成、特に細胞外マトリックスの産生系の促進に関与している可能性がある。2)神経栄養因子は緑内障における視神経障害のメカニズムに密接に関係している可能性が示唆された。3)実験緑内障眼においてミトコンドリアの変化、及び Caspase-3 の活性化を認めた。4)NMDA 型グルタミン酸受容体の  $\epsilon 1$ 、 $\epsilon 2$  サブユニットが虚血・灌流モデルにおける網膜神経節細胞死に直接的な役割を担っている可能性がある。という結果が得られた。

## A. 研究目的

緑内障におけるし神経節細胞死にはアポトーシスが関連すること、グルタミン酸が関連することなどが示唆されている。更に高眼圧により視神経乳頭の支持組織の細胞外基質、結合織に種々の変化が発現することが報告されている。最新の分子生物学の手法を用いて、そのメカニズムを以下の観点から明らかにする。

- (1) 緑内障眼の視神経乳頭部、特に篩状板部に生ずる細胞外マトリックスの変化を検討
- (2) 神経栄養因子の実験緑内障眼の視神経乳頭部における発現の変化について検討
- (3) 網膜神経節細胞におけるアポトーシスの実行機構について検討
- (4) 網膜神経節細胞死におけるグルタミン酸の関与の検討

## B. 研究方法

- (1) 緑内障眼の視神経乳頭部、特に篩状板部に生ずる細胞外マトリックスの変化に関係して、TGF(形質転換増殖因子)- $\beta$ 、PDGF(血小板由来増殖因子)について調べた。カニクイサル 3 匹 3 眼、ニホンザル 2 匹 2 眼を用い、アルゴンレーザーの隅角過剰照射で実験緑内障を作成した。3~5 ヶ月後に乳頭陥凹が形成された後に摘出眼の視神経乳頭部を TGF- $\beta 1$ 、 $-\beta 2$ 、 $-\beta 3$ 、PDGF-A、-B について凍結切片と biotin-ExtrAvidin-

Alkali Phosphatase 法で検討した。

- (2) 神経栄養因子の実験緑内障眼の視神経乳頭部における発現の変化について検討した。実験緑内障眼を作成し、免疫組織学的手法を用いて NGF、BDNF、NT-4/5、NT-3、CNTF、GDNF 及びそれらのレセプターである TrkA、TrkB、TrkC、p75、CNTFR に関して検討を行った。
- (3) 急性および慢性のラット緑内障モデルを作成し、網膜神経節細胞におけるアポトーシスの実行機構について検討した。慢性緑内障モデルの作成:墨汁を前房内に注入 1 週後に角膜輪部の色素帯にレーザー光凝固術を行った。その後緑内障性視神経乳頭陥凹を認めるようになるまで光凝固術を追加した。急性緑内障モデルの作成:1 回目の光凝固に追加して intracameral injection を行い、30mmHg 以上の眼圧を 5 日間維持した。経時的に網膜神経節細胞のアポトーシス変化を観察すると共に網膜神経線維層の Caspase-3 の免疫染色も行った。更にミトコンドリアの微細変化についても観察を加えた。
- (4) 今回我々は実験動物として野生型マウス、 $\epsilon 1$  サブユニットノックアウトマウス、 $\epsilon 2$  サブユニットノックアウトマウスのヘテロ型を用いた。各々のマウスを麻酔下で 120mmHg の眼圧負荷により虚血状態とし、経時的に

解除した。3,7,14 日後に灌流固定の後眼球を摘出し、H-E 染色、TUNEL 染色及び HPC-1(anti-amacrine cell)染色を施した。得られた切片像より網膜各層の細胞数を計測し、その変化を統計学的に評価した。

### C. 結果

- (1) 正常サル眼の視神経乳頭部には TGF- $\beta$  1、- $\beta$  2、- $\beta$  3、PDGF-A、-B のいずれもが検出され、神経線維、グリア細胞、血管細胞のいずれの細胞にも発現していた。実験緑内障では篩状板付近で主にグリア細胞の TGF- $\beta$  1、- $\beta$  2 の発現が明らかに増強していた。TGF- $\beta$  3、PDGF-A、-B については、正常眼とに明らかな差はなかった。
  - (2) NGF、BDNF、NT-4/5、CNTF、GDNF は視神経乳頭部、特に篩状板部付近を中心に発現が低下し、BDNF、NT-4/5、CNTF、さらにごく軽度 NT-3 では篩状板より後方の球後視神経部で発現が上昇していた。またレセプターでは TrkA、TrkB、p75、CNTFR では篩状板部を中心に発現が上昇し、TrkC については明らかな変化を認めなかった。
  - (3) 慢性モデルでは、主に前篩状板部に神経線維の脱落による海綿様変性を認め、同部位の透過電顕像では軸索中に著明に肥大した変性ミトコンドリアの散在を認めた。一部の外膜は破綻し、クリステの構造は消失し、結晶様構造を呈する Inclusion body を内包していた。急性モデルにおいても同様のミトコンドリアの変化が観察され、網膜の神経線維層では、眼圧上昇の 24 時間後にはすでに Caspase-3 の活性化がみられた。また、TUNEL 陽性の網膜神経節細胞は、眼圧上昇の 3 日後から多数確認された。
- 野生型マウスでは14日後にはおよそ全ての網膜神経節細胞が消失、TUNEL陽性細胞を認め内顆粒層の細胞数も有意に減少していた。 $\epsilon$  1 サブユニットノックアウトマウスでは網膜変化を認めなかった。 $\epsilon$  2 サブユニットノックアウトマウスのヘテロ型では、虚血負荷による網膜神経節細胞死に抵抗性を示した。しかしその程度は  $\epsilon$  1 サブユニットノックアウトマウスで認められる抵抗性よりかなり低いものであった。

### D. 考察

- (1) 本研究の結果を見る限り、TGF- $\beta$  の増加、PDGF の不変もしくは低下という所見は、緑内障に見られる篩状板への細胞外マトリックスの産生・蓄積、前篩状板部におけるグリオシス等の点とよく一致している。これらの増殖因子は二面性(bifunctionality)など複雑な機能発現を示し、またそれぞれの増殖因子が互いに影響を及ぼしながら複雑に調節されている。したがって、短絡的な結論は避けるべきであるが、少なくとも緑内障に特徴的な乳頭陥凹の形成に、これらの増殖因子の動態が重要な要素として関わっている可能性が高いと考えるべきである。これらの増殖因子の視神経乳頭部での産生細胞としては、グリア細胞、特に前篩状板部、及び篩状板のアストロサイトが重要と推測されるが、これら細胞の動態は視神経乳頭陥凹の形成、更には緑内障性視神経障害の進行の鍵を握っている可能性が高い。
- (2) 緑内障性網膜神経節細胞死の起こる機序として、軸索流のうっ滞に伴い細胞体へ Trophic factor の供給が滞るといわれる枯渇説が挙げられている。本研究の結果から緑内障の篩状板前後でこれら栄養因子群の発現に変化があったこと、篩状板部でのレセプターの発現に変化があったことはこれら神経栄養因子群の動態が緑内障性網膜神経節細胞死に関与していることを示唆している。
- (3) 軸索流のうっ滞から神経節細胞死が生じるまでのメカニズムとして、うっ滞した軸索中のミトコンドリアの外膜破綻に伴って、放出された物質(恐らくシトクローム C)が Caspase-3 を活性化して網膜神経節細胞のアポトーシスを実行するという仮説を裏付けるものと考えられた。
- (4) 様々な病態で引き起こされる網膜神経節細胞死の原因として興奮性アミノ酸であるグルタミン酸と、高いカルシウム透過性を持つ NMDA 型グルタミン酸受容体の関与が指摘されている。網膜神経節細胞及び内顆粒層に局在する NMDA 型受容体は  $\epsilon$  (イプシロ

ン)1、 $\varepsilon$ 2、 $\zeta$ (ツェータ)1 サブユニットから構成されている。 $\varepsilon$ 1、 $\varepsilon$ 2 サブユニットが虚血・灌流モデルにおける網膜神経節細胞死に直接的な役割を担っている可能性がある。

#### E. 結論

- (1) 実験緑内障の視神経乳頭部では、少なくとも TGF- $\beta$ 、特に- $\beta$ 1、- $\beta$ 2 の発現が増強しており緑内障における篩状板の再構成、特に細胞外マトリックスの産生系の促進に関与している可能性がある。
- (2) 神経栄養因子は緑内障における視神経障害のメカニズムに密接に関係している可能性が示唆された。
- (3) 実験緑内障においてミトコンドリアの変化、及び Caspase-3 の活性化を認めた。
- (4) NMDA 型グルタミン酸受容体の  $\varepsilon$ 1、 $\varepsilon$ 2 サブユニットが虚血・灌流モデルにおける網膜神経節細胞死に直接的な役割を担っている可能性がある。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

サル実験緑内障の視神経乳頭部における形質転換増殖因子  $\mu\beta$ 、血小板由来増殖因子の変化 福地健郎、上田 潤、羽入貴子、阿部春樹、沢口昭一 日本眼科学会雑誌 103(3): 193-200、平成11年

##### 2. 学会発表

•Fukuchi T, Ueda J, Hanyuu T, Yamamoto S, Yaoeda K, Hashimoto K, Sawaguchi S, Yue B, Abe H. Distribution and expression of TGF- $\beta$ , PDGF and their receptors in the normal and glaucomatous monkey optic nerve heads. 1999, ARVO Annual Meeting, Fort Lauderdale, USA.

•Ueda J, Fukuchi T, Hanyu T, Abe H, Sawaguchi S. Involvement of mitochondrial disruption in apoptosis of rat glaucoma model. 1999, ARVO Annual Meeting, Fort Lauderdale, USA.

#### G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得なし
2. 実用新案登録無し
3. その他なし

