

## 厚生科学研究費補助金研究報告書

平成 14 年 4 月 10 日

厚生労働大臣 坂口 力 殿

住 所 〒  
 フリガナ アベ ハキ  
 研究者 氏 名 阿部 春樹  
 (所属機関) 新潟大学大学院医歯学総合研究科  
 生体機能調節医学専攻  
 感覚統合医学講座  
 視覚病態学分野

平成 13 年度厚生科学研究費補助金 ( 感覚器障害 研究事業) に係る研究事業を完了したので次のとおり報告する。

研究課題名 (課題番号) : 神経科学的アプローチによる緑内障の病態解明と治療の開発に関する研究 (H12-感覚器-004)

国庫補助金精算所要額 : 金 35,000,000 円也

1. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要版及びこれを入力したフロッピーディスク (別添1のとおり)
2. 厚生科学研究費補助金研究報告書表紙 (別添2のとおり)
3. 厚生科学研究費補助金研究報告書目次 (別添3のとおり)
4. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書 (別添4のとおり)
5. 厚生科学研究費補助金分担研究報告書 (別添5のとおり)
6. 研究成果の刊行に関する一覧表 (別添6のとおり)
7. 研究成果による特許権等の知的財産権の出願・登録状況 (総括研究報告書、分担研究報告書の中に、書式に従って記入すること。)
8. 健康危険情報
  - ・研究の結果、得られた成果の中で健康危険情報 (国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす情報として厚生労働省に報告すべきものがある場合や、研究過程において健康危険情報を把握した場合には、国民の生命、健康に重大な影響を及ぼすと考えられる内容と理由を簡潔に記入するとともに、その情報源 (研究成果、研究者名、学会発表名、雑誌等の詳細) について記述すること。
  - ・既に厚生労働省に通報した健康危険情報であっても、本研究報告書の提出の時点において健康危険情報に該当すると判断されるものについては記述すること。
  - ・分担研究者、研究協力者の把握した情報・意見等についても主任研究者がとりまとめ、一括して総括研究報告書に記入すること。
  - ・なお、交付基準額等決定通知の添付文書において、健康危険情報を把握した際には、一定の書式で速やかに厚生労働省健康危機管理官まで通報していただくよう協力をお願いしているため、本件とともに留意すること。

---

別添 1

厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要版

---

別添 2

厚生科学研究費補助金研究報告書表紙

---

別添 3

厚生科学研究費補助金研究報告書目次

---

別添 4

厚生科学研究費補助金総括研究報告書

---

別添 5

厚生科学研究費補助金分担研究報告書

---

別添 6

研究成果の刊行に関する一覧表

研究費の名称=厚生科学研究費補助金

研究事業名=感覚器障害研究事業

研究課題名=神経学的アプローチによる緑内障の病態解明と治療法の開発に関する研究（総括研究報告書）

国庫補助金精算所要額（円）=35,000,000

研究期間（西暦）=2000-2002

研究年度（西暦）=2001

主任研究者名（所属機関名）=阿部春樹（新潟大学大学院医歯学総合研究科）

分担研究者名（所属機関名）=新家 眞（東京大学大学院医学系研究科）、三嶋 弘（広島大学医学部）

研究目的=

緑内障は本邦における2大失明原因の一つで、病態解明及びその有効な治療法の開発は国民医療上の急務と考える。本研究は下記の4つを柱として進行している。

① 神経保護 ② 薬物治療 ③ 神経再生 ④ 疫学

研究方法=

①神経保護

A.網膜神経節細胞死におけるグルタミン酸受容体の関与(阿部)

NMDA型受容体サブユニットノックアウトマウスの網膜神経節細胞死の解析

B.網膜神経節細胞死における神経栄養因子群の動態(阿部)

網膜内神経栄養因子の定量的解析

C.網膜神経節細胞障害モデルを用いた新薬開発(新家)

網膜障害モデルを用いた水溶性カルシウムブロッカーとカルシウム・ナトリウムチャンネルブロッカーの神経保護効果及びミュラー細胞の神経節細胞死への関与の検討

D.網膜神経節細胞死におけるグルタミンの発現及び機能(三嶋)

単離網膜神経節細胞培養系を用いたグルタミン酸受容体の電気生理学的解析

E.網膜神経節細胞死における一酸化窒素合成酵素（NOS）及び一酸化窒素（NO）の動態(三嶋)

単離網膜神経節細胞培養系のNOS発現(免疫染色)及びNO産生の解析（NO蛍光指示薬を使用）

②薬物療法

ラタノプロストの長期使用成績及びブナゾシン併用効果の検討（三嶋）

③神経再生

A.眼球発育に関わる新規遺伝子のクローニング(三嶋)

新規遺伝子の発現パターンの解析及び発現部位の変化解析

B.イモリ再生肢の遺伝子発現解析(三嶋)

イモリ再生肢における新規細胞外マトリックス分解酵素遺伝子のクローニング

④疫学

緑内障の早期発見を目的とした眼科住民検診システムの確立(三嶋)

広島県三次市において従来の眼科検診（視力、眼圧、眼底カメラ検査）に加え、簡便な視野検査を導入し、精密検査が必要と判断された受診者に二次検診を勧告し、一次と二次検診の検査結果の関係の分析により、より効率的な健診のあり方について検討する。

結果と考察=

①

A.NMDA型受容体ε1サブユニットノックアウトマウスで網膜神経節細胞死が減少を認めた。また、慢性緑内障モデルを作製し、自作水銀眼圧計で眼圧を正確に測定できることを確認した。

B.高眼圧負荷により網膜においてBDNFが大きく変化していることを定量した。

C.イガジピンはカイニン酸による網膜神経障害に対し神経保護効果を認めたが、Pyridoxal hydrochlorideは神経保護効果を認めなかった。また、低酸素ストレス及び高圧ストレスにおいて、培養ミュラー細胞では神経栄養因子発現の抑制が認められた。

D.単離培養神経節細胞において神経ステロイドのひとつであるエクソダインはNMDA誘発電流を濃度依存性に抑制した。

E.単離培養網膜神経節細胞において、nNOS, eNOSの局在が認められた。また、NOSの阻害剤によりNO合成は有意に抑制され、このとき合成されるNOはnNOSによって合成されることが証明された。

②

ラタノプロストは全ての経過においてウノプロストンより有意な眼圧下降効果を認めた。

また、ブナゾシンの併用で眼圧は有意に下降した。

③

A. 眼球発育期の新規遺伝子は網膜特異的な発現が示唆され、生後10日頃には抑制されていた。また、この新規遺伝子の全塩基配列をGENEBANKで公開した。

B. イモリマトリックス分解酵素遺伝子は再生肢の先端部分にできる傷上皮の基底部分で発現が認められた。

④

眼底検査により緑内障を指摘された者の内、視野異常を認めたものは90%であった。また、高眼圧を指摘された者のうち、視野異常を認めたものは7%であった。

結論=

①

A. NMDA型受容体 $\epsilon 1$ サブユニットが神経節細胞死に関与していることが示された。慢性緑内障モデルにおいても同様の結果が得られれば、選択的サブユニット阻害剤の開発により神経保護効果を期待できる。

B. 高眼圧負荷により網膜においてBDNFが大きく変化していることから、神経栄養因子群の発現増強を介した新たな治療薬開発にも発展させることが可能である。

C. ガンジビンは網膜神経障害に対し神経保護効果を認め、今後臨床使用に向け開発が期待される。また、低酸素ストレス及び高圧ストレスはミュラー細胞の神経栄養因子発現を抑制することが明らかとなった。

D. エクソダインはグルタミン酸受容体を抑制的に調節する作用があるため、神経保護作用を持つ可能性がある。

E. 緑内障におけるグルタミン酸細胞毒性には神経節細胞内でグルタミン酸-NO経路が関与していることが示唆された。

② ラタノプロストはウノプロストンより眼圧下降効果は優れている。また、ブナゾシンの追加は眼圧下降に有用である。

③

A. 新規遺伝子は網膜のみならず眼球全体の発育、分化に関与している可能性が示唆された。ヒト未分化な細胞への導入による分化様式を見ることで眼球奇形などの先天性遺伝性疾患の解明につながると考えられる。

B. *in situ hybridization*でもシグナルが確認され、肢の再生にこの新規細胞外マトリックス分解酵素が関与していることが考えられる。今後はこの遺伝子を用いて、タンパク質を発現させ酵素活性の確認を行おうと考えている。

④ 視野検査は緑内障の発見に有用であったが、眼圧検査のみで緑内障を発見するのは困難であった。

厚生科学研究研究費補助金

感覚器障害研究事業

神経科学的アプローチによる緑内障の病態解明と治療法の開発に関する研究

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 阿部 春樹

平成14（2002）年 4月

## 研究報告書目次レイアウト

## 目 次

|   |       |    |
|---|-------|----|
| I. 総括研究報告                                 |       |    |
| 神経科学的アプローチによる緑内障の病態解明と<br>治療法の開発に関する研究    | ----- | 1  |
| 阿部 春樹                                     |       |    |
| II. 分担研究報告                                |       |    |
| 1. 神経科学的アプローチによる緑内障の病態解明と<br>治療法の開発に関する研究 | ----- | 15 |
| 新家 眞                                      |       |    |
| 2. 神経科学的アプローチによる緑内障の病態解明と<br>治療法の開発に関する研究 | ----- | 18 |
| 三嶋 弘                                      |       |    |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表                       | ----- | 23 |
| IV. 研究成果の刊行物・別刷                           | ----- | 25 |

厚生科学研究費補助金（感覚器障害事業）  
総括研究報告書

神経科学的アプローチによる緑内障の病態解明と治療法の開発に関する研究

主任研究者 阿部 春樹 新潟大学大学院医歯学総合研究科 教授

**研究要旨** 昨年に続き本邦における2大失明原因の一つである緑内障に関して、その病態解明と有効な治療法の開発を目的として、臨床及び基礎研究の両面から多施設で共同研究を行った。基礎研究では、網膜神経節細胞死の発症メカニズムの一つとしてグルタミン酸受容体の1サブタイプが関与していることが示唆された。また、眼圧上昇モデルで神経栄養因子が大きく変化していることが確認された。また、網膜障害モデルにおいて、ナトリウムチャンネルブロッカーが神経保護作用が認められ、神経栄養因子の発現にミュラー細胞が関与していることが示唆された。さらに、緑内障におけるグルタミン酸細胞毒性には、網膜神経節細胞内でのグルタミン酸-NO経路が関与していることが示唆され、神経ステロイドの一種はグルタミン酸受容体を抑制的に調節する作用があるといった新たな知見を得られた。臨床研究では、眼科検診を行い、緑内障発見に視野検査が有用であることが確認し、プロスタグランジンF2 $\alpha$ の眼圧下降効果と他剤併用効果を検討した。

分担研究者 新家 眞  
東京大学大学院  
医学系研究科  
教授

三嶋 弘  
広島大学医学部  
教授

**A. 研究目的**

(主任研究者：阿部 春樹)

緑内障は、本邦における2大失明原因の一つで、病態解明及びその有効な治療法の開発は国民医療上の急務と考える。

主任研究者は主に神経保護という点から下記のような目的で研究を進める。

①緑内障における視神経障害の発症・進展における網膜神経節細胞死のメカニズムの一端をグルタミン酸・神経栄養因子群などの動態解析を通じて分子生物学的レベルで明らかにする。

②網膜神経節細胞死のメカニズムに関して得られた知見を緑内障治療の開発に応用する。本研究は眼圧コントロールを主としたこれまでの治療法に加え、網膜神経節細胞を保護するという治療法の可能性を与えてくれる。グルタミン酸受容体拮抗薬、神経栄養因子群などの眼内投与の緑内障性視神経障害に対する治療効果及びその投与方法を検討する。

(分担研究者：新家 眞)

緑内障では網膜神経節細胞が障害される。したがって、網膜神経細胞に対する保護作用を持つ薬剤の開発は新たな緑内障治療につながる可能性が大きい。本研究ではラットを用いてin vivoの網膜神経節細胞障害モデルを複数種類確立し、そのモデルにより点眼薬としての開発可能性を持つ水溶性カルシウムブロッカーであるイガニジピンの神経保護効果、Pyridoxal hydrochlorideの神経保護効果を検討し、さらにMuller細胞の網膜神経節細胞死への関与についても検討する。

(分担研究者：三嶋 弘)

神経保護

1) 網膜神経細胞の細胞死ならびに保護作用

・緑内障の視神経障害の進行にグルタミン酸誘発神経細胞死が関わっている。そこでまずグルタミン酸神経毒性モデルを作成して、その神経毒性を抑制すると思われる薬物を投与して抑制効果があるかを調べ、その結果、抑制効果があればその抑制メカニズムを解明する。

2) 網膜神経細胞の細胞死に関する研究  
(グルタミン酸刺激による網膜神経での一酸化窒素合成)

・これまでの研究により、緑内障における網膜神経節細胞の細胞死の過程にはグルタミン酸等の興奮性アミノ酸によるNMDA受容体の刺激と、それに続く細胞内へ

のCa<sup>2+</sup>の流入が関与していることがわかってきた。一方、Ca<sup>2+</sup>の流入に伴い細胞内では一酸化窒素(NO)合成酵素(NOS)の活性化によりNO合成がおこると考えられ、このNOがグルタミン酸による細胞毒性の経路に関与していると思われる。しかし現状では網膜神経節細胞においてはNO合成の証拠は示されていない。しかし一方で他の領域の神経節細胞にはNOSが存在しているとされ、網膜の神経節細胞にもその存在の可能性が示唆される。今回、網膜神経節細胞がNO合成酵素(NOS)を発現し、実際にNOを合成しうるか否かを検討した。

#### 薬物療法

プロスタグランジン関連薬ラタノプロストの長期使用成績・Evidence-based Medicine (EBM)を考慮した緑内障の薬物療法を行なうために、緑内障治療薬の眼圧下降効果ならびに効果的な薬物併用治療の組み合わせを検討する。今回は、特に緑内障治療薬に中でも、房水の流出促進の働きを持つ点眼薬に焦点をあてて検討する。

#### 神経再生

1) 網膜の分化に関与する遺伝子・網膜の発育、分化に関与する新規遺伝子をクローニングすることを第一の目的とする。さらにこの研究において、生下直後の全眼球のmRNAでのDNAアレイを用いることにより眼球発育期の数千個の遺伝子の発現パターンを捕らえ、網膜のみならず眼内のあらゆる組織でのさまざまな遺伝子発現様式を解明する事も同時に可能と考えられる。それらの遺伝子の機能解析により眼球構成のコントロール遺伝子を解明することも目的とする。

2) イモリ細胞外マトリックス分解酵素遺伝子のクローニング

・イモリは成体になっても旺盛な再生能力をもつ脊椎動物である。再生するには細胞を取り巻く環境物質である細胞外マトリックスが変化し細胞の分化、移動などに関与していると考えられている。細胞外マトリックスは細胞外マトリックス分解酵素により分解されるがイモリでは今までに4種類が確認されている。今回、再生現象に関わっている細胞外マトリックス分解酵素に関する研究を行った。

(倫理面への配慮)

実験動物は動物取り扱い規約(眼と視覚に関する研究協会による規約)に従って扱った。

#### 疫学

広島県三次市における眼科検診・緑内障

は初期は自覚症状がないため、早期発見ならびに早期治療が重要である。そこで、緑内障の早期発見のために有効な眼科検診プログラムの開発を目的として、広島県三次市をモデルとして眼科検診を行う。

#### B. 研究方法

(主任研究者:阿部 春樹)

##### 1) 神経保護とグルタミン酸受容体

(1) 網膜神経節細胞に局在しているNMDA受容体のうち、 $\epsilon 1$ 、及び $\epsilon 2$ サブユニットをそれぞれ遺伝子的にノックアウトしたマウスに対して虚血・再灌流モデルを作製した。全身麻酔を施したマウスを固定し、その片眼に約120mmHgの高眼圧を一時間負荷した。この処置により、網膜は虚血状態に陥る。その後虚血負荷を解除し、3日、7日、14日後にマウスより眼球を摘出し、網膜切片を作製した。各層の網膜細胞数を測定し、その変化を統計学的に評価した。

(2)  $\epsilon 2$ サブユニットは、コンベンショナルな方法でのノックアウトを用いると、生後まもなく死亡してしまう。そこで、cre-lox系を用いた新しい遺伝子操作法で解析している。 $\epsilon 2$ が存在する遺伝子領域をlox配列で挟み込んだキメラマウスの眼球内に、cre発現遺伝子を持つアデノウイルスを注入している。この方法により、成体マウスの眼球特異的に $\epsilon 2$ サブユニットをノックアウトしたモデルを作製することができる。今後このマウスについて解析を行う予定。

(3) より臨床的な慢性眼圧上昇モデルを作製し、その評価を行った。房水流出経路の一つである上強膜静脈をナイロン糸にて結紮することで慢性眼圧上昇モデルを作製した。眼圧上昇処置後、1ヶ月、3ヶ月後にマウス眼球を摘出し、網膜切片および視神経切断切片を作製した。網膜各層の細胞数や視神経髄鞘数を測定し、その変化を統計学的に評価した。

(4) マウス眼圧測定法の確立。慢性緑内障モデルマウスを作製しても、その眼圧を正確に測定することができなければ意味がない。しかし、従来の眼圧測定機器は人間を対象としているため、角膜径が約4mmのマウスに流用することは不可能である。そこで、内径0.04mmのガラス管を用いて水銀圧力計を作製した。

##### 2) 神経保護と神経栄養因子

目的: 緑内障における神経栄養因子群の動態解析

方法: 当教室Ueda et al.(1998)の方法に準じ、ラット片眼に慢性眼圧上昇モデルを作成し、その網膜における脳由来神経



栄養因子(BDNF)タンパク発現を定量的に解析する。タンパクの定量にはサンドイッチ式酵素免疫測定法を用いた。

(分担研究者: 新家 眞)

水溶性カルシウムブロッカーであるイガニジピンの神経保護効果についてDiI(1, 1'-dioctadecyl-3, 3, 3', 3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate)を上丘に投与して逆行性輸送による網膜神経節細胞染色を行った後に網膜伸展標本作製することで、網膜神経細胞数をカウントして、実際に網膜神経細胞がどの程度生存しているかを評価した。

Pyridoxal hydrochlorideの神経保護効果についてはNMDAおよびカイニン酸投与により網膜傷害モデルを作成し、それに対する効果を検討した。

Muller細胞の網膜神経細胞死への関与に関しては、ラットMuller細胞を培養し、低酸素下および高圧下で培養して、その神経栄養因子の発現変化について検討した。神経栄養因子は、BDNF, CNTF, GDNFについて検討した。神経栄養因子の発現については、G3PDHに対する割合をコントロールと比較した。

(分担研究者: 三嶋 弘)

磁気細胞分離システムで分離後に培養した網膜神経節細胞に対してパッチクランプ法で電気生理学的に研究し、グルタミン酸受容体サブタイプの発現を確認し、神経ステロイドなどを作用させてグルタミン酸誘発電流を抑制するかどうか研究する。

(倫理面への配慮)

実験動物は動物取り扱い規約(眼と視覚に関する研究協会による規約)に従って扱った。

幼若期ウィスターラットの網膜から単離培養した網膜神経節細胞を対象とした。NOSタンパクに対する抗体を用いた免疫組織化学的手法により、その発現についてレーザー共焦点顕微鏡により観察を行った。さらに、新規NO蛍光指示薬であるdiaminofluorescein-2 diacetate (DAF-2 DA)を用いて培養網膜神経節細胞におけるNO産生を経時的に観察した。

(倫理面への配慮)

実験動物は動物取り扱い規約(眼と視覚に関する研究協会による規約)に従って扱った。

1) 房水流出を促進する点眼薬の代表としてプロスタグランジン関連薬あり、現在ラタノプロストとイソプロピルウノ

ロストン(ウノプロストン)の2種類が使用可能である。この2種類の点眼薬の単独療法における眼圧下降効果を8週間にわたって比較した。

2) 交感神経 $\alpha$ 受容体遮断作用を持つ緑内障治療薬であるブナゾシンにも房水流出を促進する作用があることが知られている。そこで、房水流出促進作用を持つプロスタグランジン関連薬のラタノプロスト点眼にブナゾシン点眼を追加した場合の眼圧下降に対する併用効果を8週間にわたって検討した。

(倫理面への配慮)

患者に対しては予想される効果ならびに副作用について十分な説明をして同意を得た後に薬剤の投与を行った。

出生後さまざまな時期におけるこの新規遺伝子の発現パターンをRT-PCRで調べた。また出生後の、眼内での発現部位の変化をin situ hybridizationで解析した。さらに臓器別のこの遺伝子の発現様式をnorthern hybridizationで決定した。以上の結果をもとに眼球の発育に関わる新規遺伝子としてこの新規遺伝子の全塩基配列をGENBANKで公開した。

(倫理面への配慮)

実験動物は動物取り扱い規約(眼と視覚に関する研究協会による規約)に従って扱った。

in situ hybridizationにより新規細胞外マトリックス分解酵素遺伝子の再生肢における発現をみた。

平成13年10月30日から11月1日の3日間に、広島県三次市において、331人を対象として、眼科検診を行った。従来の視力、眼圧、眼底カメラの検査に加えて、今回は新しい試みとして簡便な視野検査を導入して検査を行った。一次検診の後、精密検査が必要と判断された人に対して、二次検診として眼科医院受診を勧めた。

(倫理面への配慮)

個人情報保護に留意し、検査結果の情報が外部に洩れないように配慮した。

## C. 研究結果

(主任研究者: 阿部 春樹)

1) 神経保護とグルタミン酸受容体

(1) 野生型マウスは経時的に各層の細胞が減少した。これに対し、 $\epsilon 1$ サブユニットの発現がないマウスでは、経過期間中に神経節細胞の減少はほとんど認められなかった。 $\epsilon 2$ サブユニットを完全にノックアウトすると生後24時間以内に死亡してしまう。このため、本研究では

発現量が半分残るヘテロタイプのマウスを用いた。このマウスでは、負荷解除7日までは比較的神経節細胞が保持されていたが、14日後では野生型と同様にほとんどの神経節細胞が消滅した。

(2) Cre発現ウイルス注入眼でNMDA $\epsilon$ 2サブユニット発現が起こらないことを確認した。

(3) モデルマウスを作製しその眼圧を自作微小水銀眼圧計にて測定したところ最長6ヶ月までの持続的で有意な眼圧上昇が得られた。またモデルマウスは網膜において経時的に各層の細胞数が減少していた。視神経においてもモデルマウスは脱髄神経が増加していると考えられた

(4) 作製した水銀圧力計を用いてマウスの眼圧を正確に測定することができることを確認した。

#### 2) 神経保護と神経栄養因子

眼圧>22mmHgを1週、2週、4週及び12週にわたり負荷したラット実験眼及び傍眼網膜を摘出、蛋白を抽出しBDNF含量を定量的に測定した。その結果、実験眼の対照眼に対するBDNF含量は高眼圧負荷後1週後においては277%、2週後では102%、4週後では59%そして12週後では24%と大きく変動していた。

(分担研究者：新家 眞)

Dilの逆攻性輸送による網膜神経細胞数の直接カウント法によりイガニジピン1.2 $\mu$ M投与はカイニン酸による網膜神経細胞障害に対して有意に神経保護効果を持つことが示された。

Pyridoxal hydrochlorideの実験では、NMDA投与モデル、カイニン酸投与モデルいずれにおいても有意な神経保護効果は認められず、少なくとも本実験に用いた投与方法・用量では神経保護効果を得ることは難しいという結果が得られた。

培養Muller細胞による実験ではBDNF、CNTF、GDNFのmRNA発現はそれぞれの負荷をかけると低下し、負荷を除くことによりコントロールと同等の状態に戻った、すなわち低酸素ストレス及び高圧ストレスはMuller細胞の神経栄養因子発現を抑制することが明らかとなった。

(分担研究者：三嶋 弘)

磁気細胞分離システムで分離後に培養した網膜神経節細胞には、他の中枢神経細胞と類似した特性を有するグルタミン酸受容体サブタイプ：NMDA受容体、AMPA受容体、カイニン酸受容体が認められた。神経ステロイドのひとつであるエクダイソンはNMDA誘発電流を濃度依存性に

抑制した。他のAMPA、カイニン酸誘発電流においても、わずかではあるが抑制した。

1) 網膜神経節細胞でNOSに対する免疫反応が認められた。網膜神経節細胞にNOSがあることが確認された。さらにNOSの3つのisoformのうち、nNOSおよびeNOSが局在していることがわかった。

2) DAF-2DAは通常、無蛍光の状態だが、細胞内に取り込まれNOと結合すると、強い蛍光を発するDAF-2Tとなる。この蛍光をレーザー顕微鏡で検知し蛍光量を測定することにより、グルタミン酸刺激による培養網膜神経節細胞での細胞内NO合成を直接観察することが出来る。NOSの阻害剤によってNO合成は有意に抑制された。さらにこのとき合成されるNOはnNOSによって合成されることがわかった。

1) 48人の緑内障患者を無作為にラタノプロスト点眼とウノプロスト点眼の2群に振り分け、それぞれの点眼薬の眼圧下降効果を検討したところ、点眼開始後2、4、8週目のいずれの時点でも、ラタノプロストの眼圧下降効果がウノプロストの眼圧下降効果よりも有意に優れていた。

2) ラタノプロスト点眼を行っている12人の緑内障患者に対してブナゾシン点眼を追加したところ、追加後2、4、8週のいずれの時点でも、ブナゾシン点眼を追加することによって眼圧はさらに有意に下降した。

昨年度にクローニング済みの眼球発育期高い発現を認める新規遺伝子はin situ hybridizationからは網膜特異的な発現が示唆された。またこの遺伝子は生後10日頃には抑制されていたことがRT-PCRより解析された。またnorthern hybridizationの結果より、この遺伝子の発現は様々な臓器で確認された。今回得られた新規遺伝子はその発現様式より、眼球の発育に関わる可能性のある新規遺伝子として全塩基配列をGENBANKで公開した。

切断後7日目の再生肢を用いてin situ hybridizationを行ったところ、再生肢の先端部分に出来る再生芽の傷上皮の基底部分で弱いシグナルが確認された。in situ hybridizationによりイモリマトリック分解酵素遺伝子は再生肢の先端部分に出来る傷上皮の基底部分で発現していることが明らかとなった。

眼底撮影による視神経乳頭検査で異常を指摘されたのは、緑内障6名(10眼)、視神経陥凹拡大50名(87眼)、視神経萎縮11名(16眼)、傾斜乳頭2名(4眼)であり、そのうち視野異常を認めたものは、それぞれ緑内障6名(9眼)(90%)、視神経陥凹拡大6名(7眼)(8%)、視神経萎縮4名(4眼)(25%)、傾斜乳頭0名であった。

一方、眼圧検査で、眼圧22 mmHg以上の高眼圧を指摘されたのは13名(15眼)であったが、そのうち視野異常を認めたものは、1名(1眼)(7%)のみであった。

#### D. 考察

(主任研究者:阿部 春樹)

##### 1) 神経保護とグルタミン酸受容体

緑内障病態によって生じる網膜神経細胞死の原因の一つに、興奮性アミノ酸であるグルタミン酸の興奮毒性の関与が考えられている。これに対し、これまでグルタミン酸の硝子体内投与や、グルタミン酸に対する阻害剤の投与などによる間接的な研究がなされてきている。しかし、グルタミン酸に対する受容体についての直接的な研究の報告がなく、その詳細な解析は神経細胞死のメカニズムの解明に不可欠であると考えられる。本研究は、グルタミン酸受容体であるNMDA受容体のサブユニットをノックアウトしたマウスを用いて一過性虚血・再灌流モデルを作製してその網膜変化を組織学的に解析し、受容体が網膜神経細胞死にどのように関与しているかを分子レベルで明らかにすることである。まず網膜上に存在しているとされる $\epsilon 1$ 及び $\epsilon 2$ サブユニットをノックアウトしたマウスを用いて、その関与を証明した。この結果をふまえて、より臨床的な緑内障モデルでの解析のために、慢性眼圧上昇モデルマウスを作製した。今後ノックアウトマウスを用いて同様の解析を行う。現在用いている眼圧測定法はマウス前房内に針を挿入して測定するために、同一眼での測定は一回のみである。そこで、同一個体の眼圧を連続して測定するために、ゴールドマン眼圧計を改良してマウス眼圧を測定できるように試みている。また増幅器、アンプ、トランスデューサーを用いた眼圧計を考案中である。

##### 2) 神経保護と神経栄養因子

緑内障眼においては網膜神経節細胞死が起こっているとされる。種々のモデル動物の網膜神経節細胞死に対し、神経栄養因子群の投与が抑制的に働くことは以前より報告されてきた。しかし、内在性の神経栄養因子群の動態に関しては、その定量性の難し

さから正常個体を含めほとんど報告が無かった。本研究によって眼圧上昇ラット眼網膜でBDNFが大きく挙動していることが明らかにされた。これは内在性の神経栄養因子群の発現調節などを介して神経保護を行うなどの治療戦略にも応用が可能である。

(分担研究者:新家 眞)

緑内障においては網膜神経節細胞が障害されるが、その障害機序として神経細胞に対する直接障害および視神経乳頭における軸索障害の結果として起こる2次的障害が考えられている。さらに直接障害としては、高眼圧によるもの、低酸素によるもの、グルタミン酸興奮毒性によるもの等が考えられており、また視神経乳頭における軸索障害の結果として起こる2次的障害としては神経栄養因子の欠乏や軸索流の障害によって惹起される神経細胞のアポトーシスが考えられている。今回、我々はNMDA硝子体内注入モデルおよびカイニン酸硝子体内注入モデルというグルタミン酸興奮毒性による網膜神経障害モデルにより点眼薬として開発できる可能性を持つ水溶性カルシウムブロッカーのイガニジピンおよびビタミンB6の一つであるPylidoxal hydrochlorideに関して、その神経保護効果を検討した。その結果、イガニジピンがカイニン酸による網膜神経障害に対して神経保護効果を持つことが確認された一方、Pylidoxal hydrochlorideは本モデルに対しては有効な神経保護効果を示さなかった。したがって、これらの結果よりイガニジピンは今後臨床使用に向けての開発が期待されるが、Pylidoxal hydrochlorideは、少なくとも現時点ではあまり有効ではないであろうという結果となった。また、培養ラットMuller細胞を用いた実験では低酸素ストレス及び高圧ストレスがMuller細胞の神経栄養因子発現を抑制することが明らかとなった。従って、網膜神経細胞障害においてはMuller細胞を介した間接的影響も考慮する必要があると考えられた。

(分担研究者:三嶋 弘)

エクダイソンはグルタミン酸受容体を抑制的に調節する作用があるため、緑内障の新しい治療薬の可能性がある。

緑内障におけるグルタミン酸細胞毒性には、網膜神経節細胞内でのグルタミン酸-NO経路が関与していることが示唆された。

1) 房水流出を促進する点眼薬の代表であるプロスタグランジン関連薬について、ラタノプロストがウノプロストンよりも眼圧下降作用が強いため、眼圧下降作用に重点をおいた場合、ラタノプロスト点眼薬が第一選択となる可能性が高い。

2) 房水流出を促進する点眼薬を併用する場合、ラタノプロストにブナソシンを追加する組み合わせは眼圧下降効果の面で有用である。

今回得られた新規遺伝子は網膜特異的に機能しているとは言えないことが判明した。しかし眼内でのその発現様式より、網膜のみならず眼球全体の発育、分化に関与している可能性が強く示唆された。ヒトの未分化な細胞へこの遺伝子のcDNAを導入による分化様式をみることにより、眼球の奇形をおこすいずれかの先天性の遺伝性疾患の解明になると考えられた。

RT-PCRで確認されたようにin situ hybridizationでもシグナルが確認され、肢の再生にこの新規細胞外マトリックス分解酵素が関与していることが考えられた。

視野検査は緑内障の発見に有用であったが、眼圧検査のみで緑内障を発見するのは困難であった。このため、緑内障の発見を目的とした眼科検診には視野検査が必要であると思われた。

## E. 結論

(主任研究者:阿部 春樹)

1) 神経保護とグルタミン酸受容体  
緑内障における視神経障害の発症・進展における神経細胞死のメカニズムの一端がグルタミン酸であることは既に明らかではあるが、その分子機構を解明することは、将来的な抗緑内障薬の開発に不可欠なものである。本研究によってグルタミン酸受容体の一つであるNMDA受容体が、神経細胞死に主要な役割を果たしていることが直接的に示され、さらにその中でも $\epsilon 1$ サブユニットが重要な働きを持つことが証明された。選択的 $\epsilon 1$ サブユニット阻害剤の開発により、緑内障における網膜神経節細胞死に対する保護効果が期待される

## 2) 神経保護と神経栄養因子

網膜神経節細胞死の過程での神経栄養因子の動態を明らかにすることは、緑内障基礎研究に際して有益な手段となると考える。またモデル動物で神経栄養因子群の治療効果が報告されているが、内在性の神経栄養因子の動態を解明することは、(単に神経栄養因子群の直接投与だけではない)神経栄養因子群の発現増強を介した新たな治療薬の開発にも発展させることが可能である。

(分担研究者:新家 眞)

ラットを用いたグルタミン酸興奮毒性による網膜神経節細胞障害モデルに対して点眼薬としての開発可能性を持つ水溶性カルシウムブロッカーであるイガニジピンが有効な神経保護効果を持ち、今後の臨床応用の可能性が示された。またPyridoxal hydrochlorideの神経保護効果は本モデルにおいては認められなかった。また低酸素ストレス及び高圧ストレスはMuller細胞の神経栄養因子発現を抑制することが明らかとなった。

(分担研究者:三嶋 弘)

エクダインは神経保護作用をもつ可能性がある。

緑内障におけるグルタミン酸細胞毒性には、網膜神経節細胞内でのグルタミン酸-NO経路が関与していることが示唆された。

- 1) ラタノプロストの眼圧下降効果はウノプロストンの眼圧下降効果より優れている。
- 2) ラタノプロスト点眼にブナソシン点眼を追加すと眼圧がさらに下降する。

網膜を分化誘導する遺伝子の解明には、一昨年度のDNAアレイから得られた生下直後に高い発現のある他の候補遺伝子の断端をさらにクローニングしていく必要がある。さらにこれらを迅速にGENBANKで公開し、世界中で機能解析を進めていくことが重要と考えられる。

in situ hybridizationによりシグナルが確認され、肢の再生にこの新規細胞外マトリックス分解酵素が関与していると考えられた。今後はこの遺伝子を用いてタンパク質を発現させ酵素活性の確認を行おうと考えている。

視野検査は緑内障の発見に有用であったが、眼圧検査のみで緑内障を発見するのは困難であった。

F. 健康危険情報  
特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(主任研究者:阿部春樹)

・阿部春樹、白柏基宏. 網膜神経線維層正常眼圧緑内障 31-36, 2001

・阿部春樹、白柏基宏. 緑内障の早期診断と治療. 日本醫事新報 4045:19-24, 2001

・八百枝潔、白柏基宏、船木繁雄、中枝智子、船木治子、阿部春樹 新しいパラメータを使用したNerve Fiber Analyzerによる緑内障の検出力. あたらしい眼科 18:259-261, 2001

・Haruko Funaki, Shoichi Sawaguchi, Kiyoshi Yaoeda, Yu Koyama, Eishin Yaota, Shigeo Funaki, Motohiro Shirakashi, Yusuke Oshima, Chisa Shukunami, Yuji Hiraaki, Haruki Abe, Tadashi Yamamoto. Expression and Localization of Angiogenic Inhibitory Factor, Chondromodulin-I, in Adult Rat Eye. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 42:1193-1200, 2001.

・Ryota Ogawa, Tomoaki Usui, Mineo Takagi, Shigeru Hasegawa, Haruki Abe, Katsuhiko Nanba. Bilateral optic disc drusen with severe progressive visual field defect. Neuro-Ophthalmology in press

・八百枝潔、白柏基宏、船木繁雄、中枝智子、福島淳志、船木治子、阿部春樹. 緑内障眼における新しいGDxパラメータと視野障害の関係. あたらしい眼科 18:1198-1200, 2001.

・澤田英子、福地健郎、太田亜紀子、須田生英子、梅野哲哉、中枝智子、船木繁雄、原浩昭、白柏基宏、阿部春樹. 第一次硝子体過形成遺残に伴い成人に発症した急性閉塞隅角緑内障の1例—超音波生体顕微鏡による発症メカニズムの検討—日本眼科学会雑誌 105:711-715, 2001

・杉山和歌子、福地健郎、須田生英子、中枝智子、田中陽子、原浩昭、太田亜紀子、船木繁雄、白柏基宏、阿部春樹. 線維柱帯切除術後の濾過胞感染症の7例. 眼紀 52:956-959, 2001

・Shigeo Funaki, Motohiro Shirakashi, Kiyoshi Yaoeda, Haruki Abe, Shiho Kunimatsu, Yasuyuki Suzuki, Goji Tomita, Makoto Araie, Noriko Yamada, Hideya Uchida, Tetsuya Yamamoto, Yoshiaki Kitazawa.

Specificity and sensitivity of glaucoma detection in the Japanese population using scanning laser polarimetry. British Journal of Ophthalmology 86:70-74, 2002.

(分担研究者:新家 眞)

(分担研究者:三嶋 弘)

・S. Mukai, H. K. Mishima, M. Shinya, K. Shoge, K. Ishihara, M. Sasa, Existence of Ionotropic Glutamate Receptor Subtypes in Cultured Rat Retinal Ganglion Cells obtained by Magnetic Cell Sorter Method and Inhibitory Effects of 20-Hydroxyecdysone, a Neurosteroid, on the Glutamate Response, in press, 2002

・Yuichi Tsumamoto, Keisuke Yamashita, Masaya Takumida, Koji Okada, Satoshi Mukai, Makoto Shinya, Hidetoshi Yamashita, Hiromu K. Mishima.

In situ localization of nitric oxide synthase and direct evidence of NO production in rat retinal ganglion cells. Brain Research in press, 2002.

・Tomoko Kato, Yoshifumi Takeda, Shigeo Matsuyama, Hiromu K. Mishima.

Combined occlusion of the central retinal artery and vein in a pediatric patient secondary to infective endocarditis. Archives of Ophthalmology, 119(12) 1868-1869, 2001

・三嶋 弘・岡田真弓・塚本秀利・高松倫也・上 敬宏・渡辺 渉・芳谷 伸洋・小池生夫・小林隆幸・岡田康志: 広島県三次市における眼科検診 広島医学54、1046-1048、2001

・岡田真弓・向井 聖・塚本秀利・高松倫也・岡田康志・三嶋 弘: 広島県御調町における眼科検診 臨床眼科、印刷中、2002

1. 学会発表

(主任研究者:阿部 春樹)

・K. Hashimoto, K. Sakimura, T. Fukuchi, J. Ueda, F. Hayama, H. Matsuda, M. Seki, T. Tanaka, S. Sawaguchi, H. Abe.

Roles of NMDA receptor channels in ischemia induced delayed neuronal death of the retina. (ARVO annual meeting, 2001)

・M. Seki, N. Takei, T. Fukuchi, J. Ueda, K. Hashimoto, F. Hayama, T. Tanaka, H. Matsuda, H. Nawa, H. Abe.

Quantitative analysis of neurotrophins in the retina of rats. (ARVO annual meeting, 2001)

(分担研究者:新家 眞)

・塩酸イガニジピンのラット網膜神経細胞障害モデルに対する作用 齋藤慎一郎 他 第105回日本眼科学会総会、2001.4、横浜。

・Pilidoxal hydrochlorideのラット網膜神経細胞障害モデルに対する作用・大橋正明他・第21回日本眼薬理学会、第13回国際眼研究会議日本部会合同会議、2001.9、東京。

・培養ラット網膜ミユラー細胞の神経栄養因子の発現・井上立州他・第21回日本眼薬理学会、第13回国際眼研究会議日本部会合同会議、2001.9、東京。

(分担研究者:三嶋 弘)

・S. Mukai, H. K. Mishima, M. Shinya, K. S. hoge, K. Ishihara and M. Sasa: The inhibitory effects of 20-hydroxyecdysone, a neurosteroid, on glutamate receptor subtypes in cultured rat retinal ganglion cells: a whole-cell patch clamp study. The 74th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society 2001

・向井 聖、三嶋 弘、新矢 誠人、望月英毅、津間本裕一、正化圭介、石原熊寿、笹 征史: 培養ラット網膜神経節細胞におけるグルタミン酸受容体サブタイプに対する神経ステロイドの抑制効果 第105回日本眼科学会総会 2001

・S. Mukai, H. K. Mishima, M. Shinya, K. S. hoge, K. Ishihara and M. Sasa: Inhibitory effect of neurosteroid on glutamate-induced currents in cultured rat retina ganglion cells. The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2001

・向井 聖、三嶋 弘、新矢 誠人、正化圭介、石原 熊寿、笹 征史: ラット培養網膜神経節細胞における電位依存性カルシウムチャンネルの存在とベタキソールによる抑制効果 第21回日本眼薬理学会 第13回国際眼研究会議日本部会 2001

・津間本裕一、三嶋弘、山下敬介、安田峯生: ラット網膜神経節細胞における一酸化窒素合成酵素の検討 第106回日本解剖学会総会 2001

・津間本裕一、山下敬介、工田昌矢、岡田康志、向井聖、新矢誠人、山下英俊、三嶋弘: グルタミン酸刺激による網膜神経節細胞での一酸化窒素合成 第105回日本眼科学会総会 2001

・Yuichi Tsumamoto, Keisuke Yamashita, Masaya Takumida, Koji Okada, Hidetoshi Yamashita, Hiromu K. Mishima: Immunohistochemical Detection of Nitric Oxide Synthesis in Rat Retinal Ganglion Cells. ARVO annual meeting 2001

・津間本裕一、山下敬介、工田昌矢、山下英俊、三嶋弘: 網膜神経節細胞における一酸化窒素合成 第21回 眼薬理学会、第13回ICER日本部会合同会議2001。

・H Tsukamoto, HK Mishima, Y Kitazawa, M Araie, H Abe, A Negi: A comparative clinical study of latanoprost and isopropyl unoprostone in Japanese patients with primary open-angle glaucoma and ocular hypertension. AOG S,2001

・H Tsukamoto, K Jian, M Takamatsu, K Okada, S Mukai, Y Tsumamoto and H K Mishima: Additive effect of bunazosin, an alpha-1 blocker on intraocular pressure when topically added to latanoprost in patients with glaucoma, ISOPP, 2002

・敦賀 孝典、金本 尚志、加藤 倫子、山下 英俊、宮川 清、三嶋 弘: 眼球形成期における網膜特異的新規遺伝子のクローニング 第105回日本眼科学会総会、2001

・T. Tsuruga, T. Kanamoto, T. Kato, H. Yamashita, K. Miyagawa, H.K. Mishima: A novel gene highly expressed in retinal development. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, 2001.

・Tomoko Kato, Keiko Shimizu-Nishikawa, Hiromu K. Mishima, Katsutoshi Yoshizato: Cloning and characterization of novel matrix metalloproteinase from regenerating newt limbs. 14th international congress of developmental biology, 2001

・加藤倫子、岡田康志、鈴木亮、服部幸夫、三嶋弘: チトクロームP4501B1 (CYPB1) からみた先天緑内障の臨床所見 第12回日本緑内障学会 2001年9月1日

・向井 聖・塚本秀利・高松倫也・地庵浩司・三嶋 弘: FDT (Frequency Doubling Technology) 視野計の使用経験 第60回広島地方眼科学会 2001

・岡田真弓・向井 聖・塚本秀利・高松倫也・岡田康志・三嶋 弘: 広島県三次市における眼科検診 第12回日本緑内障学会、2001

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

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)

分担研究報告書

神経科学的アプローチによる緑内障の病態解明と治療法の開発に関する研究

分担研究者 新家 眞

東京大学大学院医学系研究科 教授

**研究要旨** NMDA硝子体内注入モデルおよびカイニン酸硝子体内注入モデルにおける網膜神経節細胞障害抑制効果の有無に関して、点眼薬としての開発可能性を持つ水溶性カルシウムブロッカーであるイガニジピンの効果をDiIの逆行性輸送による網膜神経節細胞染色法を用いた直接カウント法によって検討し、またPylidoxal hydrochlorideの神経保護効果についても検討を行った。その結果、イガニジピンの神経保護効果は確認されたが、Pylidoxal hydrochlorideの神経保護効果は認められなかった。さらに、網膜神経節細胞障害および保護へのMuller細胞の関与に関して検討するために、ラット眼のMuller細胞を培養し、低酸素下および高圧下で培養して、その神経栄養因子の発現変化について検討した。その結果、低酸素ストレス及び高圧ストレスはMuller細胞の神経栄養因子発現を抑制することが明らかとなった。

A. 研究目的

緑内障では網膜神経節細胞が障害される。したがって、網膜神経細胞に対する保護作用を持つ薬剤の開発は新たな緑内障治療につながる可能性が大きい。本研究ではラットを用いてin vivoの網膜神経節細胞障害モデルを複数種類確立し、そのモデルにより点眼薬としての開発可能性を持つ水溶性カルシウム

ブロッカーであるイガニジピンの神経保護効果、Pylidoxal hydrochlorideの神経保護効果を検討し、さらにMuller細胞の網膜神経節細胞死への関与についても検討する。

B. 研究方法

水溶性カルシウムブロッカーであるイガニジピンの神経保護効果についてDi

I(1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate)を上丘に投与して逆行性輸送による網膜神経節細胞染色を行った後に網膜伸展標本を作製することで、網膜神経細胞数をカウントして、実際に網膜神経細胞がどの程度生存しているかを評価した。

Pyridoxal hydrochlorideの神経保護効果についてはNMDAおよびカイニン酸投与により網膜傷害モデルを作成し、それに対する効果を検討した。

Muller細胞の網膜神経細胞死への関与に関しては、ラットMuller細胞を培養し、低酸素下および高圧下で培養して、その神経栄養因子の発現変化について検討した。神経栄養因子は、BDNF, CNTF, GDNFについて検討した。神経栄養因子の発現については、G3PDHに対する割合をコントロールと比較した。

### C. 研究結果

DI1の逆攻性輸送による網膜神経細胞数の直接カウント法によりイガニジピン1.2 $\mu$ M投与はカイニン酸による網膜神経細胞障害に対して有意に神経保護効果を持つことが示された。

Pyridoxal hydrochlorideの実験では、NMDA投与モデル、カイニン酸投与モデルいずれにおいても有意な神経保護効果は認められず、少なくとも本実験に用いた投与方法・用量では神経保護効果を得ることは難しいという結果が得ら

れた。

培養Muller細胞による実験ではBDNF, CNTF, GDNFのmRNA発現はそれぞれの負荷をかけると低下し、負荷を除くことによりコントロールと同等の状態に戻った、すなわち低酸素ストレス及び高圧ストレスはMuller細胞の神経栄養因子発現を抑制することが明らかとなった。

### D. 考察

緑内障においては網膜神経節細胞が障害されるが、その障害機序として神経細胞に対する直接障害および視神経乳頭における軸索障害の結果として起こる2次的障害が考えられている。さらに直接障害としては、高眼圧によるもの、低酸素によるもの、グルタミン酸興奮毒性によるもの等が考えられており、また視神経乳頭における軸索障害の結果として起こる2次的障害としては神経栄養因子の欠乏や軸索流の障害によって惹起される神経細胞のアポトーシスが考えられている。今回、我々はNMDA硝子体内注入モデルおよびカイニン酸硝子体内注入モデルというグルタミン酸興奮毒性による網膜神経障害モデルにより点眼薬として開発できる可能性を持つ水溶性カルシウムブロッカーのイガニジピンおよびビタミンB6の一つであるPyridoxal hydrochlorideに関して、その神経保護効果を検討した。その結果、イガニジピンがカイニン酸による網膜神経障害に対して神



経保護効果を持つことが確認された一方、Pyridoxal hydrochlorideは本モデルに対しては有効な神経保護効果を示さなかった。したがって、これらの結果よりイガニジピンは今後臨床使用に向けての開発が期待されるが、Pyridoxal hydrochlorideは、少なくとも現時点ではあまり有効ではないであろうという結果となった。また、培養ラットMuller細胞を用いた実験では低酸素ストレス及び高圧ストレスがMuller細胞の神経栄養因子発現を抑制することが明らかとなった。従って、網膜神経細胞障害においてはMuller細胞を介した間接的影響も考慮する必要があると考えられた。

#### E. 結論

ラットを用いたグルタミン酸興奮毒性による網膜神経節細胞障害モデルに対して点眼薬としての開発可能性を持つ水溶性カルシウムブロッカーであるイガニジピンが有効な神経保護効果を持ち、今後の臨床応用の可能性が示された。またPyridoxal hydrochlorideの神経保護効果は本モデルにおいては認められなかった。また低酸素ストレス及び高圧ストレスはMuller細胞の神経栄養因子発現を抑制することが明らかと

なった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

・塩酸イガニジピンのラット網膜神経細胞障害モデルに対する作用 齋藤慎一郎他 第105回日本眼科学会総会、2001.4、横浜。

・Pyridoxal hydrochlorideのラット網膜神経細胞障害モデルに対する作用・大橋正明他・第21回日本眼薬理学会、第13回国際眼研究会議日本部会合同会議、2001.9、東京。

・培養ラット網膜ミュラー細胞の神経栄養因子の発現・井上立州他・第21回日本眼薬理学会、第13回国際眼研究会議日本部会合同会議、2001.9、東京。

#### 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:なし
3. その他:なし

分担研究報告書

神経科学的アプローチによる緑内障の病態解明と治療法の開発に関する研究

分担研究者 三嶋 弘 広島大学医学部 教授

研究要旨

1. 神経保護に関する研究により、1) グルタミン酸受容体を抑制する神経ステロイドが緑内障に対する新しい治療薬になりうる可能性があること、2) 網膜神経節細胞においてグルタミン酸による一酸化窒素(NO)合成酵素の活性化によりNOが合成され、このNOがグルタミン酸による細胞毒性の経路に関与していることが明らかになった。
2. 薬物療法に関する研究により、1) ラタノプロストの眼圧下降効果はウノプロストンの眼圧下降効果より優れている、2) ラタノプロスト点眼にブナゾシン点眼を追加すると眼圧がさらに下降する、ということがわかり、緑内障薬物療法に関するEvidence-based Medicine のEvidenceの一部となった。
3. 神経再生に関する研究により、1) ヒト幹細胞から網膜の分化に関与する新規遺伝子をクローニングをすることが網膜変性疾患の治療への手がかりとなりうること、2) イモリの肢の再生に新規細胞外マトリックス分解酵素が関与していることが考えられ、眼の組織再生の手がかりなることがわかった。
4. 疫学に関する研究により、視野検査は緑内障の発見に有用であったが、眼圧検査のみで緑内障を発見するのは困難であり、緑内障の発見を目的とした眼科検診には視野検査が必要であることが明らかとなった。

A. 研究目的

神経保護

1) 網膜神経細胞の細胞死ならびに保護作用

A. 研究目的

緑内障の視神経障害の進行にグルタミン酸誘発神経細胞死が関わっている。そこでまずグルタミン酸神経毒性モデルを作成して、その神経毒性を抑制するかどうかを調べ、その結果、抑制効果があればその抑制メカニズムを解明す

る。

2) 網膜神経細胞の細胞死に関する研究(グルタミン酸刺激による網膜神経での一酸化窒素合成)

A. 研究目的

これまでの研究により、緑内障における網膜神経節細胞の細胞死の過程にはグルタミン酸等の興奮性アミノ酸によるNMDA受容体の刺激と、それに続く細胞内へのCa<sup>2+</sup>の流入が関与していることがわかってきた。一方、Ca<sup>2+</sup>の流入に伴い細胞内では一酸化窒素(NO)合成酵素(NOS)の活性化によりNO合成がおこ

疫学 眼科検査  
島 県 三 次 市 に お け る

A. 研究目的  
緑内障の早期発見を目的として、初期に緑内障を発見し、治療を開始し、視覚障害を予防することを目的とする。

B. 研究方法

培養細胞を用いた網膜神経節細胞の分化に関する研究。網膜神経節細胞の分化を促進する因子を明らかにし、そのメカニズムを解明することを目的とする。

網膜神経節細胞の分化に関する研究。網膜神経節細胞の分化を促進する因子を明らかにし、そのメカニズムを解明することを目的とする。

1) 網膜神経節細胞の分化に関する研究。網膜神経節細胞の分化を促進する因子を明らかにし、そのメカニズムを解明することを目的とする。

網膜神経節細胞の分化に関する研究。網膜神経節細胞の分化を促進する因子を明らかにし、そのメカニズムを解明することを目的とする。

プロパノラタ薬関連遺伝子発現の解析

A. 研究目的  
Evidence-based Medicine (EBM) を考慮し、緑内障の治療に効果的な薬剤を特定することを目的とする。

神経再生 1) 網膜の分化に関する遺伝子

A. 研究目的  
網膜の分化に関する遺伝子の発現を解析し、そのメカニズムを解明することを目的とする。

2) イモリ細胞外マトリックス分解酵素

A. 研究目的  
イモリ細胞外マトリックス分解酵素の発現を解析し、そのメカニズムを解明することを目的とする。

