

200500617A

別添1

厚生労働科学研究費補助金

感覚器障害研究事業

網膜ニューロンの緑内障性障害 —それに対する保護と再生—

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 新家 眞

平成18(2006)年 4月

目 次

I. 総括研究報告

1. 緑内障性網膜ニューロン障害の性状と治療に関する研究 ----- 3
主任研究者：新家 眞

II. 分担研究報告

1. 緑内障の病態と治療に関与する関連タンパクに関する研究 ----- 16
分担研究者：三嶋 弘
2. 網膜ニューロンの緑内障性障害に関する研究----- 21
分担研究者：阿部春樹

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 30

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 31

2005年度厚生労働科学研究費補助金総括研究報告書

網膜ニューロンの緑内障性障害 —それに対する保護と再生—に関する研究

主任研究者 新家 眞 東京大学医学部 教授

研究要旨：網膜神経節細胞の周囲に存在する各種グリア系細胞の役割はほとんど明らかになっていないが、世界的にも当施設でのみ利用可能なマウスの安定した高眼圧緑内障モデル及びラット緑内障モデルを用いて、神経節細胞及び各種グリア系細胞相互作用の解明及び網膜特異的な神経細胞死の機序に関わる新規の分子の解明を進めることを目的とする。具体的な本年度のプロジェクトは以下8項目である。

- ① マウス神経細胞死の生体内観察法
- ② ラットの実験緑内障眼の確立
- ③ ラット網膜神経節細胞の酸化ストレス誘導神経細胞死に対する植物系フラボノイドの神経保護効果
- ④ 網膜肝細胞・前駆細胞の取得法と性状の検討

以下、プロジェクト毎に報告をまとめた。

研究要旨

網膜神経節細胞の周囲に存在する各種グリア系細胞の役割はほとんど明らかになっていないが、世界的にも当施設でのみ利用可能なマウスの安定した高眼圧緑内障モデル及びラット緑内障モデ

ルを用いて、神経節細胞及び各種グリア系細胞相互作用の解明及び網膜特異的な神経細胞死の機序に関わる新規の分子の解明を進めることを目的とする。具体的なプロジェクトは以下8項目である。

1. マウス神経細胞死の生体内観察法
2. ラットの実験緑内障の確立
3. ラット網膜神経節細胞の酸化ストレス誘導神経細胞死に対する植物系フラボノイドの神経保護効果
4. 網膜幹細胞、間葉系幹細胞を用いた RGC 再生の検討

以下、4プロジェクト毎に報告をまとめた

プロジェクト1. 緑内障性網膜神経細胞死の生体内観察系の確立

A. 研究目的：

高眼圧モデルマウスにより神経細胞死の組織学的な解析は可能であるが、一定の期間ののち障害を確認することができるのみである。従って患者経過診察により得られるような、経時的な神経細胞の障害を観察する系を確立することを目的とした。

B. 研究方法：

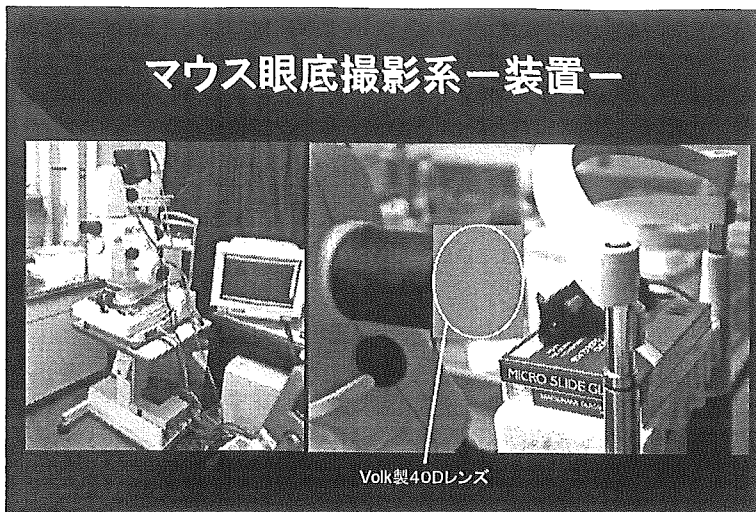
網膜神経節細胞(RGC)に蛍光色素(CFP)を発するように遺伝子改変されたマウス(CFP+/+)を高眼圧にするため、CFP+/+と先述のCol1a1r/rを掛け合わせることを試みた。同時に生体蛍光顕微鏡を用いて、網膜蛍光眼底撮影を試みた。

倫理面への配慮

動物実験に際してはAssociation for Research of Vision and Ophthalmology (ARVO)決議を順守し十分な倫理的配慮を加えた。

RGC撮影方法

マウスは散瞳後、キシラジンとケタミンを腹腔内投与による麻酔下で台に固定し、角膜表面にはミネラルオイルを滴下した。眼底撮影は、接眼部に40Dのレンズ(Volk社)、励起光、蛍光用にCFP専用フィルター(朝日分光社)を取り付けたTopcon社製の眼底カメラを用い、デジタルカメラ(D-1, Nikon社)にて撮影した。画像処理にはMaxIm DL(Diffraction Limited社)、Image-Pro PLUS(Media Cybernetics社)を用いた。(図1)



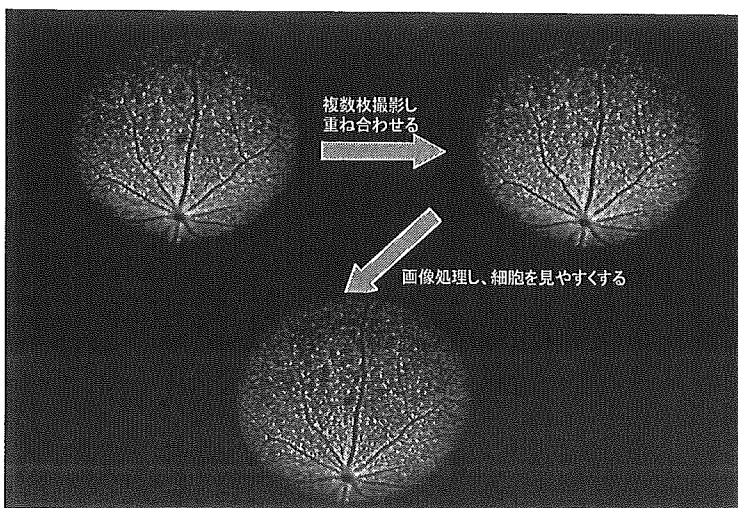
視神経挫滅モデルを用いた経時的神経細胞観察

視神経挫滅モデルは、腹腔内麻酔後視神経を露出し、鑷子にて5秒間挫滅した。特定の場所において術前、術後の眼底写真を比較し、RGCの数を比較した。

C. 研究結果

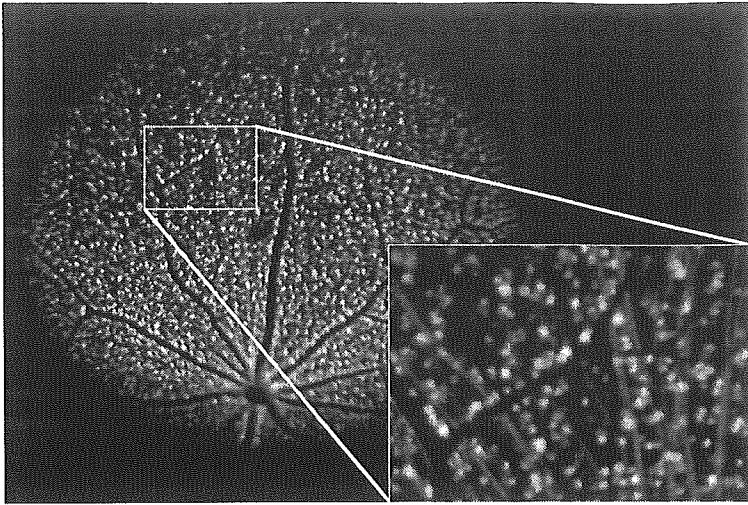
以下の図のような写真撮影が可能であった。線状に黒く抜けている部分が血管で、白点は個々の網膜視神経細胞を示す。

図 2



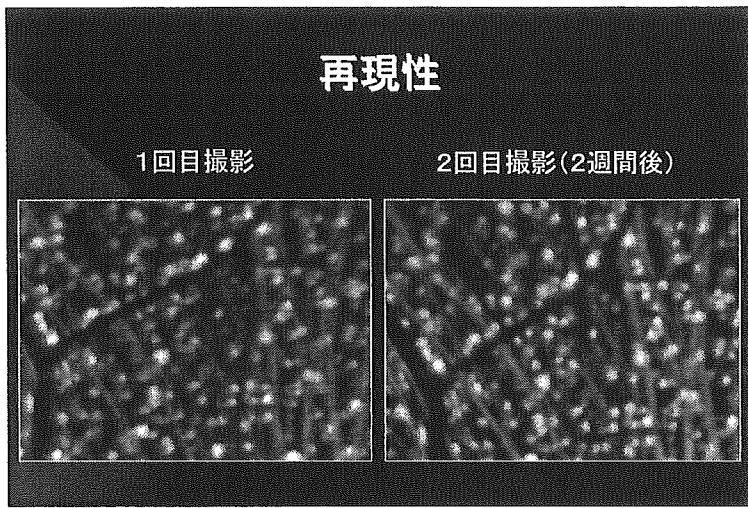
画像処理を行い、各細胞が鮮明に確認できた。

図 3



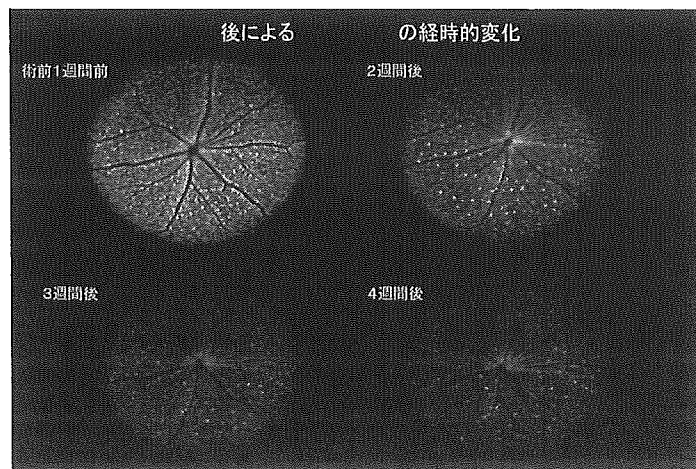
拡大しても各細胞を明瞭に観察することができる。

図 4



2週間をおいて同部位を撮影したが、再現性は良好であり、経時的な評価に耐えうる画像と判断した。

図 5



挫滅前後において、RGCが減少していることが眼底写真より確認でき、網膜特定領域のRGC数追跡調査では、挫滅前、挫滅後2、3、4週間で146、54、11、6、と減少を数値で確認することができた。

D. 考察

撮影方法の改善により経時的に神経細胞を数えることが出来る解像度の写真を得ることが出来たため、今後は様々な神経細胞障害モデルにおいて、より精度の高い評価方法として利用可能かを検討する必要がある。また、細胞死の評価が確定した後に種々の神経保護薬の効果を評価することに応用する予定である。

E. 結論

RGCの生体内観察は蛍光色素を発現するRGCを利用することにより実現可能であり、視神経挫滅モデルにおいて経時的な細胞障害を定量的に評価することが出来た。高眼圧による経時的な神経細胞死の経過が追えるならば、神経保護薬の薬効評価に非常に有用なモデルになると考えられる。

プロジェクト2. ラットの実験緑内障の確立

A. 研究目的：

ラットはマウスと比べ遺伝子改変は困難であるが、眼球の大きさの点でマウスより組織学的な解析には好ましい。高眼圧による神経障害モデルの作成を目的とした。

B. 研究方法：

房水流出路である上強膜静脈を熱凝固閉塞または結紮することにより眼圧を上昇させ、高眼圧モデルを作成した。Wister rat adultをウレタン麻酔し、両眼角膜輪部で結膜を切開した後に、上

強膜静脈を同定し、片眼はジアテルミーで凝固を行い、僚眼は無処置コントロール眼とした。3本及び4本焼灼したのち、1週間、及び3週間でトノペンにより眼圧を測定した。又同様に10-0糸で結紮をおこない同様に眼圧測定した。

倫理面への配慮

動物実験に際してはAssociation for Research of Vision and Ophthalmology (ARVO)決議を順守し十分な倫理的配慮を加えた。

C. 研究結果：処置眼はコントロール眼と比較し眼圧上昇の傾向が見られたが、トノペンの測定を侵襲的なマイクロニードル法で確認したところ、上昇は見られないことが判明した。

D. 考察

少なくともジアテルミーによる上強膜静脈焼灼法もしくは結紮法ではラットの高眼圧を惹起できず、トノペンでの不安定な測定方法もふまえ、全面的な変更を要する必要がある。眼圧測定もマイクロニードル法を併用し、より確実な系を立ち上げる必要がある。これらの方法は世界的にも多くの施設で行われているが日本ではあまり追試がうまくいっていないのが現状であり、今後も検討が必要な実験手技である。

E. 結論

ラットの上強膜静脈焼灼法による高眼圧モデル作成は不成功であり、今後は方法を変更して再度試行する必要がある。

プロジェクト3. ラット網膜神経節細胞の酸化ストレス誘導神経細胞死に対する植物系フラボノイドの神経保護効果

A. 研究目的：

緑内障性視神経障害の成因の一つに酸化ストレスがあると言われている。抗酸化剤は古くからビタミン剤の効果が指摘されているが、最近では様々なサプリメントの効果が話題になっているが、現時点で視神経に効果が認められたものはなく、今後の詳細な検討が必要である。植物系サプリメントの中で、フラボノイドは赤ワインやそばなどの食品に含まれる抗酸化剤として注目を浴びている。そこでRGC初代培養系において酸化ストレス負荷による神経細胞死にフラボノイドの一種フラボノール系の3薬剤が影響を与えるかを検討した。

B. 研究方法：

生後6～7日令ラット網膜からtwo step immunopanning法で網膜神経節細胞を単離しB27添加物、神経栄養因子およびフォルシユコリンを含む無血清培地（以下、B27培地）で3日間培養した。最終濃度 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} Mのkaempferol rutinoside (Krt), 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} M、 10^{-11} のquercetin rutinoside (Qrt), 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} Mのquercetin rhamnoside (Qrm)を添加後、酸化ストレス負荷群においてはB27から抗酸化剤を除去した培地B27(-)に交換し、37℃で24時間培養後にカルセインAM染色により生存細胞を検出し、全細胞数との比から神経節細胞の生存率を無添加群（コントロール）と検討した。

倫理面への配慮

動物実験に際してはAssociation for Research of Vision and Ophthalmology (ARVO)決議を順守し十分な倫理的配慮を加えた。

C. 研究結果

培地交換1日後、RGC生存率は、無添加群で $44.4 \pm 6.4\%$ 、Krt群(濃度 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10})でそれ

ぞれ71.2±11.6%、57.3±15.4%、45.4±9.1%、Qrt群(濃度 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 、 10^{-11})、でそれぞれ74.2±13.3%、66.7±13.8%、66.6±11.9%、39.9±3.8%、Qrm群(濃度 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9})でそれぞれ76.5±9.6%、80.0±10.8%、66.6±5.3%であった。(図1-3)

Krt群は濃度 10^{-8} 、 10^{-9} で、Qrt群は濃度 10^{-9} 、 10^{-10} 、 10^{-11} で、Qrm群は濃度 10^{-7} 、 10^{-8} で無添加群に比べ有意に生存率を上昇させた($P<0.05$)。

D. 考察：

酸化ストレスをうけた RGC に対し、Krt、Qrt 及び Qrm は用量依存的に生存率を上昇させた。フラボノイドは酸化ストレスをうけた単離 RGC に対して神経保護効果を有する可能性があることが明らかになった。フラボノール系化合物は、側鎖の修飾により活性が異なるものの神経保護効果を有する可能性が示唆された。フラボノイド骨格と糖との関係や、それぞれの濃度の違い等について今後検討を進める必要がある。

図 1

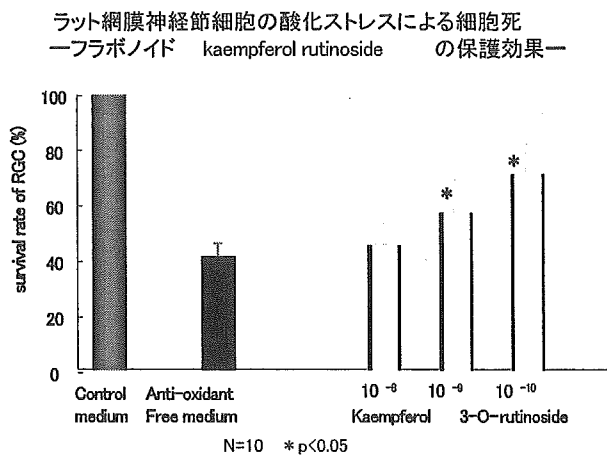


図 2

ラット網膜神経節細胞の酸化ストレスによる細胞死
—フラボノイド Quercetine rutinoside の保護効果—

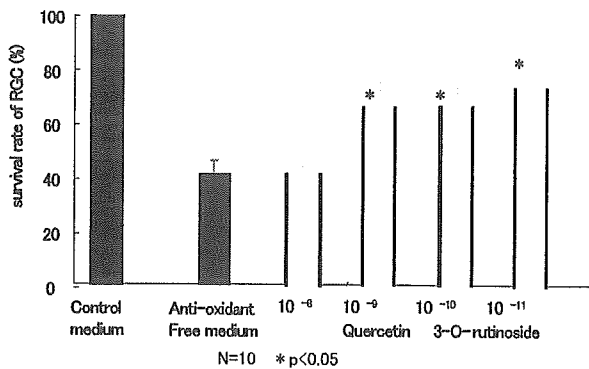
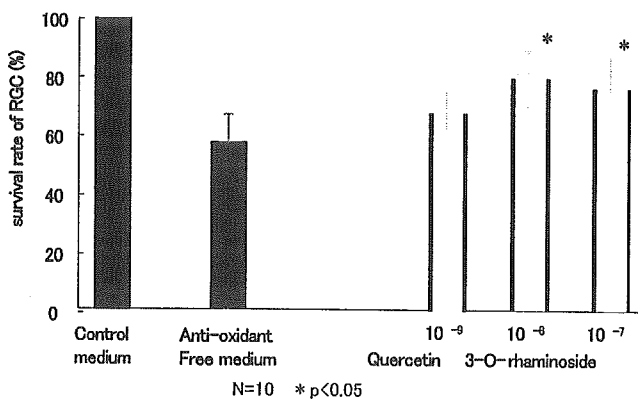


図 3

ラット網膜神経節細胞の酸化ストレスによる細胞死
—フラボノイド Quercetine rhamnoside の保護効果—



E. 結論

酸化ストレスをうけたRGCに対し、フラボノイドのケンフェロールルチノシド、ケルシトリンルチノシド、ケルシトリンラミノシドは用量依存的に生存率を上昇させた。フラボノイドは酸化ストレスをうけた単離RGCに対して神経保護効果を有する可能性があることが明らかになった。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Yamada H, Chen YN, Aihara M, Araie M. Neuroprotective effect of calcium channel blocker against retinal ganglion cell damage under hypo

xia. *Brain Res.* 2006 1071(1):75-80

2. 学会発表

平成17年4月日本眼科学会総会

- ラット網膜神経節細胞酸化ストレスに対するフラボノイドの神経保護作用
- CFP 発現マウスに於ける in vivo での RGC 撮影法

平成17年7月 第25回日本眼薬理学会

- シンポジウム3 遺伝子改変動物を用いた薬物開発

平成17年9月 第16回日本緑内障学会

- CFP 発現マウスに於ける in vivo での RGC 撮影法および再現性

平成17年10月 植物化学調節学会

- フラボノイドの構造とラット網膜神経節細胞酸化ストレスに対する神経保護作用

2005年4月 APAO meeting Kuara-Rumpul Malaysia.

- Neuroprotective Effects of Flavonoids on Purified Cultured Retinal Ganglion Cells under Oxidative Stress

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

プロジェクト4:網膜幹細胞、間葉系幹細胞を用いたRGC再生の検討

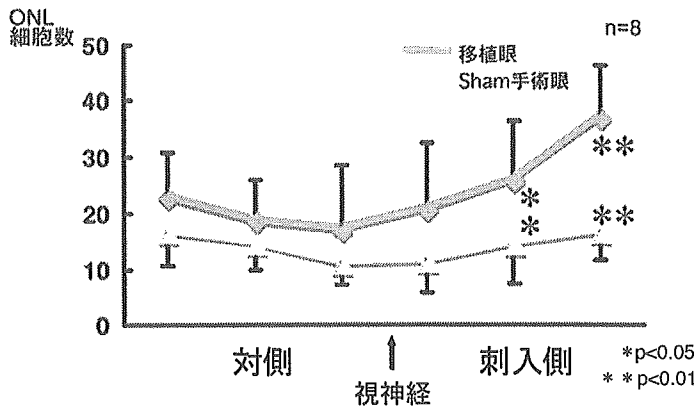
A. 研究目的:幹細胞移植が緑内障治療の手段となりうるかを検討する基礎的検討の為に、幹細胞移植が網膜神経細胞保護作用を有するかを検討する事を目的とした。

B. 研究方法:RCSラットの網膜下腔に、家兎よりニューロスフェア法を用いて取得した網膜幹/前駆細胞およびマウスよりDexter法で取得した骨髄間葉系幹細胞の細胞懸濁液を経強膜的に移植し、移植後2, 4, 8週に眼球摘出し、外顆粒層の細胞数計測により網膜変性を組織学的に検討した。同時に移植後の網膜機能を電気生理学的に評価した。

倫理面への配慮

動物実験に際してはAssociation for Research of Vision and Ophthalmology (ARVO)決議を順守し十分な倫理的配慮を加えた。

C. 研究結果:RCSラットの網膜下腔にマウスの骨髄間葉系幹細胞の細胞懸濁液を経強膜的に移植したところ、組織学的検討においては、移植後2週では対照眼と細胞移植眼で、外顆粒層の細胞数に有意差は認められなかったが、移植後4週および8週(下図)では、細胞移植眼が対照眼に比べて有意に外顆粒層に残存する核の数が多く、網膜変性が抑制された。また、電気生理学的にも移植後5週では、対照眼はすでにb波の残存が認められなかったが、細胞移植眼では、6眼中3眼でb波の残存が認められた。同様に移植後8週においても、対照眼と比較し、移植眼は振幅が有意に保たれており、機能的にも細胞移植眼において、網膜変性の進行抑制が示された。家兎由来の網膜幹/前駆細胞の移植ではこのような変性進行抑制効果は得られなかった。



D. 考察:細胞移植による網膜変性阻止効果の検討を行い、その効果を確認する事が出来た。引き続いて、in vitroでは網膜神経節細胞の産生法の検討が、in vivoでは緑内障モデルを用いた解析が必要と考えられる。

E. 結論:緑内障に対する神経節細胞死抑制を目指した細胞移植療法の確立の為には、まず細胞の選定が必要とされる。我々の研究では、これまでに着目されてきた網膜幹細胞の性状を明らかにし、更に、取得可能な幹細胞の神経保護作用を明らかにする事が出来た。ここで得られた知見は、神経変性疾患に対する細胞移植療法の臨床応用に向けた基盤になると考えられる。

F. 健康危険情報:特記すべき事なし。

G. 研究発表 未定

H. 知的財産権の出願・登録状況: 特記事項無し

厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書

緑内障の病態と治療に関与する関連タンパクに関する研究

分担研究者 三嶋 弘 広島大学医学部 教授

研究要旨：緑内障性神経障害の発症機序およびその病態は不明であり、現在では治療法として眼圧降下療法のみである。しかし、眼圧が降下した場合でも、緑内障性神経障害が進行する症例は多く見られることより、眼圧に依存しない緑内障性神経障害の病態が存在するものと推察される。我々は、今回の分担研究において、眼圧ではなく、眼内とくに網膜神経における内在性タンパクの関与の可能性について検討した。具体的には、1) 緑内障モデルマウスを用いたプロテオミクス解析を行って、緑内障関連タンパクとしての候補タンパク群のスクリーニングを行うこと、2) それらターゲット・タンパクの機能解析を行って緑内障の病態を解明し、実践的臨床応用を前提とした緑内障性神経障害に対する新規治療法の開発すること、を主目的とした。

A. 研究目的

平成16年度には緑内障モデルマウスであるDBA2/Jマウスを用いたプロテオミクス解析が終了し、緑内障性網膜神経細胞死に関与する可能性のあるタンパク群を新たに見出すことに成功した。平成17年度では、さらに、候補タンパクの多様性を見出すために、網膜神経においてグルタミン酸神経毒性に反応するタンパク群のプロテオミクス解析も行う。それらの緑内障関連タンパクであるターゲット・タンパクの機能解析を行い、さらに眼圧降下療法以外の新しい治療法を開発を目指す。

B. 研究方法

- 1) グルタミン酸トランスポーターであるEAAC1のノックアウト・マウスは、網膜内グルタミン酸神経毒性のモデルとして、緑内障の病態と同様に、網膜神経節細胞死が起こることが分かっている。そのモデルマウスの網膜サンプルについて、平成16年に確立されたプロテオミクス解析システムを活用して、同様の解析を行う。
- 2) 同定されたタンパク群の機能解析を、*in vitro* の系を用いて行う、すなわち、2次元網膜組織培養系、RGC5網膜神経節細胞分離培養系、およびR28継代培養網膜前駆細胞系などの実験系を用いて、ターゲット・タンパクの機能解析を行う。

(倫理面への配慮)

ARVOの規定に従う

C. 研究結果

- 1) まず再現性を有する2次元電気泳動ゲルを作成し、明らかに発現量の変化を認めるスポットを20個以上見出し、そのうち約14個のスポットのタンパク名の同定に成功した。以下に、その一覧を示す。

Ptotein name	EAAC1-/-での発現	コントロールでの発現
KIAA protein	+	-
GABA-A receptor	+	-
p300 co-factor JMY	+	-
LEK1	+	-
unnamed protein(1)	+	-
unnamed protein(2)	+	-
RIKEN protein	+	-
Activator of Rho-signaling	+	-
PDGF receptor	+	-
Galnt-7	-	+
Regulator of sex limitation-2	-	+
KIAA 0626 protein	-	+
Hypothetical protein	+/-	+
unnamed protein(3)	+/-	+

- 2) マウスの網膜を用いた免疫組織染色法を用いて、ターゲット・タンパクの免疫染色法を

行い、それぞれのターゲット・タンパクの網膜内での発現局在性が明らかになった。さらに、PDGFやGABAが網膜グルタミン酸毒性に関与していることが、in vitro の実験系であるRGC5を用いた実験において判明した。

D. 考察

グルタミン酸神経毒性に関与する網膜内関連タンパクが数多く判明したが、細胞死が誘導される過程において、それらの細胞内シグナル系の相互応答を解明していく必要がある。その結果として、グルタミン酸神経毒性を抑制する機序が考案され、緑内障性網膜神経障害の治療に貢献する可能性が生まれるものと思われる。

E. 結論

グルタミン酸神経毒性に関与するタンパク群が明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G-1. 学会発表：

平成17年眼薬理学会：EAAC1ノックアウト・マウスのプロテオミクス解析

G-2. 論文発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし