

200500617 B

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 ーそれに対する保護と再生ー

平成15年度～17年度 総合研究報告書

主任研究者 新家 眞

平成18(2006)年 4月

厚生労働科学研究費補助金研究報告書目次

目 次

I. 総合研究報告	
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	
2. 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 -----	42
分担研究者：三嶋 弘	
3. 網膜ニューロンの緑内障性障害に関する研究-----	47
分担研究者：阿部春樹	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	57
III. 研究成果の刊行物・別刷 -----	58

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 in vivo 実験系としてマウス高眼圧モデルの作成と眼圧測定
- ② マウス神経細胞死の生体内観察法
- ③ ラットの実験緑内障眼の確立
- ④ 網膜神経節細胞 (RGC) 初代培養系を用いた低酸素誘導神経細胞死に対する緑内障眼圧下降薬の眼圧非依存性神経保護効果の検討
- ⑤ RGC 初代培養系を用いた低酸素誘導神経細胞死に対するカルシウムチャンネル拮抗薬の神経保護効果の検討
- ⑥ 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
- ⑦ グリア系ミューラー細胞における神経栄養因子の発現解析
- ⑧ 網膜幹細胞・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. in vivo 実験系としてマウス高眼圧モデルの作成と眼圧測定
2. マウス神経細胞死の生体内観察法
3. ラットの実験緑内障眼の確立
4. 網膜神経節細胞 (RGC) 初代培養系を用いた低酸素誘導神経細胞死に対する緑内障眼圧下降薬の眼圧非依存性神経保護効果の検討
5. RGC 初代培養系を用いた低酸素誘導神経細胞死に対するカルシウムチャネル拮抗薬の神経保護効果の検討
6. 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
7. グリア系ミューラー細胞における神経栄養因子の発現解析
8. 網膜肝細胞・前駆細胞の取得法と性状の検討

以下、8プロジェクト毎に報告をまとめ、4. 評価（研究成果について）以降の項目は全体をまとめて評価した。

プロジェクト1. マウス緑内障モデルの確立

1. 研究目的：

高眼圧による神経細胞死の機序の解明のためにはin vivo動物モデルにより解析することが望ましい。マウスは、遺伝子改変および実験手段の多様性によりもっとも利用しやすい動物であるため、本研究ではまず緑内障モデルの確立を第一とした。共同研究者らが開発した高眼圧マウスを継代し、高眼圧性緑内障神経障害モデルとして利用可能かを確認することを目的とする。

2. 研究方法

2-1慢性高眼圧モデルマウス

当所属機関の相原らが発見したcollagen I alpha1のmatrix metalloproteinase切断部位に遺伝子変異が組み込まれたマウスB6, 129-*Col1a1^{tml}Jae*を米国より輸入し、継代飼育を行う。このマウス*Col1a1 r/r*は成長とともに高眼圧を呈することが既に相原らにより国外で確認済みである。今回国内で始めて継代することにより、再度高眼圧モデルとして使用可能かを確認する必要がある。そこで高眼圧の存在と視神経障害の有無を以下の方法で行った。

1). microneedle法によるマウス眼圧測定

Homozygous B6, 129-*Col1a1^{tml}Jae* (*Col1a1 r/r*) およびそのwild type (*Col1a1 +/+*)を用いた。眼圧は微小ガラス針及び圧トランスデューサーを用いて10時から14時の間に測定した。生後12, 18, 24, 36, 54週での眼圧を同一個体(8 *Col1a1 r/r*, 7 *Col1a1 +/+*)で測定、さらに異なる個体の異なる週令での眼圧も測定した。上昇の指標として、眼圧上昇値と上昇期間の積算を用いた。

2). 電子顕微鏡組織切片による解析

視神経障害の有無、視神経線維障害パターン、視神経線維障害と視神経線維断面積の関係について以下のように検討した。

12週の眼圧測定の後、固定し視神経断面上方がわかるよう強膜の一部を残して視神経を取り出した。Epoxy Resin包埋した後、眼球後方300 μm の部分で視神経横断面切片を作成し、電子顕微鏡を用いて200倍にて視神経断面を、視神経断面より20カ所（中心4カ所、中間8カ所、周辺8カ所）を選び、10000倍にて視神経線維、グリア細胞を撮影した。画像をデジタル化した後、NIH imageを用いて視神経断面積、視神経線維密度、グリア細胞密度、視神経線維断面積を計測し、総視神経線維数、横断面あたりのグリア細胞数を計算した。

倫理面への配慮

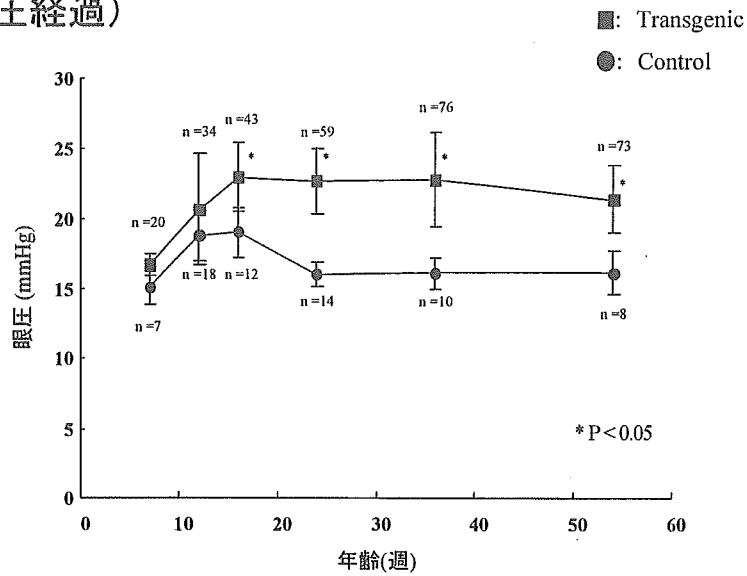
動物実験に際してはAssociation for Research of Vision and Ophthalmology (ARVO)決議を順守し十分な倫理的配慮を加えた。

3. 研究結果考察

トランスジェニックマウスの眼圧は、コントロールと比べ、生後4ヶ月頃から有意に上昇し始め、約4-7 mmHg（約30-40%）程度上昇していた。

図1

(眼圧経過)



collagen type Iトランスジェニックマウス、コントロールとしてwild typeマウスの視神経線維数を計測したところ、生後6ヶ月の視神経線維数に変化はみられず、生後1年のトランスジェニックマウスの視神経線維数の減少（約20%）がみられた。

図 2

(視神経繊維密度)

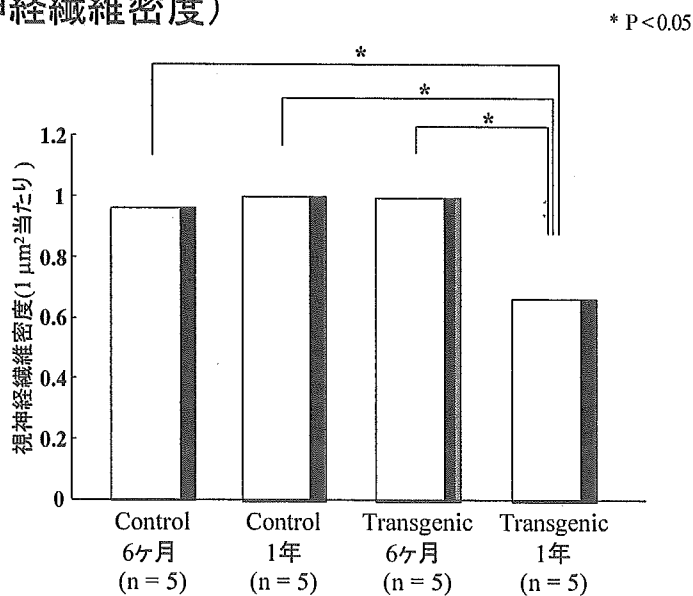
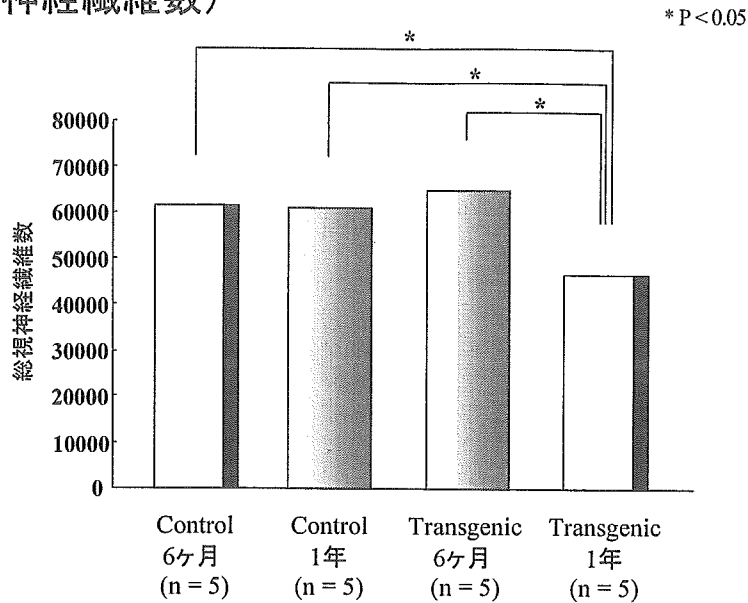


図 3

(視神経繊維数)



考察

このマウスモデルは、眼圧上昇も軽度で個体差が比較的少なく、開放隅角であること、マウス寿命が約2年であることを考えると視神経線維減少もゆっくりであることなど、開放隅角緑内障のモデルとして有用であると思われる。今後は、視神経障害機序の細胞レベルでの検討、現在可能性が示唆されている神経保護薬剤の効果判定に有用なモデルになると考えられる。しかし、マウス視神経鞘には、collagen type Iが分布しており、変異type I collagenが、眼圧上昇とは別に直接視神経線維減少に影響した可能性も否定できない。いずれにしてもcollagen Iが緑内障発症に重要な役割を果たしていることはまちがいない、これら関係を明らかにするためさらなる検討を行うべきであろう。

2-2急性高眼圧モデルマウス (レーザー高眼圧モデル)

研究方法：

当所属機関の相原らが作成したレーザーによる高眼圧マウスを用いた。

図 4



1) 電子顕微鏡組織切片による解析

視神経障害の有無、視神経線維障害パターン、視神経線維障害と視神経線維断面積の関係について以下のように検討した。

12週の眼圧測定の後、固定し視神経断面上方がわかるよう強膜の一部を残して視神経を取り出した。Epoxy Resin包埋した後、眼球後方300 μm の部分で視神経横断面切片を作成し、電子顕微鏡を用いて200倍にて視神経断面を、視神経断面より20カ所（中心4カ所、中間8カ所、周辺8カ所）を選び、10000倍にて視神経線維、グリア細胞を撮影した。画像をデジタル化した後、NIH imageを用いて視神経断面積、視神経線維密度、グリア細胞密度、視神経線維断面積を計測し、総視神経線維数、横断面あたりのグリア細胞数を計算した。

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。

3. 研究結果

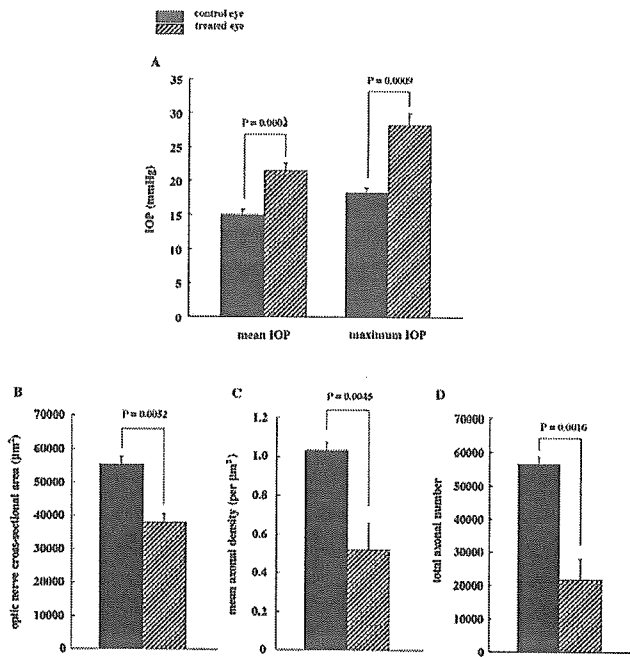


図 5.

レーザー高眼圧マウスの平均眼圧、最高眼圧はコントロール眼より44%、53%それぞれ有意に上昇していた（図 5 A）一方、高眼圧マウスの視神経の平均断面積、平均軸索密度、平均総視神経軸索数は、コントロール眼より29.9%、50.7%、60.5%それぞれ減少していた。（図 5 BCD）

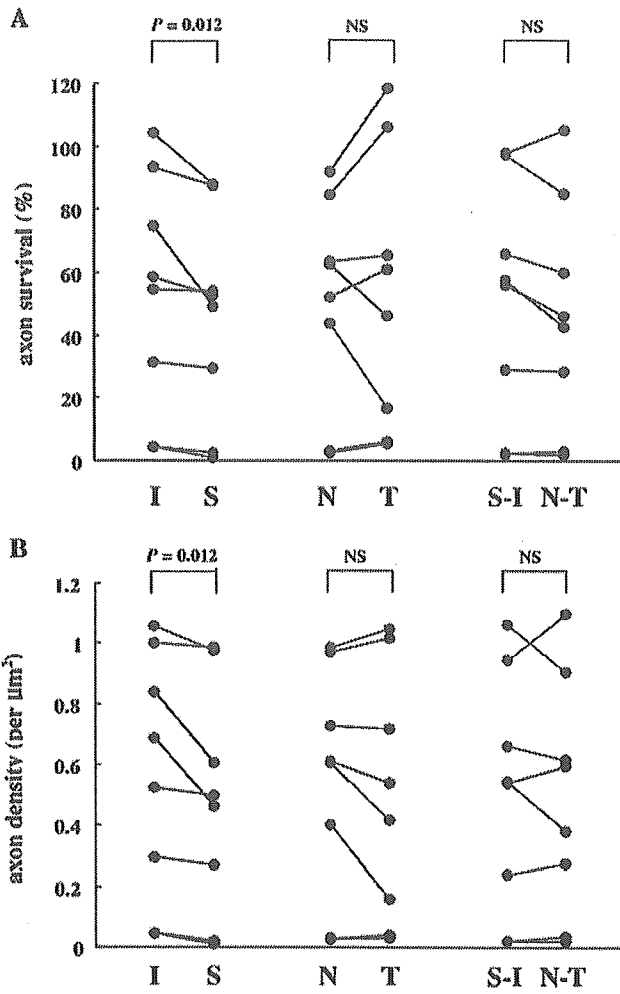


図 6

高眼圧マウス眼視神経断面において、上下耳側鼻側の4方向の視神経軸索の生存数と密度を比較検討したところ、上方は下方より有意に減少していることが判明した($P < 0.01$, 図6 AB)。

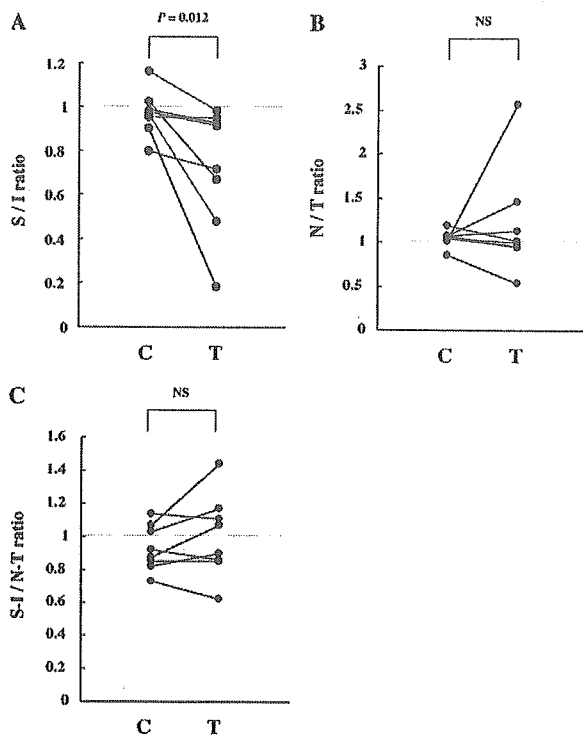
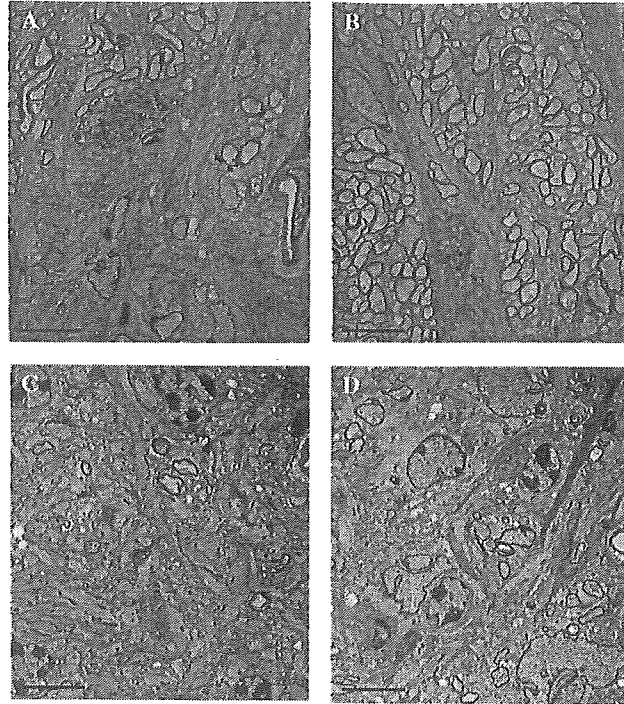


図 7.

また、高眼圧眼とコントロール眼において、下方に対する上方の視神経密度比を計算し比較したところ（図 7）、高眼圧眼において有意に密度比が低いことが判明した。また鼻側/耳側の視神経密度比、上下側/鼻側耳側の比も検討したが有意差はなかった。これは、元来上下の神経密度はほぼ等しいにもかかわらず、障害された際には特に上方が障害されや



すいことを示唆する。

図 8

このことは電子顕微鏡写真でも容易に観察することができた。(図 8 A, C, 上方、B, D, 下方、AB中等度障害、CD高度障害眼)

考察

レーザー高眼圧マウスでは視神経レベルで背側に強い神経障害が見られた。解剖学的には視神経レベルでの背側は視神経乳頭では乳頭周辺部に相当すると考えられるため、高眼圧により視神経乳頭周辺の繊維から特異的に障害される可能性が示唆された。また、マウスには篩板が無いにもかかわらず視神経障害が発生することは興味深い。部位特異性が発生する原因は、強膜に近いことによる神経の圧迫もしくは血管から遠位に位置することによる血流あるいは栄養因子欠乏が考えられるが、今後のさらなる検討を要する。

プロジェクト2. 緑内障性網膜神経細胞死の生体内観察系の確立

1. 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、一定の期間のうちに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。

2. 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)

マウス眼底撮影系一装置一



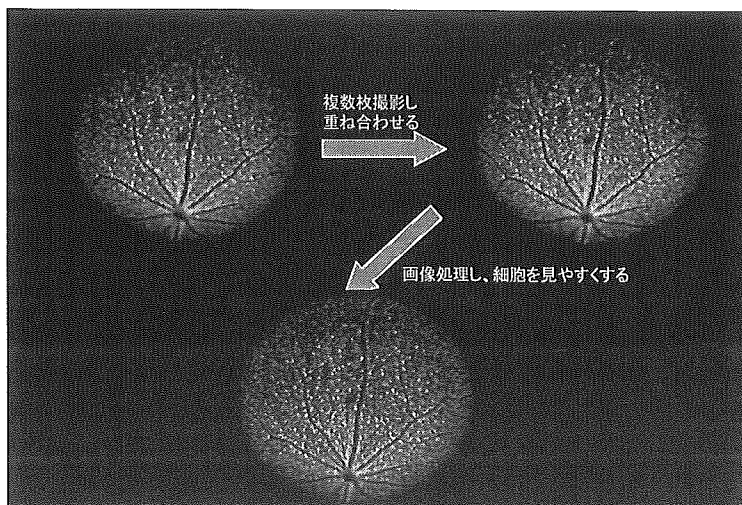
視神経挫滅モデルを用いた経時的神経細胞観察

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。

3. 研究結果

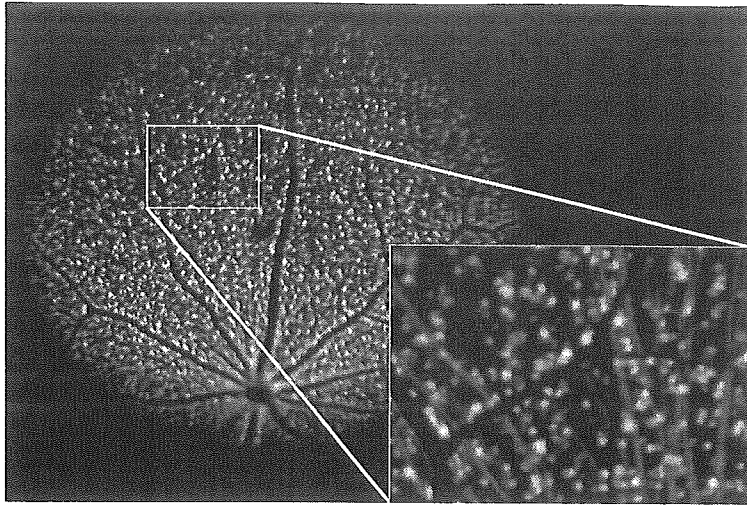
以下の図のような写真撮影が可能であった。線状に黒く抜けている部分が血管で、白点は個々の網膜視神経細胞を示す。

図 2



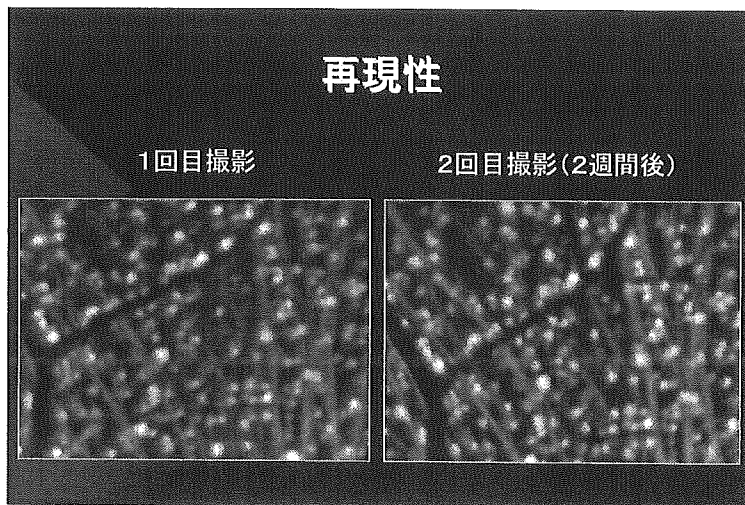
画像処理を行い、各細胞が鮮明に確認できた。

図 3



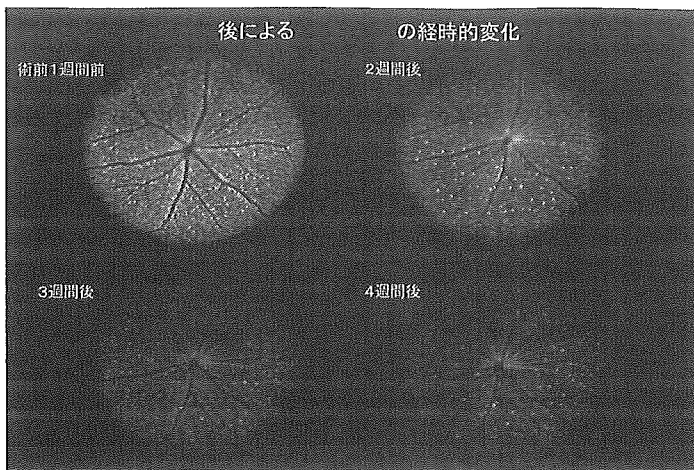
拡大しても各細胞を明瞭に観察することができる。

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。

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。

プロジェクト3. ラットの実験緑内障の確立

1. 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。

2. 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、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。

3. 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。

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。

プロジェクト4. 網膜神経節細胞(RGC)初代培養系を用いた低酸素負荷誘導神経細胞死に対する緑内障眼圧下降薬の眼圧非依存性神経保護効果の検討

1. 研究目的：

疫学的な緑内障の病型検討では、正常眼圧緑内障が特に日本人に多いことが判明しており、緑内障性視神経障害発症機序として眼圧非依存性因子の存在が示唆されている。現在使用されている緑内障点眼薬は眼圧下降作用の他、血流改善作用などにより、眼圧非依存性の神経保護効果を有する可能性がある。そこでRGC初代培養系において低酸素負荷による神経細胞死に眼圧下降薬であるβブロッカーが影響を与えるかを検討した。

2. 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無血清培地で培養した。最終濃度 10^{-8} M、 10^{-7} M、 10^{-6} Mのベタキシロール、ニプラジロール、チモロール添加後、酸素分圧可変型の培養器を用いて低酸素(5%)の負荷をかけ、37℃で12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。また、各種薬剤添加後、低酸素負荷時のカルシウムイメージング法を用いて細胞内カルシウム濃度を測定した。

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。

3. 研究結果

コントロール生存率51.5%に対し、ベタキシロール 10^{-8} M、 10^{-7} M、 10^{-6} M

では51.5, 58.3, 60.5% (図1)、ニプラジロール 10^{-8} M、 10^{-7} M、 10^{-6} Mでは57.4, 58.8, 60.5% (図2)、チモロール 10^{-8} M、 10^{-7} M、 10^{-6} Mでは55.0, 57.1, 58.0% (図3)の生存率であり3種薬剤共に濃度依存的な生存率改善効果を示した (n=7)。 10^{-7} M、 10^{-6} Mでは3種薬剤ともに有意、 10^{-8} Mにおいてはニプラジロールのみ有意な生存率改善効果を示した (p<0.05)。各薬剤添加後の細胞内カルシウム濃度は有意な変化は見られなかった。

図1

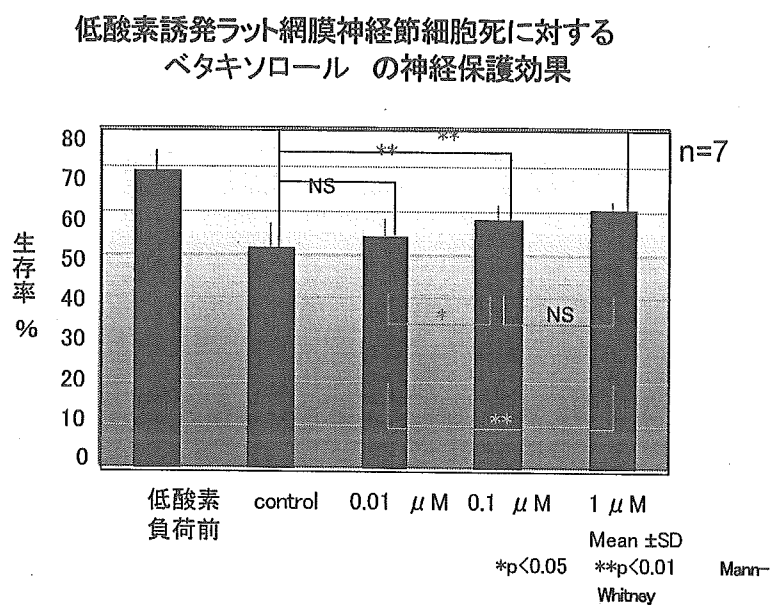


図2