

低酸素誘発ラット網膜神経節細胞死に対する  
ニブラジロールの神経保護効果

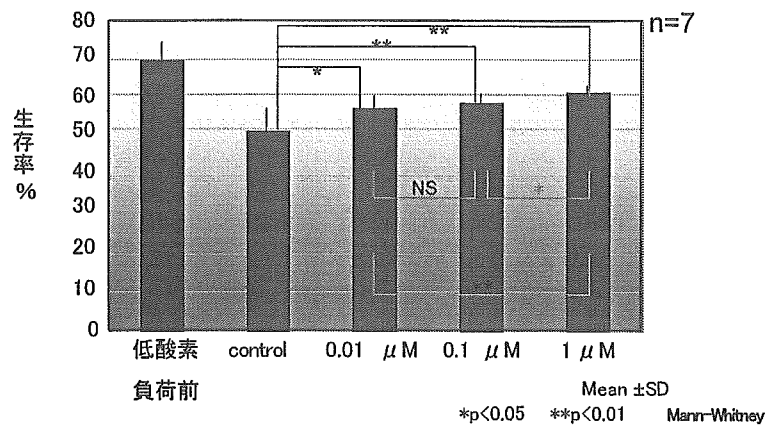


図 3

低酸素誘発ラット網膜神経節細胞死に対する  
チモロールの神経保護効果

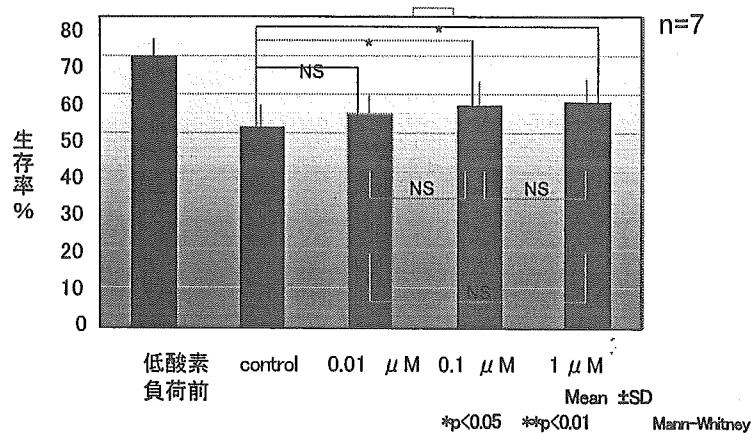


図 4

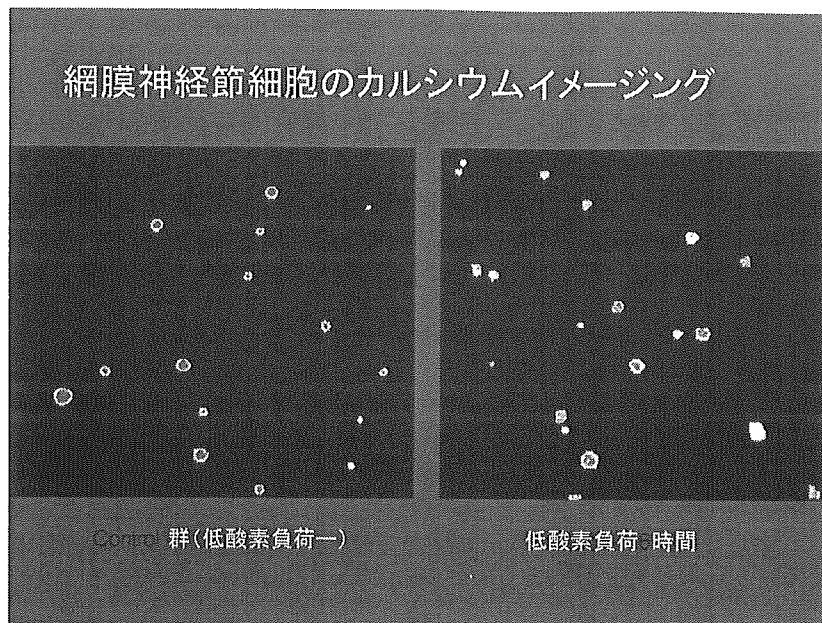
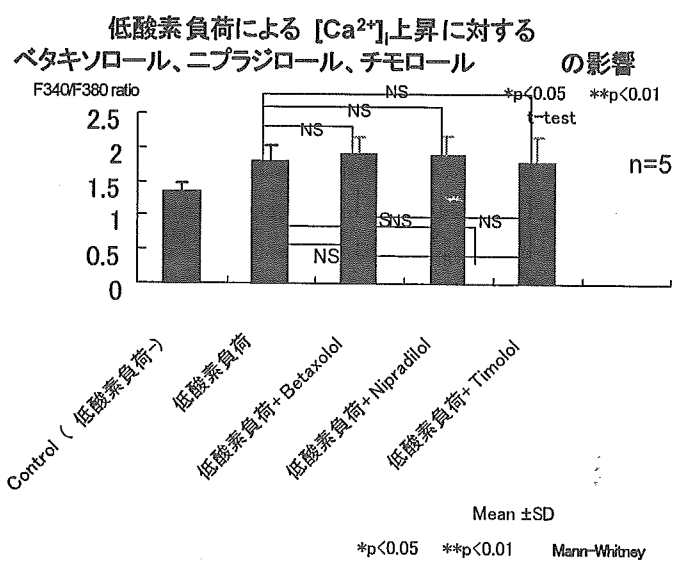


図 5



考察:

ベタキソロールは弱いカルシウムチャネル拮抗作用があり、またニプラジロールはNO放出により、神経保護作用を呈する可能性があるが、今回チモロールも含め各薬剤低酸素負荷に対し同等の神経保護作用を呈した。直接的な $\beta$ ブロッカーの作用は現在のところ判明せず今後の検討を要する。点眼により十分量が後眼部に到達することが判明すれば、眼圧下降作用以外の神経保護作用も期待できることが示唆された。

## プロジェクト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

### 1. 研究目的：

緑内障の最終病態はRGCのapoptosisであるが、細胞内カルシウムの上昇に伴う神経細胞死が大きな役割を果たしている可能性がある。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カルシウムチャンネル拮抗薬がどのような影響を与えるかを検討した。

### 2. 研究方法：

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のイガニジピン、ニモジピン、ロメリジン添加後、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°C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44.1%に対し、イガニジピン $10^{-8}$ M、 $10^{-7}$ M、 $10^{-6}$ Mでは50.0, 54.5, 54.5%、ニモジピン $10^{-8}$ M、 $10^{-7}$ M、 $10^{-6}$ Mでは49.3, 53.0, 55.4%、ロメリジン $10^{-8}$ M、 $10^{-7}$ M、 $10^{-6}$ Mでは43.

7, 49.1, 57.6%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<sup>-7</sup>M、10<sup>-6</sup>Mでは3種薬剤ともに有意な生存率改善効果を示した。各薬剤添加後の細胞内カルシウム濃度はコントロールと比べ低い傾向を示した。(図1, 2)

考察

カルシウムチャンネル拮抗薬は、in vitro低酸素負荷ラット網膜神経節細胞において神経保護効果を呈したことにより、直接的な神経保護作用を有すると考えられる。詳細は今後の検討を要するが、カルシウムの細胞内濃度の抑制が作用機序の一部となっていると考えられる。後眼部においてカルシウムチャンネル拮抗薬が有効濃度に達すれば、虚血などの循環不全に起因する神経細胞死を直接抑制する可能性が示唆された。

図1

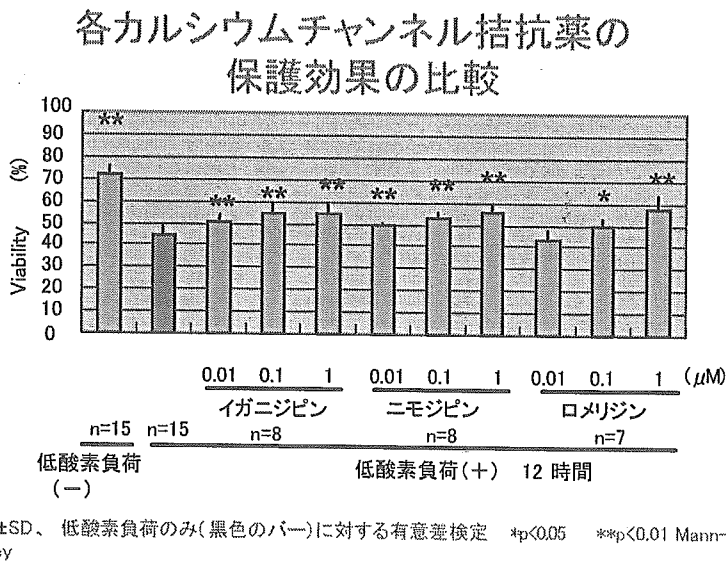
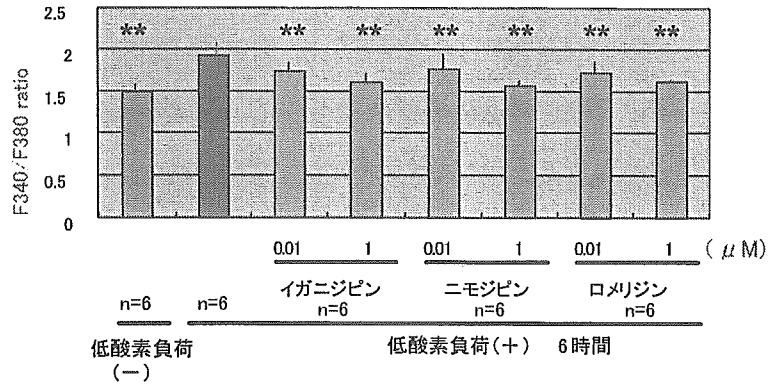


図2

## 低酸素負荷による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に対する 各カルシウムチャンネル拮抗薬の影響



Mean  $\pm$ SD 低酸素負荷のみ(黒色のバー)に対する有意差検定 \*\*p<0.01 Mann-Whitney

## プロジェクト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

### 1. 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。

### 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B27添加物、神経栄養因子およびフォルシュ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 rutinose (Krt),  $10^{-8}$ 、 $10^{-9}$ 、 $10^{-10}$ M、 $10^{-11}$ のquercetin rutinose (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。

### 3. 研究結果

培地交換 1 日後、RGC生存率は、無添加群で44.4±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( $P<0.05$ )。

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

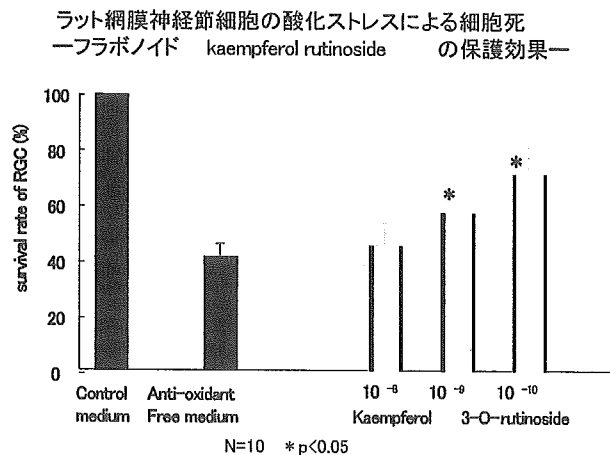


図 2

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—

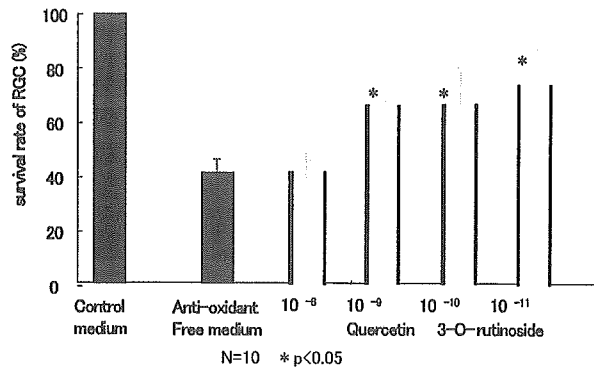
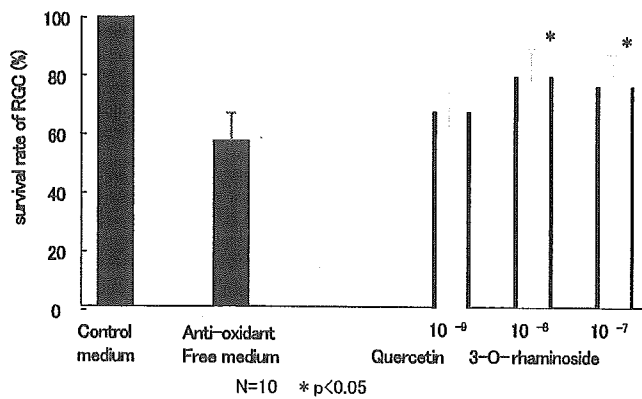


図 3

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—



## プロジェクト7. グリア系ミユラー細胞における神経栄養因子の発現解析

1. 研究目的：ミユラー細胞では神経栄養因子の発現が示唆され、RGCなどの神経細胞死に対する保護効果を有する可能性がある。今回我々は、ラット培養ミユラー細胞を用いて、緑内障治療薬であるブナゾシン、チモロール、ベタキソロール、カルシウム拮抗剤であるイガニジピンによる神経栄養因子の発現について検討した。

2. 研究方法：37℃、20%O<sub>2</sub>、5%CO<sub>2</sub>の条件で培養したラットミユラー細胞初代培養系を用いた。薬剤非添加群をコントロールとし、最終濃度として10<sup>-7</sup>M、10<sup>-8</sup>M、10<sup>-9</sup>Mになるように、ブナゾシン、チモロール、ベタキソロール、イガニジピンをそれぞれ添加し、6時



間培養した後RNAおよび蛋白を抽出した。定量PCRおよびWestern blot法を用いてBDNF, CNTF, GDNFの発現の変化をコントロールと比較検討した。またカルシウムイメージング法を用いて作用機序の検討も行った。

### 3. 研究結果

結果：定量PCRでは、コントロール群と比較して、ブナゾシン添加群とチモロール添加群では、神経栄養因子の発現に変化は見られなかった。10<sup>-7</sup>M、10<sup>-8</sup>Mベタキソロール添加群ではコントロールと比較して、BDNF、CNTF共に有意に増加したが (p<0.05)、GDNFは有意な発現の変化はみられなかった。10<sup>-7</sup>M、10<sup>-8</sup>Mイガニジピン添加群では、BDNF、CNTF、GDNF共に有意に増加した (p<0.05)。Western blot法では、ブナゾシン、チモロール添加群では変化は見られなかったが、ベタキソロール、イガニジピン添加群では、BDNF、CNTFともに有意な発現の増加が見られた (p<0.05)。ベタキソロールではカルシウム拮抗作用は見られなかった。

### Results (quantitative RT-PCR)

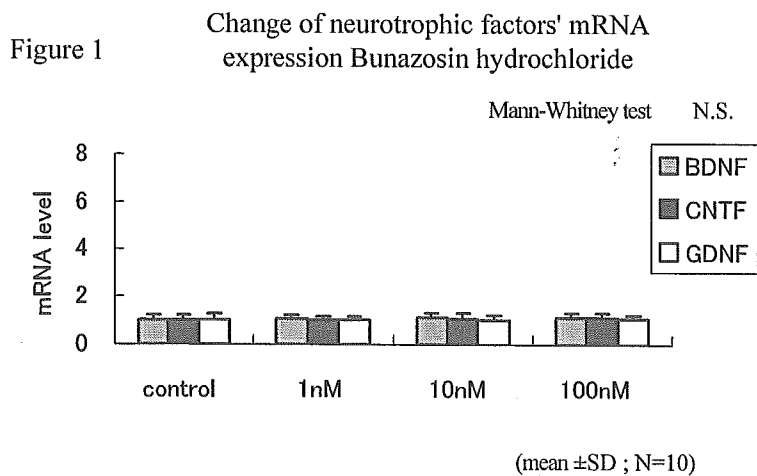


Figure 2  
 Change of neurotrophic factors' mRNA  
 expression by timolol maleate (mean±SD ;  
 N=10)

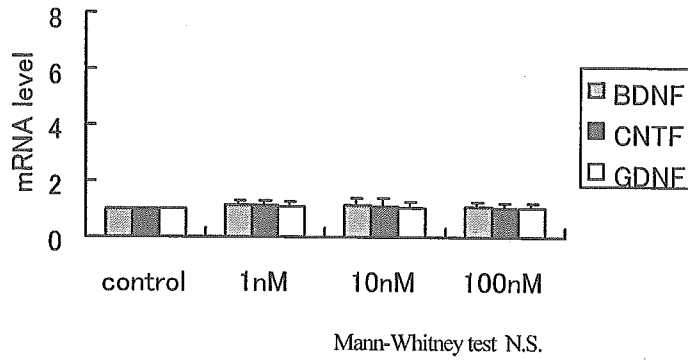


Figure 3  
 Change of neurotrophic factors' mRNA  
 expression by betaxolol (mean±SD ; N=10)

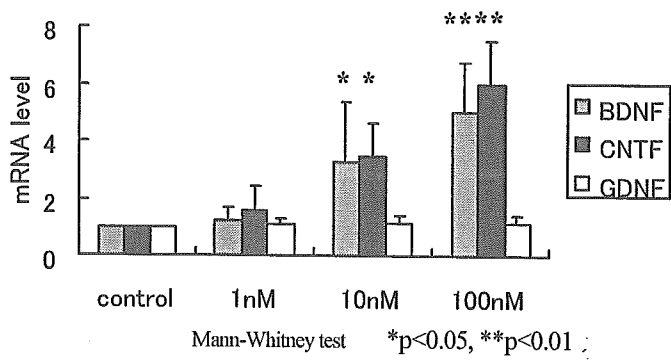
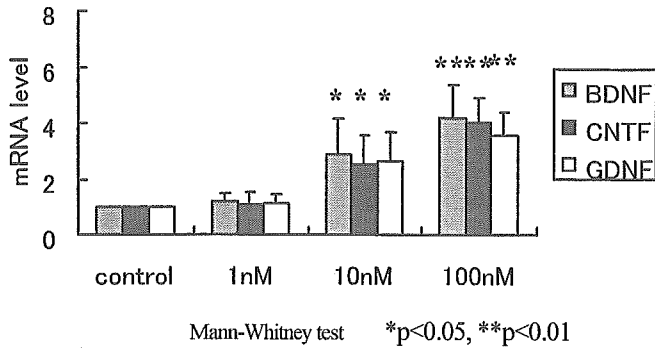


Figure 4  
Change of neurotrophic factors' mRNA expression by iganidipin hydrochloride (mean±SD ; N=10)



Results (western blot)

Figure 5  
Change of BDNF protein expression

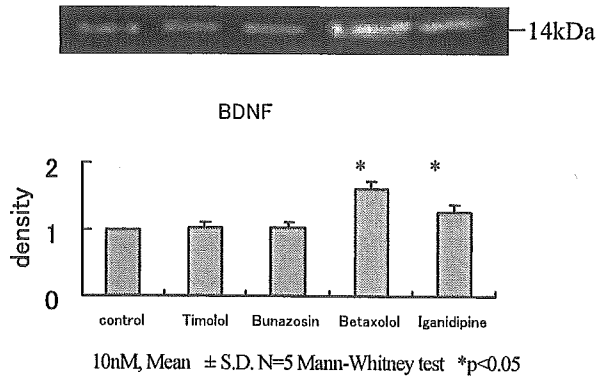


Figure 6  
Change of CNTF protein expression by addition of drugs (10nM) (Mean ± S.D. N=5)

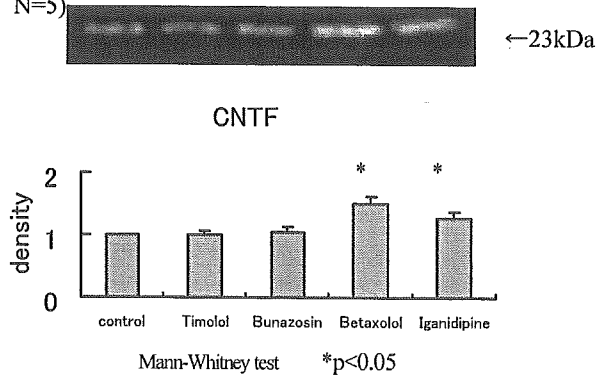


Figure 7 Change of GDNF protein expression by addition of drugs (10nM) (Mean  $\pm$  S.D. N=5)

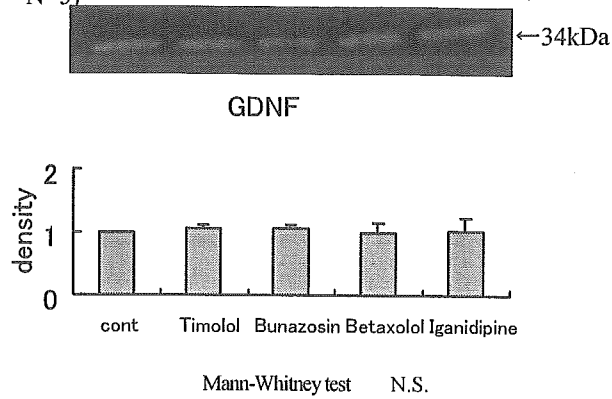
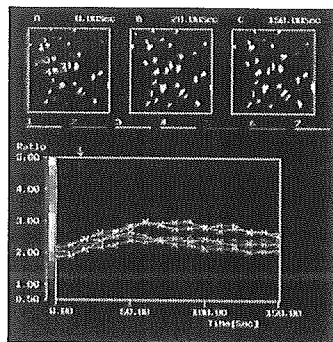
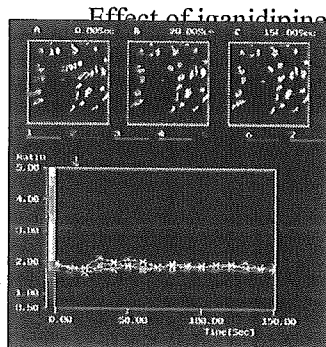


Figure 8 Kainate-induced  $[Ca^{2+}]_i$  increase in muller cells  
Effect of Betaxolol



Kainate-induced  $[Ca^{2+}]_i$  increase was not affected by pretreatment with betaxolol (10nM).

Figure 9 Kainate-induced  $[Ca^{2+}]_i$  increase in muller cells  
Effect of iganidipine



Pretreatment with iganidipine (10nM) blocked kainate-induced  $[Ca^{2+}]_i$  increase.

## 考察

$\alpha 1$ ブロッカーであるブナゾシンと $\beta$ ブロッカーであるチモロールは BDNF, CNTF, GDNF の発現誘導に影響を及ぼさなかった。一方同じく $\beta$ ブロッカーであるベタキソロールと膜電位依存性L型カルシウムチャネル阻害剤のイガニジピンは、発現を増加させた。従ってベタキソロールは $\beta$ ブロッカー作用以外の機序により直接細胞に作用している可能性が示唆された。ベタキソロールはイガニジピンの主要な作用であるカルシウムイオン流入阻害作用は示さなかった。

従って、ベタキソロールは $\beta$ ブロッカー作用やカルシウムチャネル阻害作用とは異なる作用機序で、ミユラー細胞からの神経栄養因子の発現に関与している可能性がある。

## プロジェクト8: 網膜幹細胞・前駆細胞の取得法と性状の検討

### A. 研究目的

緑内障における既に存在する視神経萎縮に対しては、神経保護治療の効果は限定される可能性が高い。このため、失われた網膜ニューロンの再生の可能性について検討を加えることで、緑内障患者のうち最も悲劇的な状況にある患者に対する治療法の確立を目指す目的で幹細胞を用いたRGC再生の検討を行った。これらの神経保護及び再生治療は、正常眼圧緑内障患者だけでなく全ての緑内障患者の視機能保持に有効であることが期待され、結果として、緑内障による失明者の減少、緑内障患者の社会生活能力維持に貢献することが予想され、国民の医療・保健・福祉の向上ならびに国民医療費・国民福祉経費の削減に寄与するものと考えられる。

### B. 研究方法

#### ・家兔網膜前駆細胞の性状解析

2000年にマウス毛様体上皮細胞より、網膜幹/前駆細胞がニューロスフェア法を用いて同定された。その方法に準じて白色家兔より網膜幹/前駆細胞を取得し、性状を解析した。白色家兔の眼球を虹彩上皮、感覚網膜、網膜色素上皮および毛様体上皮に分離し、酵素処理により単一細胞

に単離し、細胞増殖因子を添加した培地にて浮遊細胞系で培養し、スフェアと呼ばれる球状塊を形成させた。形成されたスフェアを再度単一細胞に分化し、継代可能であるか観察した。血清を添加した分化条件下で培養を行い、免疫染色およびRT-PCR法にて分化能を検討した。また、各スフェアを別々のwellで分化させ、それぞれの神経系、グリア系への分化能を検討した。

#### ・骨髄間葉系幹細胞移植による網膜変性抑止効果の検討

RCS rat (4週齢)の左眼網膜下腔に、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、経強膜的に移植した。右眼には対照として、PBSを同様に網膜下腔に注入した。移植後2, 4, 8週に眼球摘出し、外顆粒層の細胞数を計測し、網膜変性を組織学的に評価した。また、細胞移植後5および8週の網膜機能をERGを用いて、電気生理学的に評価した。

(倫理面への配慮)

すべての実験における動物の取り扱い、Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) で決められたガイドラインおよび東京大学の動物実験施設のガイドラインに準じて行った。

### C. 研究結果及び考察

#### ・家兔網膜前駆細胞の性状解析

白色家兔毛様体上皮細胞よりのみ、スフェアと呼ばれる球状塊が形成された。形成されたスフェアのうち13.6%が再度スフェアを形成した。また、スフェアを分化条件下で培養すると、各種網膜細胞の分化マーカーを発現する細胞に分化した。各スフェアそれぞれの分化能を検討すると、神経系あるいはグリア系のマーカーのみ発現したスフェアは、それぞれ5.6%、68.7%で、両方のマーカーを発現したスフェアは23.0%であった。毛様体上皮細胞よりスフェア法によって得られた網膜幹/前駆細胞のうち約2割が、多分化能を有し、自己複製能を持つ、より未分化な網膜幹/前駆細胞と考えられたが、残りの8割は限られた分化能および増殖能しか持たない網膜前駆細胞と考えられた。

#### ・骨髄間葉系幹細胞移植による網膜変性抑止効果の検討

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。

## E. 結論

本研究では、これまでに解析が進んでいなかった網膜幹細胞の性状解析を行い、変性疾患モデルにおいて網膜下への細胞移植療法の可能性を示した。今後、緑内障モデルを用いた解析により、本研究で得られた知見が緑内障においても有用であるか否かを検討する価値があると考えられた。

F. 健康危険情報:特記すべき事なし。

## G. 研究発表

### 1) 国内

口頭発表 1件

そのうち主なもの

学会発表

井上裕治ら、ウサギ成体網膜前駆細胞の単一クローンレベルでの解析、第108回日本眼科学会総会、東京、2004

### 2) 海外

原著論文による発表 2件

そのうち主なもの

論文発表

Inoue Y, Yanagi Y, Tamaki Y, Uchida S, Kawase Y, Araie M, Okochi H. Clonogenic analysis of ciliary epithelial derived retinal progenitor cells in rabbits. *Exp Eye Res.* 2005、 43 7-45.

Yanagi Y, Inoue Y, Kawase Y, Uchida S, Tamaki Y, Araie M, Okochi H Properties of growth and molecular profiles of rat progenitor cells from ciliary epithelium. *Exp Eye Res.* 2006, 471-478

#### 4. 評価 (研究成果)

##### 1) 達成度について

- 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
- マウス神経細胞死の生体内観察法
- 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
- 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
- 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

以上5項目に関してはいずれも目的に充分達した研究ができ、いずれも論文作成に至り、現時点で4報は既に論文発表され、他の内容についても学会発表も終了している。しかし、ラットの実験緑内障の確立は達成出来なかった。海外で行われている方法の追試を試みたが、いずれも十分な効果を得ることが出来なかった。

##### 2) 研究成果の学術的意義について

高眼圧モデルマウスは当研究室の独創的な仕事であり、今後の発展性が期待出来る分野である。眼圧測定も含め緑内障へマウスを応用することは、今後の緑内障基礎研究の発



展への貢献度は非常に高いと考えられる。また、マウス視神経細胞のin vivo経時的な観察は世界で初めての実験手技であり、神経細胞障害の評価と神経保護の評価に対して将来有用なツールとなることが期待され、眼科領域だけでなく神経科学の分野にも広く応用出来ることから学術的価値が高いと考えられる。

3) 研究成果の行政的意義について 特になし

4) その他特記すべき事項

マウス眼圧測定方法および経時的網膜神経節細胞評価方法は実験方法として評価が高く、学会発表での反響により、すでに技術習得の問い合わせがある。マウス眼圧測定については特に薬剤開発に貢献出来る簡便なスクリーニング系として有用であり製薬会社からの技術委譲要請がある。健康危険情報については特記すべきことなし。

## 5. 結論

①Coll1a1 r/rは高眼圧により視神経障害を来すことが判明した。高眼圧の経過と視神経萎縮の経過より慢性緑内障モデルとして有用であると考えられる。

レーザー高眼圧マウスでは部位特異的な障害パターンが存在し、ヒトでの神経障害パターンを解明するために適当なモデルであると考えられた。

②RGC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。

③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。

④今回検討した3種類の交感神経作動眼圧下降薬は低酸素負荷に対するラット網膜神経節細胞死を軽減させた。交感神経作動性眼圧下降薬は眼圧下降効果以外に網膜神経節細胞に直接作用し低酸素による細胞死を抑制する可能性が示された。従って眼圧下降以外にも臨

床投与の際に付加価値が存在すると考えられる。

⑤イガニジピン、ニモジピン、ロメリジンは低酸素誘発ラット網膜神経節細胞死に対して直接的な保護効果を示した。カルシウムチャネル拮抗薬は神経保護薬としての将来性が高いと考えられる。

⑥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。

⑦ベタキソロールとイガニジピンはラット培養ミューラー細胞においてBDNF、CNTFを有意に増加させた。神経栄養因子の発現の増加が認められたことによりミューラー細胞を介した網膜神経保護効果の可能性が示唆された。

## 6. 研究発表

### 1) 国内

口頭発表 20件

原著論文による発表 0件

それ以外の発表 0件

### 学会発表

平成15年9月 第14回日本緑内障学会

- マウスの高眼圧緑内障モデルの作成と緑内障研究への応用
- マウス高眼圧モデルにおける視神経障害の評価
- 低酸素誘発ラット網膜神経節細胞死に対するイガニジピンの神経保護効果
- 薬剤添加による培養ラット網膜ミューラー細胞の神経栄養因子の発現

平成16年4月日本眼科学会総会

- 薬剤添加による培養ラット網膜ミュラー細胞の神経栄養因子の発現
- 低酸素負荷ラット網膜神経節細胞死に対する緑内障点眼薬の影響
- マウスにおけるウノプロストンの眼圧下降効果
- マウス緑内障モデルにおける選択的視神経障害
- 低酸素負荷ラット網膜神経節細胞死に対するカルシウムチャンネル拮抗薬の影響

平成16年7月 第7回ophthalmoneuroprotection

- 低酸素負荷ラット網膜神経節細胞死に対するニブラジロールの神経保護効果及びその作用機序の推測

平成16年9月 第15回日本緑内障学会

- 網膜神経節細胞自発蛍光マウスを用いた視神経障害モデルにおける網膜神経節細胞障害評価
- マウスにおけるプロスタグランジン系薬剤の眼圧下降効果
- 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

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

平成18年4月 第110回日本眼科学会

- 視神経挫滅モデルを用いた生体内網膜神経節細胞の経時的変化の測定
- 酸化ストレスとフラボノイド

2) 海外

口頭発表 8件

原著論文による発表 5件

それ以外の発表 0件

学会発表

2003年5月 ARVO meeting Florida USA.

- Lomerizine, a Ca<sup>2+</sup> Channel Blocker, Reduces Hypoxic Damage in Purified Retinal Ganglion Cells
- Neurotrophic Factors' mRNAs and Proteins Are Up Regulated by Betaxolol and Calcium Channel Blocker in Cultured Muller Cell

2004年5月 ARVO meeting Florida USA.

- Neuroprotective Effect of Beta-adrenergic blockers on Hypoxic Damage in Purified Retinal Ganglion Cells
- Effects of Beta-Blocker Drugs on Hypoxic Damages in Purified Retinal Ganglion Cells
- Expression of neurotrophic factor by anti-glaucomatous drugs and calcium channel blocker in