

別添1

厚生労働科学研究 研究費補助金

感覚器障害研究事業

日本人の緑内障に対するより有効な予防と治療
臨床的・基礎的エビデンスの確立

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 新家 眞

平成20(2008)年 4月

目 次

I. 総括研究報告	
日本人の緑内障に対するより有効な予防と治療 臨床的・基礎的エビデンスの確立	2
新家 眞	
II. 分担研究報告	
1. Latex microspheresの前房内注入による小動物慢性眼圧上昇モデルの作製とヒト視神経乳頭部の結合組織線維及びグリア細胞ネットワークの観察	23
阿部春樹	
2. 疫学データに基づく狭隅角眼の眼球構造の解析とリスクファクターの検討	30
澤口昭一	
3. 網膜神経細胞死における小胞体ストレスの関与	37
原 英彰	
4. 緑内障性網膜神経障害に対する新規治療薬の開発と新規眼圧測定原理の確立	46
金本尚志	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	50
IV. 研究成果の刊行物・別刷	52

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）総括研究報告書

日本人の緑内障に対するより有効な予防と治療 臨床的・基礎的エビデンスの確立

主任研究者 新家 眞 東京大学教授

研究要旨

我が国の緑内障患者は他国に比べ特徴的な諸点を有するが、その多くは既存の欧米中心の緑内障研究ではカバーされていない。本研究は「日本人の緑内障」の様々な病型・病期に応じた適切且つより有効な予防及び治療の指針を確立することを目的に、眼圧の低い正常眼圧緑内障、近視を伴った視神経乳頭形状、閉塞隅角緑内障の眼球構造、後期緑内障等に関する多施設大規模研究と日本人の緑内障の治療に直結し得る基礎研究を行うものである。平成18年度には、各研究の初年度として以下の成果を得た。

分担研究者氏名・所属機関名及び所属機関における職名

阿部春樹・新潟大学・教授

澤口昭一・琉球大学・教授

原 英彰・岐阜薬科大学・教授

金本尚志・広島大学・講師

A. 研究目的

我が国において緑内障は、中途失明原因1位の眼疾である。本邦の緑内障には①正常眼圧緑内障（normal-tension glaucoma、以下NTG）の有病率が高い。②近視乳頭など視神経乳頭変形例が多い。③欧米に比べ閉塞隅角緑内障（PACG）も多い、などの特徴がある。これらは既存の欧米中心の緑内障研究の成果を直接適応できないことが多い。一方、緑内障はいくつかの病型があり、各々に経過・予後が大きく異なるため、個々の患者の病型・病期を正確に診断し、最適な治療法を選択することが重要である。本研究では、これまでの緑内障研究に欠けていた「日本人の緑内障」に対するより科学的且つ実証的な診療指針と治療法を確立し国民医療に還元することを目的に、臨床的、基礎的な両面から以下の検討を行う。

(1)眼圧が正常平均値より低いNTG患者の臨床像と治療に関する前向き研究

NTG患者が欧米では少ないこともあり、眼圧が正常平均値より低い患者の臨床像や治療に関するエビデンスはこれまで皆無である。これについての研究が可能なのは患者数の多い日本のみである。そこでそのような患者を対象に前向きコホート研究を行い進行に関連する因子等の検討し、より有効な治療法の確立を目指す。

(2) 近視乳頭を合併した正常眼と緑内障の視神経乳頭形態の三次元的解析と緑内障スクリーニング法の開発

視神経乳頭の評価は緑内障の診断・評価に必須である。日本人に特に多い近視を伴った正常眼、緑内障の症例を多数集積し、近視眼乳頭形状の特徴を定量的に検討するとともに、近視眼でも有効な新しい緑内障スクリーニング法を開発する。

(3) 後期緑内障の臨床像と予後に関連する因子の検討

日常生活上の不都合をきず後期から末期の緑内障患者の臨床像を正しく把握することは、国民生活福祉上からも重要性が高い。約300名の後期緑内障患者の臨床像についての横断的研究と、それに引き続く前向きコホート研究を行い、緑内障患者の社会生活能力維持に必要な要素を検討する。

(4) 分子生物学的研究及び緑内障動物モデル研究

本邦におけるNTGの重要性に鑑み、その有効且つ新規の治療に直結し得る最新の分子生物学的手法や緑内障モデル動物を用いた検討を行う。

B. 研究方法

(1) 眼圧が正常平均値より低い正常眼圧緑内障 (NTG) 患者の臨床像と治療に関する前向き研究

眼圧が、正常日本人平均値 (15 mmHg) より低いNTG患者約150人を対象に、観察期間3年間の前向きコホート研究を行う。具体的には、エントリー時に全身因子、眼局所因子の詳細な調査を行った後、視野、視神経乳頭の変化を中心とした前向きな観察を3年間行う。研究の概要は下記の通り。

<研究計画の概要>

1. 目的

多治見スタディの結果、本邦では正常眼圧緑内障 (NTG) の有病率が他国に比べ明らかに高いことが明らかとなった¹⁾。NTG、特にベースライン眼圧が正常平均値よりも低い (15 mmHg以下) のNTGに関しては、欧米などで患者数が非常に少ないこともあり、その臨床像や有効な治療法に関しての確立した知見はないのが現状である。そこで、ベースライン眼圧が正常平均値以下のNTG患者を対象に、多数患者の経時的変化を含めた臨床像を明らかにするとともに、

視野障害進行に関与する眼局所及び全身的なリスクファクターを検討することを目的に、国内の多施設において前向きコホート研究（予定患者数約150名、観察期間3年間）を行う。

Primary endpointはGlaucoma Progression Analysis (GPA) に基づき決められる視野障害進行の発生とし、それに関与する因子を同定する。

2. 対象

以下の基準を全て満たす原発開放隅角緑内障患者

- 1) 年齢：同意取得時、20歳以上かつ70歳以下。
- 2) 眼圧：両眼とも、眼圧下降剤未使用下、あるいは眼圧下降剤中止後4週間以上経過後、6か月以内の異なる日に測定された5回以上の眼圧のうち、1回の測定を除き最高値が15 mmHg以下。いずれの時点においても、眼圧測定値は常に21 mmHg以下とする。
- 3) 視野障害の程度：両眼のMDが-15 dBより良好。

除外基準

- 1) 等価球面値が-9.0 D未満または+9.0 D以上の眼。
- 2) 対象眼の最高矯正視力が0.8未満。
- 3) 内眼手術（レーザー含む）の既往眼。
- 4) 視野障害に影響を与える白内障がある眼。→ 白内障スコア分類（LOCS III、Arch Ophthalmol 1993;111 (6):831-6）により評価。
- 5) カルシウム拮抗薬などの血圧降下薬や、高コレステロール治療薬などの組織保護作用を持つ可能性がある薬剤の投与を受けている者。
- 6) 高血圧、糖尿病などの全身疾患を有するもの（患者の自己申告にもとづき、治療の有無は問わず）。

3. 経過観察

両眼に対し、3ヶ月に1回の眼圧測定・視野検査ならびに6ヶ月に1回の視神経乳頭撮影を少なくとも3年間継続する。経過観察期間中に視野又は視神経乳頭に緑内障進行が認められた場合には、眼圧下降治療を開始するが、治療開始後も上記と同様な経過観察を継続する。

4. 予定登録数と研究期間

予定登録数：150例。

登録期間：2年。

追跡期間：登録終了後3年。

総研究期間：5年。

(2) 近視乳頭を合併した正常眼と緑内障の視神経乳頭形態の三次元的解析と緑内障スクリーニング法の開発

近視の正常眼及び緑内障について、眼軸長、視神経乳頭形状解析（ステレオ眼底写真、共焦点レーザー顕微鏡、レーザー網膜神経線維層厚解析装置）の多数例データ（計400例程度）を集積、解析する。近視眼視神経乳頭形状の特徴を定量的に検討するとともに、非近視眼を主たる対象として開発された従来の緑内障判別プログラムなどの近視眼での妥当性を検討し、近視眼にも適応可能な新しいプログラムを開発する。

また、既存の近視眼を含む正常人及び緑内障の共焦点レーザー顕微鏡の測定結果を用いて、共焦点レーザー顕微鏡HRT IIに新規搭載されたソフトウェアであるGlaucoma Probability Scoreの日本人緑内障眼における緑内障判別力及び緑内障正視神経障害評価能を評価し、近視など屈折異常の影響を検討する。

新しい光干渉断層計であるスペクトラル・ドメインOCTの正常人及び緑内障眼のデータを集積し、新規の緑内障診断プログラムを開発する。

(3) 後期緑内障の臨床像と予後に関連する因子の検討

後期緑内障患者約300人の既往、現症を調査し、視野、視神経乳頭形状等のデータを集積し、後期緑内障の臨床像の特徴を検討する。その後、視野、視力測定等を定期的に前向きに行い、視野進行、QOL低下に関与する因子についての前向きコホート研究を行う。

(4) 緑内障動物モデルおよび分子生物学的研究

4. *in vitro*ラット網膜神経節初代培養系を用いた β 遮断薬による酸化ストレスによる細胞死抑制効果とそのシグナルの解明

1. 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。抗酸化剤を除去した培地に交換することで酸化ストレス負荷をかけ、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。

2. 酸化ストレスによる細胞死のパターンをアポトーシス、ネクローシス検出法を用いて検討した。（図

1)

3. 酸化ストレスによる細胞死に対するネクロシスシグナルの関与の可能性を考え、ネクロシス誘導蛋白プロテアーゼの阻害薬、cathepsin B proinhibitor (E-64-d)およびthiol protease inhibitor (Ca-074 Me)を用いて、細胞死が抑制可能かを検討した。

4. 酸化ストレスによる細胞死のシグナルを検討するためにbax inhibiting peptide (BIP)を用いてbax経路のミトコンドリア経路が関与しているかを検討した。

5. 最終濃度 $10^{-8}M$ 、 $10^{-7}M$ 、 $10^{-6}M$ のベタキソロール、ニプラジロール、チモロール、カルテオロール添加後の細胞死の抑制効果は無添加群と比較検討した。

C. 研究結果

1. 眼圧が正常平均値より低い正常眼圧緑内障 (NTG) 患者の臨床像と治療に関する前向き研究

平成19年度までに、全国11施設による多施設研究グループを組織し、研究プロトコール(資料)を完成し、各施設の倫理委員会の承認を得た後に研究を開始した。2008年4月現在、約30名の患者のエントリーが済んでいる。今後、エントリーを続けると共にエントリー済み患者の経過観察を確実に実行していく予定である。

2. 近視乳頭を合併した正常眼と緑内障の視神経乳頭形態の三次元的解析と緑内障スクリーニング法の開発

平成19年度には、正常人及び緑内障患者の眼軸長、視神経乳頭形状解析(光干渉断層計、ステレオ眼底写真、共焦点レーザー顕微鏡、レーザー網膜神経線維層厚解析装置)のデータ正常人データを用いて各種解析を行った。また、新しい光干渉断層計であるスペクトラル・ドメインOCTを用いて新しい緑内障診断プログラムを開発し、その有用性を検討した。

(2) -1 まず共焦点レーザー顕微鏡(HRT)の新しい解析ソフトウェアであるGlaucoma Probability Score (GPS)の日本人緑内障患者における有用性を近視眼の影響を含めて検討した。

対象:

対象は、148名148眼の早期開放隅角緑内障患者(Mean deviation > -5 dB)と、それに年齢と屈折異常をマッチさせた正常人148名148眼である。GPSの判定結果などをHRTに既存のプログラムであるMoorfields Regression Analysis (MRA)とFSM discriminant function (FSM)と比較した。

表 1. 対象者の背景データ。

	Open-angle glaucoma (148)	Normal subjects (N) (148)	P-value*
Male/Female	78/70	67/71	0.6
Age (years)	57.8±9.4	57.9±9.6	0.9
Best Corrected Visual acuity (log MAR)	-0.09±0.08	-0.03±0.08	0.001
Refractive error (diopters)	-2.29±2.39	-2.16±2.39	0.6

Data are shown as mean ± standard deviation except for gender.

log MAR= logarithm of minimal angle of resolution,

*P-value for comparison between open-angle glaucoma patients and normal subjects.

†by Fisher's exact test, ‡by unpaired t-test.

表 2. HRTパラメータの比較。

	Open-angle glaucoma	Normal subjects	P*
Disc area (mm ²)	2.00±0.45	1.98±0.36	0.6
Cup area (mm ²)	0.93±0.49	0.48±0.33	<0.0001
Rim area (mm ²)	1.07±0.33	1.50±0.26	<0.0001
Cup disc area ratio	0.44±0.18	0.23±0.13	<0.0001
Cup volume (mm ³)	0.26±0.27	0.11±0.15	<0.0001
Rim volume (mm ³)	0.28±0.14	0.42±0.18	<0.0001

Data are shown as mean ± standard deviation.

*P-value for comparison between open-angle glaucoma patients and normal subjects by unpaired t-test.

結果：148名の緑内障患者を対象にした検討では、GPSのsensitivityは71.7%であり、MRA (75.2%) とFSM (77.2%) のそれと有意差はなかった (P>0.5; Fisher's exact test)。148名の正常人を対象としたspecificityはGPSは80.7%で、MRA (91.1%) とFSM (87.4%) と有意差はなかった (P>0.3) (表 3)。

表 3. 全対象でのsensitivityとspecificity

	Sensitivity(%)	P*	Specificity (%)	P*
No. of eyes	145		145	
Glaucoma Probability Score	71.7 (65.2-77.5)		80.7 (74.6-85.7)	
Moorfields Regression Analysis	75.2 (68.8-80.6)	0.8*	91.1 (86.2-94.4)	0.06
FS Mikelberg discriminant function	77.2 (71.0-82.5)	0.5	87.4 (81.9-91.4)	0.3

*P-value for comparison between Glaucoma Probability Score and Moorfields Regression Analysis and FS Mikelberg discriminant function by Fisher's exact test..

() : 95% confidence interval

対象を近視の強い群と弱い群に分けて検討した場合、GPSのsensitivityは強度近視群でより低値であったが、specificityには差がなかった（表4）。

表4. 強度近視群と弱度近視群でのsensitivityとspecificity

	Sensitivity (%)				
	Less myopic	P*	Higher myopic	P*	P†(less vs. higher)
No. of eyes	77		68		
GPS	83.1 (73.2-89.9)		58.9 (47.0-69.7)		0.0002
MRA	79.2 (68.9-86.8)	0.7	66.2 (54.3-76.3)	0.5	0.09
FSM	83.1 (73.2-89.9)	1.0	66.2 (54.3-76.3)	0.5	0.02

	Specificity (%)				
	Less myopic	P*	Higher myopic	P*	P† (less vs. higher)
No. of eyes	75		70		
GPS	78.7 (67.6-86.6)		83.1 (72.2-90.3)		0.1
MRA	88.6 (79.0-94.1)	0.2	89.2 (79.4-94.7)	0.4	1.0
FSM	84.3 (74.0-91.0)	0.5	87.7 (77.5-93.6)	0.6	0.6

GPS = Glaucoma Probability Score, MRA = Moorfields Regression Analysis, FSM = FS Mikelberg discriminant function.

*P-value for comparison between Glaucoma Probability Score and Moorfields Regression.

†P-value for comparison between the less myopic group and higher myopic group.

Analysis and FS Mikelberg discriminant function by Fisher's exact test..

() : 95% confidence interval

また、対象をdisc area2.0 mm²で2群に分けて解析した結果、GPSのsensitivityとspecificityは、disc areaが大きい群において、小さい群に比べ有意に低値であった（表5）。

表5. 乳頭面積により2群に分けた場合の sensitivity と specificity

	Sensitivity (%)			
	Larger disc	P*	Smaller disc	P*
No. of eyes	73		72	
GPS	91.8 (84.9-93.7)		51.4 (41.8-60.9)	
MRA	82.2 (73.7-88.4)	0.09	72.2 (62.8-80.0)	0.016
FSM	81.9 (72.2-87.3)	0.06	73.6 (72.2-87.3)	0.010

	Specificity (%)			
	Larger disc	P*	Smaller disc	P*
No. of eyes	57		88	
GPS	59.6 (48.2-70.1)		94.0 (88.1-97.0)	
MRA	86.5 (76.9-92.5)	0.005	94.0 (88.1-97.0)	1.0
FSM	78.8 (68.2-86.6)	0.06	92.8 (86.6-96.2)	0.8

GPS = Glaucoma Probability Score, MRA = Moorfields Regression Analysis, FSM = FS Mikelberg discriminant function.

*P-value for comparison between Glaucoma Probability Score and Moorfields Regression Analysis and FS Mikelberg discriminant function by Fisher's exact test..

() 95% confidence interval

結論:

この研究の結果、HRT の新しい解析プログラムである GPS は、従来のプログラムとほぼ同等の sensitivity と specificity を有するが、強度近視眼に対しては sensitivity が若干低下し、乳頭が大きい眼では sensitivity と specificity とも低下することが明らかとなった。

(2) - 2 新しく開発されたスペクトラル・ドメインOCT (SD-OCT) の緑内障診断用プログラムをトプコン(株)と共同開発した。そして、最初の検討として緑内障の網膜神経線維層欠損の評価能を検討した。詳細を以下に示す。

対象: 44 名 44 眼の開放隅角緑内障患者及び 45 名 45 眼の正常眼。

方法:

①まず、SD-OCT の測定結果から網膜神経線維層を segmentation し、測定された網膜神経線維層厚を三次元的にマッピングする方法を開発した(例: 図3、図4)。

Figure 3

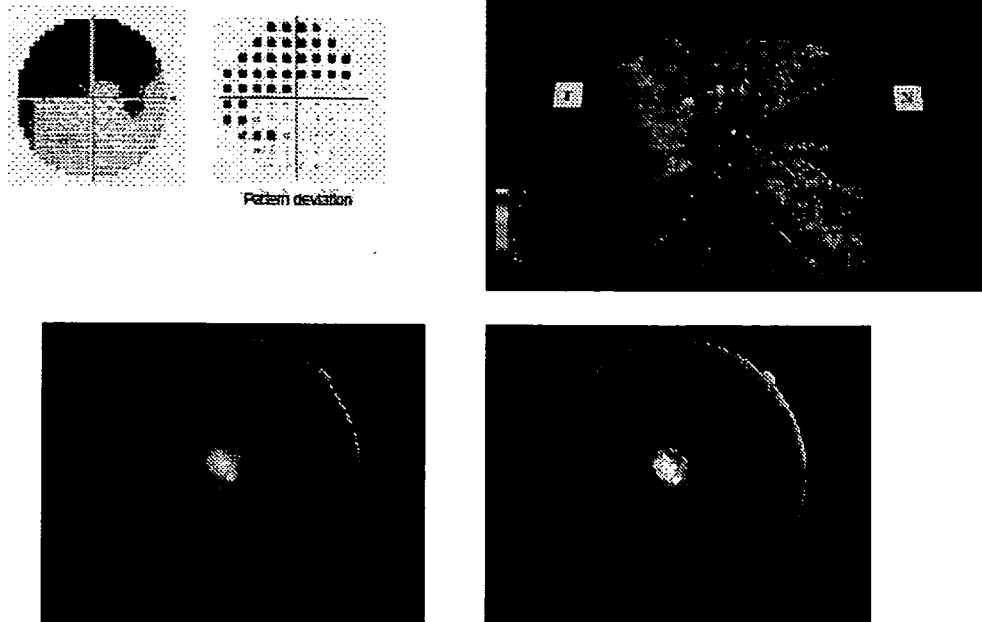


図3. 近視を伴った緑内障の例。

Figure 4

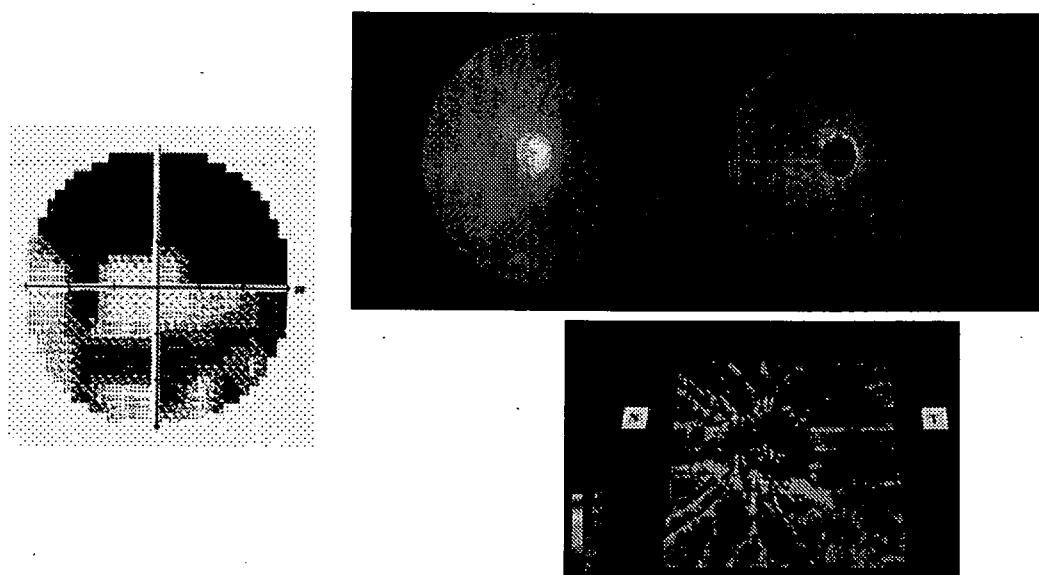


図4. 末期緑内障の例。

②つぎに、乳頭周囲を5つのセクターに分け、各セクターにおける網膜神経線維層欠損の検出能を比較した。その結果、SD-OCT はレッドフリー眼底写真より高い sensitivity を持つことが明らかになった。

	Sector 1	Sector 2	Sector 3	Sector 4	Sector 5	TOTAL
No. eyes with VFD	18	25	29	17	18	107
Spectral-domain OCT						
RNFLD positive	14	22	22	8	9	75
RNFLD negative	4	3	7	9	9	32
Sensitivity	77.8%	88.0%	75.9%	47.1%	50.0%	70.1%
Red-free converted photographs						
RNFLD positive	10	19	23	2	5	59
RNFLD negative	8	6	6	15	13	48
Sensitivity	55.6%	76.0%	79.3%	11.8%	27.8%	55.1%

The sectors 1 to 5 are based on the classification according to Garway Heath, et al. (Figure 1).³⁷ VFD = visual field defect, RNFLD = retinal nerve fiber layer defect.

(3) 後期緑内障の臨床像と予後に関連する因子の検討

多施設研究グループ（東京大、熊本大、神戸大、佐賀大、日本大、東京逓信病院）を組織し、患者登録及び経過観察を進めている。平成19年度末までに約200名の患者がエントリーされた。以下に研究計画及びエントリー状況の中間まとめを示す。

<研究計画>

1. 目的

緑内障では、ある程度病期が進行してから自覚症状が現れ、末期に近い段階で初めて quality of life の著明な低下が認められることも少なくない。したがって、後期から末期の緑内障患者の臨床像を理解することは緑内障臨床の上で非常に重要なことであるが、これまでの報告などは限られている。本研究は、国内の多施設において、後期以降の緑内障患者の現在の臨床像とこれまでの経過を retrospective に検討するとともに、臨床データ（視力、視野など）の経時的変化を prospective に集積することで、本邦の後期緑内障患者に関する基礎的データを得ることを目的とする。

2. 概要

後期緑内障患者に対し、ベースラインとなる視野などのデータを集めた後、決められたスケジュールでの経過観察を続ける（5年間）。

3. 参加施設

当初は以下の8施設で開始し、研究の進展状況をみながら追加を検討していく。東京大、熊本大、神戸大、佐賀医大、NTT西日本九州病院、日本大、東京通信病院

4. 調査期間

患者登録は各施設の倫理委員会の研究承認から1年間とし、登録後5年間の経過観察を行う。

5. 予定症例数

200例程度

6. 実施計画

①患者選択基準

- ・緑内障患者（病型問わず）
- ・緑内障以外の視野に影響を及ぼす眼疾患を持たない（偽水晶体眼は可）。
- ・信頼性のある視野測定（FL<20%, FP, FN<33%）がHFA 24-2が可能で、少なくとも一眼でMD-20 dB以下
- ・年齢20才から80才
- ・矯正視力 ≥ 0.5
- ・内眼手術の既往、全身疾患の有無は問わない。
- ・インフォームドコンセントを得られたもの
- ・乳頭写真が撮影可能である

②エントリー時の収集データ

- ・患者背景：年齢、性別、病型、無治療時眼圧、診断時年齢、眼手術歴、全身疾患、全身疾患に対する内服薬、家族歴
- ・検査データ：現在の眼圧、使用中の抗緑内障薬、視力、屈折、角膜厚、視神経乳頭写真、視野HFA 24-2、視野HFA 10-2（3ヶ月以内に2回）

③経過観察

- ・HFA 10-2（SITA standard, fovea on）半年に1回
- ・HFA 24-2（SITA standard, fovea on）エントリー時と終了時
- ・眼圧：少なくとも3ヶ月に1回

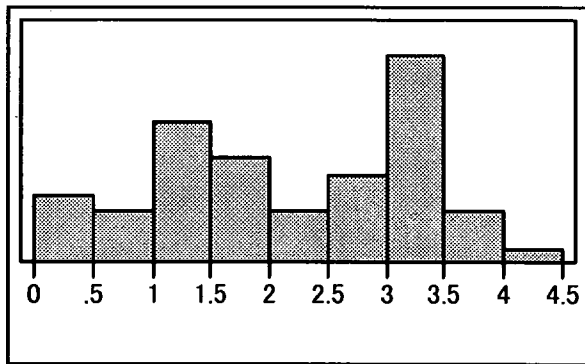
- ・視力：半年に1回
- ・血圧：1年に1回
- ・眼手術施行，処方変更，眼所見の変化などがあれば記載する
- ・経過観察期間中の治療（薬物，手術）に関して，プロトコールとしての制限を設けない

<エントリー状況、及びエントリー患者の分析>

1. エントリー患者数 187 例(東大 78 例、熊本大 47 例、吉川眼科 21 例、日本大 7 例、神戸大 19 例、佐賀大 10 例、東京通信病院 5 例)

(以下は詳細未着の8例、ドロップアウトした11例を除く)

経過観察期間 2.17 ± 1.12 年 (1ヶ月~年)



性別 男性 110名、女性 66名

年齢 63.3 ± 12.8 (23~79) 歳

緑内障病型 原発開放隅角緑内障(狭義) 70例 (40.2%)

正常眼圧緑内障 58例 (33.3%)

原発閉塞隅角緑内障 17例 (9.8%)

落屑緑内障 9例 (5.2%)

続発緑内障

13例 (7.4%)

発達緑内障 7例 (4.0%)

無治療時眼圧 24.1 ± 10.5 mmHg (12~62) (66例不明)

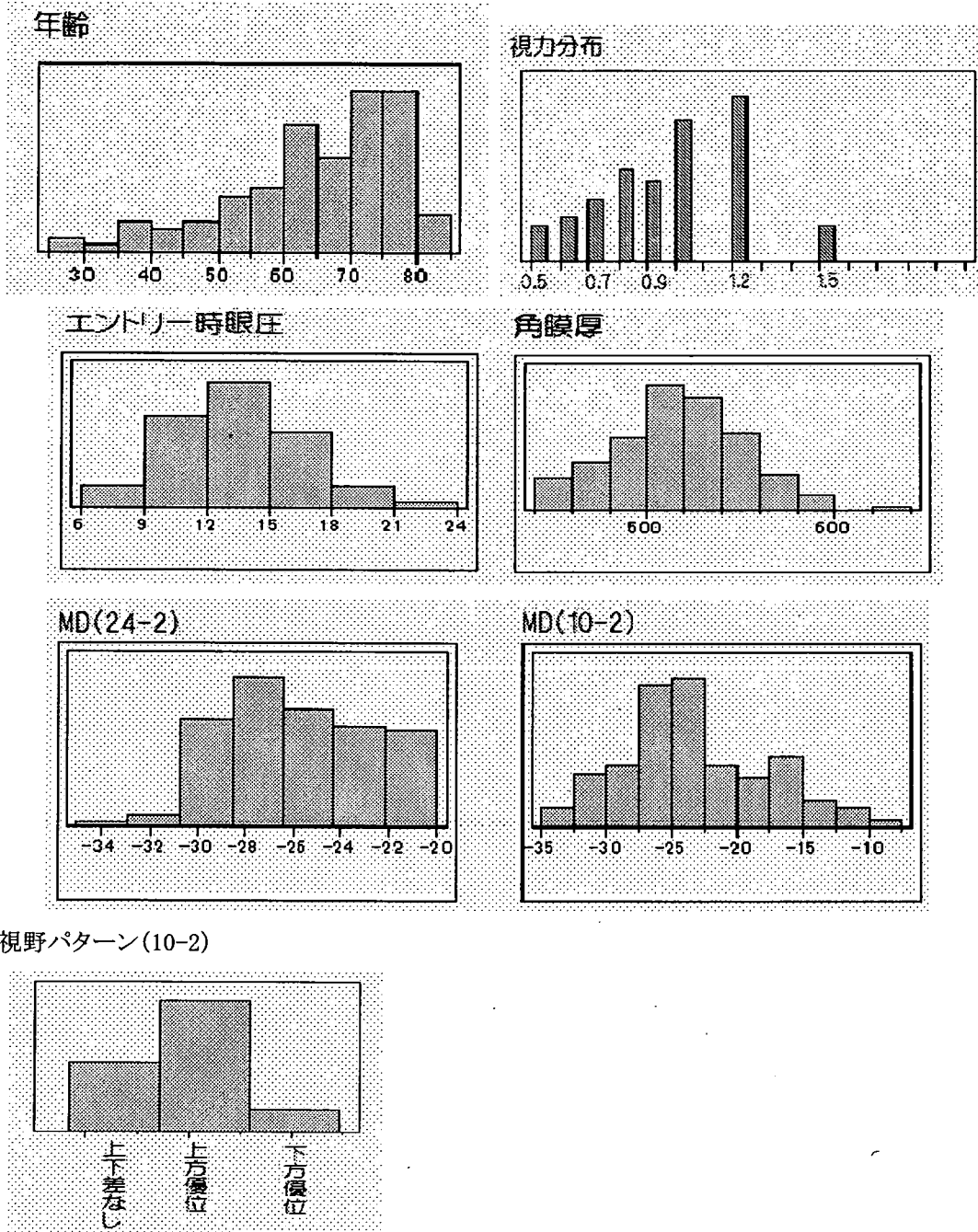
entry時眼圧 13.1 ± 3.2 mmHg (6~23)

ハンフリー10-2MD -23.34 ± 5.58 dB (-34.92 ~ -8.65)

24-2MD -25.95 ± 3.20 dB (-34.51 ~ -20.15)

角膜厚 $518.0 \pm 35.3 \mu\text{m}$ (444.0~622.0)

手術歴(レーザー含) (0回 59例、1回 61例、2回 30例、3回 7例
4回 5例、5回 2例、6回 1例)



(4) 分子生物学的研究及び緑内障動物モデル研究

本邦におけるNTGの重要性に鑑み、その有効且つ新規の治療に直結し得る最新の分子生物学的手法や緑

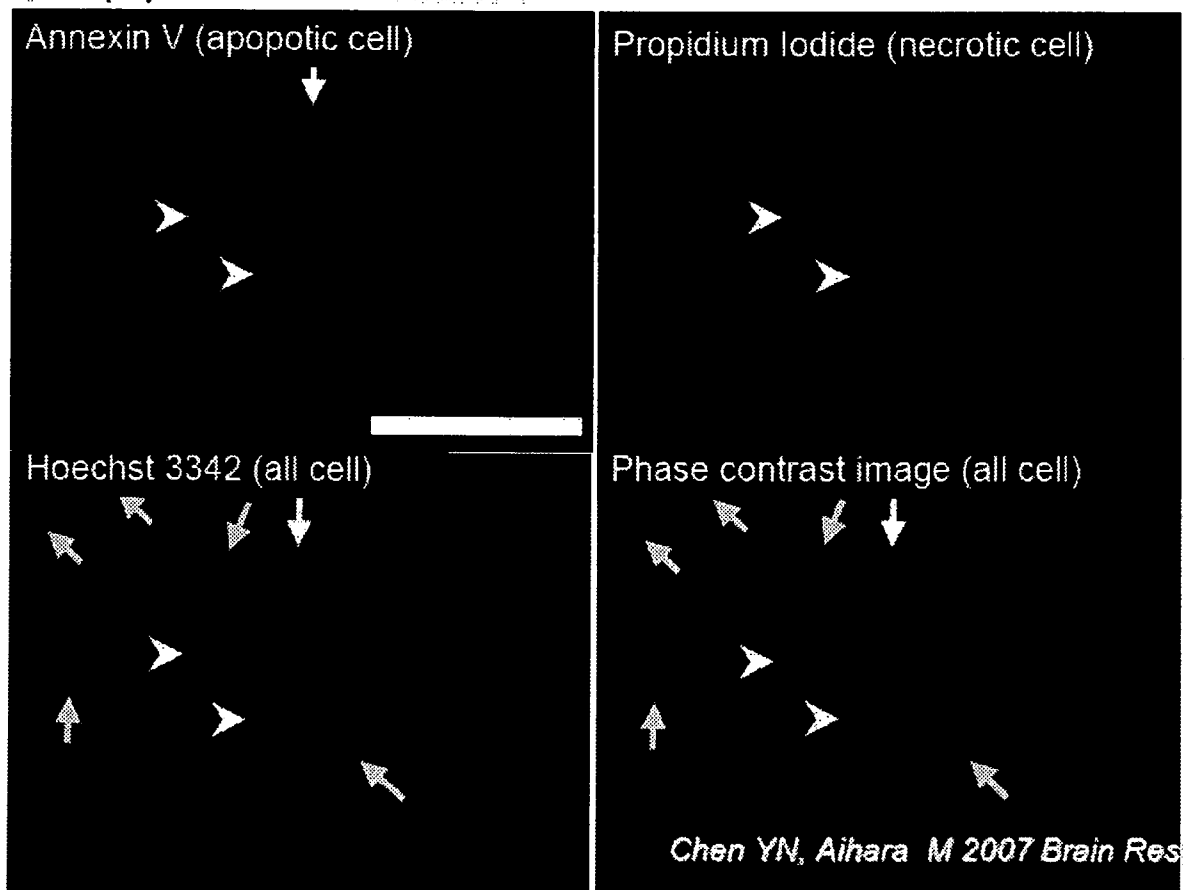
内障モデル動物を用いた検討を行った。

B. 研究方法

In vitroラット網膜神経節初代培養系を用いた β 遮断薬による酸化ストレスによる細胞死抑制効果とそのシグナルの解明

1. 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。抗酸化剤を除去した培地に交換することで酸化ストレス負荷をかけ、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。
2. 酸化ストレスによる細胞死のパターンをアポトーシス、ネクローシス検出法を用いて検討した。（図1）

図1. Apoptosis necrosis 判定方法



3. 酸化ストレスによる細胞死に対するネクローシスシグナルの関与の可能性を考え、ネクローシス誘導蛋白プロテアーゼの阻害薬、cathepsin B proinhibitor (E-64-d)およびthiol protease inhibitor (Ca-074

Me)を用いて、細胞死が抑制可能かを検討した。

4. 酸化ストレスによる細胞死のシグナルを検討するためにbax inhibiting peptide (BIP)を用いてbax経路のミトコンドリア経路が関与しているかを検討した。

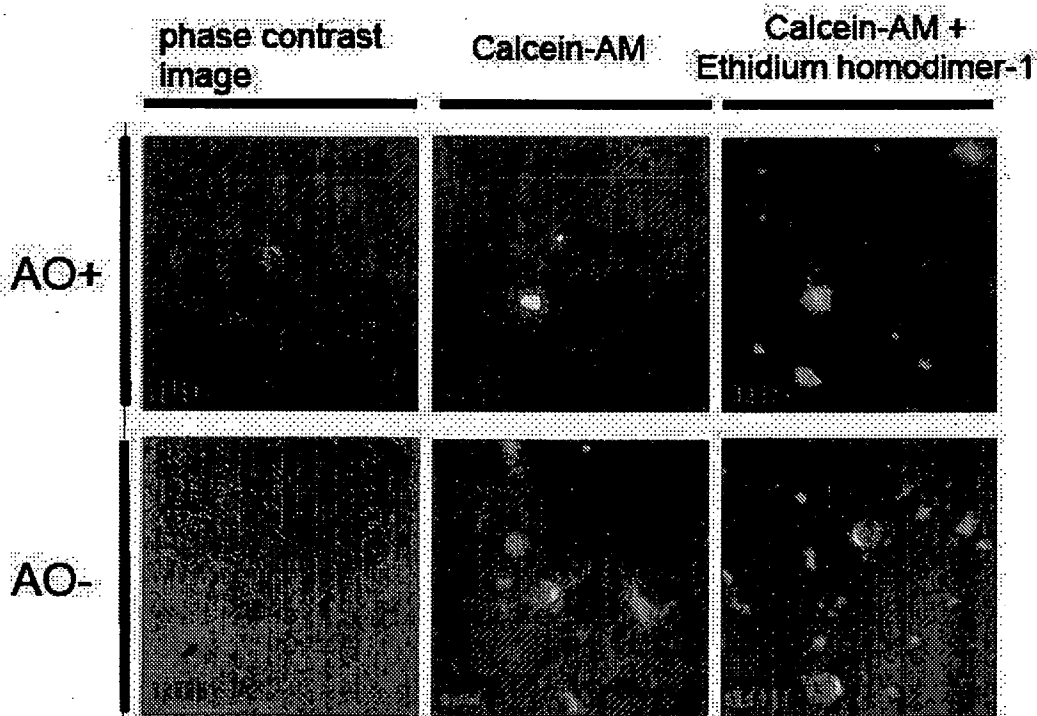
5. 最終濃度 $10^{-8}M$ 、 $10^{-7}M$ 、 $10^{-6}M$ のベタキシロール、ニプラジロール、チモロール、カルテオロール添加後の細胞死の抑制効果が無添加群と比較検討した。

(4) 緑内障動物モデルおよび分子生物学的研究

4-1 酸化ストレスによる細胞死のパターン (図2)

図2に培養RGCの酸化ストレス2時間後の状態を示す。AはannexinVによりアポトーシス細胞およびネクローシス細胞が染色されている。Bはpropidium iodideにより細胞膜が破壊された細胞の細胞核が染色され、ネクローシス細胞が染色されている。CではHoechst33342により全細胞の核が染色されている。従って、白矢印がアポトーシス細胞、矢頭がネクローシス細胞、黄矢印が生存細胞を示す。この方法によりスタウロスポリンを細胞死惹起薬のコントロールとして細胞死を検討したのが図3である。

図2. 酸化ストレスによる細胞死形態



Yu ZK, Aihara M 2007 Mol Vis

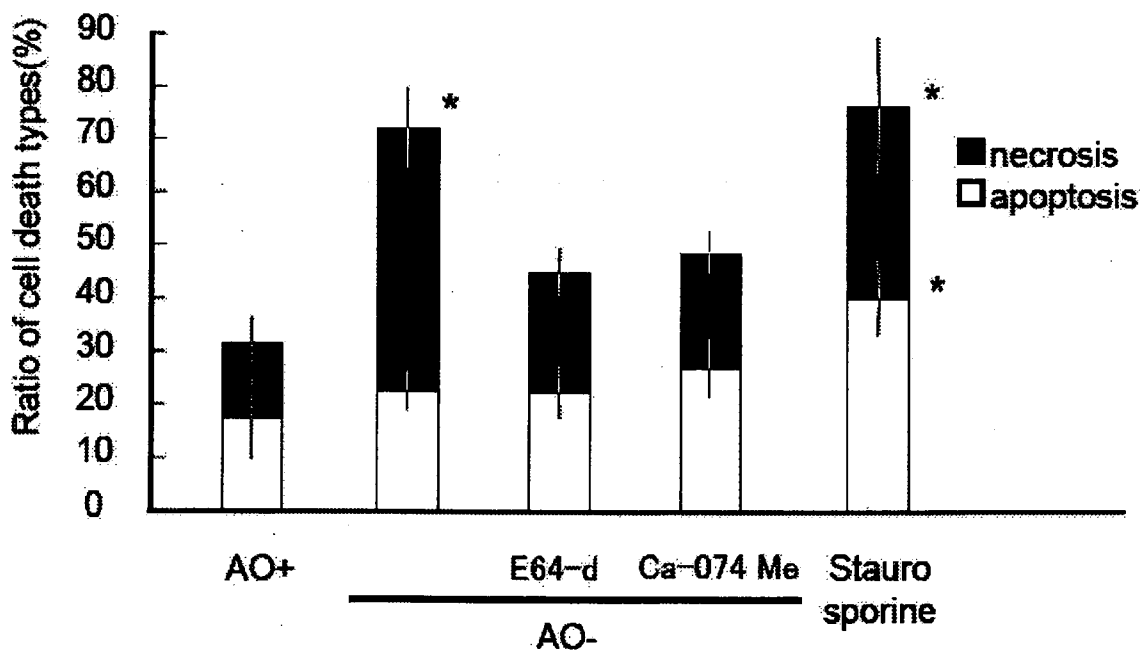
細胞死のポジティブコントロールであるstaurosporineにより $40.1 \pm 7.1\%$ がアポトーシスをおこし、コントロール $17.0 \pm 7.7\%$, より有意に増加したが、(n=8, $p < 0.05$ by Dunnet test) 酸化ストレス負荷による細胞死 $22.3 \pm 3.6\%$ はコントロールと有意差がなかった。また、酸化ストレス負荷により $49.6 \pm 7.6\%$ staurosporineにより $36.3 \pm 13.1\%$ がネクローシスをおこし、コントロール $14.3 \pm 4.9\%$ より有意に増加した (n=8, $p < 0.05$ by Dunnet test)。従って酸化ストレス負荷実験系ではおもにネクローシス細胞死が起こっていることが判明した。

4-2 酸化ストレスによる細胞死に対するネクローシスシグナルの関与

ネクローシス誘導蛋白プロテアーゼの阻害薬、cathepsin B proinhibitor (E-64-d)およびthiol protease inhibitor (Ca-074 Me)により、酸化ストレスによって増加したネクローシスによる細胞死は $22.5 \pm 4.7\%$, $21.8 \pm 3.9\%$ と阻害薬の内酸化ストレス群と比べ有意に抑制され、酸化ストレスのないコントロールと有意差がなかった。従って酸化ストレス負荷実験系ではおもにネクローシスによる細胞死が起こっていることが判明した。

(図3)

図3. 酸化ストレスによる細胞死とプロテアーゼ阻害薬の効果

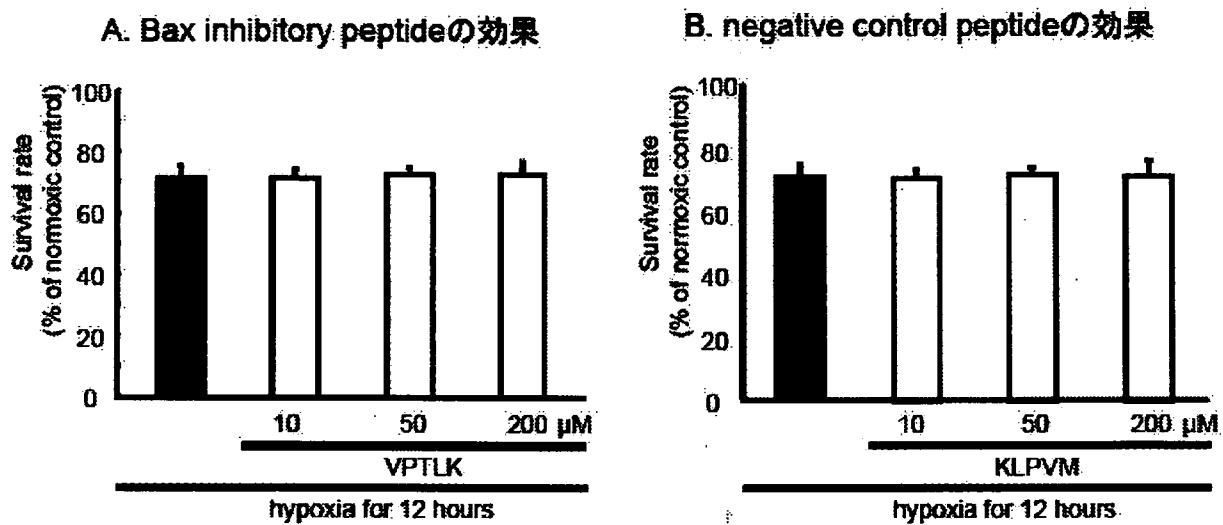


Yu ZK, Aihara M 2007 Mol Vis

4-3. BIPによる酸化ストレス負荷による細胞死の抑制効果

酸化ストレス負荷に対しBIPのactive peptideであるVPTLKおよびnegative control peptideは効果がなかった。(図4)

図4. 酸化ストレスによる細胞死とBax阻害ペプチドの効果



Chen YN, Aihara M 2007 Brain Res

4-4 4種のβ遮断薬による酸化ストレス負荷に対する細胞死の抑制効果 (図5)

ベタキソロール、ニプラジロール、チモロールは濃度依存性に0.01μMの濃度から細胞死の抑制効果を示した。しかしカルテオロールは細胞死の抑制効果を示さなかった。

図4. 酸化ストレスによる細胞死に対するβ遮断薬の効果

