

難治眼疾患に対する新たな治療法の開発

京都大学 医学部附属病院 眼科

池田 華子

1. 背景

緑内障は、網膜の神経節細胞が変性脱落することにより視野欠損をきたす疾患で、40歳以上の5%で罹患していることが明らかになっている¹⁾。現状では眼圧降下のみが有効な治療とされているが、十分に眼圧を下げてもなお、進行する例が少なくない。また、日本では正常眼圧緑内障が全体の6割をしめ、眼圧降下だけでは、進行予防に限界がある。現在、緑内障は、日本において、近年成人の失明原因の第一位となっており、高齢化とともに患者数が増大し、社会問題になりつつある。この難治眼疾患に対し、神経保護という観点からの新たな治療法が開発できれば、多くの途中失明者を救うことができると考える。本研究では、網膜神経節細胞の変性を抑制することにより、緑内障の進行予防が可能となるような、新たな治療薬の検討を目指した。

2. 方法

神経保護物質の候補として、京都大学にて新規に開発された合成化合物AおよびBを使用し、下記の方法にて、網膜の神経節細胞保護効果を検討した。

2-1) 網膜器官培養

C57/BL6マウス(8週齢、日本SLCより購入)より網膜を摘出し、メンブレン上にて器官培養を行い、200 μ M *N*-Methyl-D-Aspartate (NMDA)を加えることで、急性網膜神経節細胞障害を惹起した。化合物Aを終濃度50 μ Mで培養液に加え、対照群には、DMSOを用いた。4日間培養後、4% PFAにて網膜を固定し、凍結切片を作成、HE染色およびTUNEL染色を行った。

2-2) NMDA硝子体内投与モデルマウス

正常眼圧緑内障モデルマウスとして、NMDAにて急性網膜神経節細胞障害を惹起したC57/BL6マウス(8週齢雄)を使用した。NMDA(2 nmol)は、ペントバルビタール麻酔下にて、31ゲージ針を用いて毛様体扁平部より硝子体内に注射した。NMDA硝子体注射一週間前から注射後14日目まで、化合物A(n=7)、B(n=7)、あるいは対照として生食(n=12)を、胃ゾンデを用いて毎日経口投与した。硝子体注射直前、硝子体投与後4日、7日、14日目に、ペントバルビタール麻酔下にて光干渉断層計optical coherence tomography(OCT)で網膜断層撮影を行った²⁾。網膜断層像を用いて視神経乳頭周囲の網膜内層厚(網膜神経線維層、神経節細胞層、内顆粒層)を測定し、網膜内層の障害に対する薬剤投与の効果を評価した。

2-3) 続発閉塞隅角緑内障モデルマウス

眼圧上昇タイプの緑内障モデルとして、近交系であるDBA/2Jマウス³⁾(日本クレアより購入)を用いた。雄のDBA/2Jマウスに、2カ月齢より化合物Aまたは対照として生食を胃ゾンデを用いて毎日経口投与した。7カ月、8カ月、9カ月齢でOCTにて網膜断層像を撮影、網膜内層厚を測定するとともに視神経乳頭陥凹の程度を評価した。10カ月齢で眼球摘出し、4% PFAにて固定後、薄切しHE染色を行った。毎月、ペントバルビタール麻酔下で、Tonolab眼圧計(エムイーテクニカ)を用いて眼圧を測定した。

3. 結果・結論

3-1) 網膜器官培養

NMDA添加下、4日目の培養網膜のHE染色より、DMSO投与対照網膜では、網膜神経節細胞の減少および、網膜神経線維層・神経節細胞層・内網状層の菲薄化が見られた。化合物Aを加えて培養した網膜では、神経節細胞が比較的保たれ、網膜内層の菲薄化が抑制されていた。また、対照網膜では、網膜神経節細胞層・内顆粒層に多数のTUNEL陽性細胞を認めたのに対し、化合物添加網膜では、TUNEL陽性細胞が少なかった。以上より、網膜器官培養でのNMDAによる急性障害の系において、化合物Aは網膜神経節細胞に対し、細胞死抑制効果をもつことがわかった。

3-2) NMDA硝子体内投与モデルマウス

OCTによる網膜断層撮影像において、NMDA硝子体内投与前の網膜内層厚は、 $68.5 \pm 3.3 \mu\text{m}$ であった(平均 \pm SD)。生食投与対照マウスでは、網膜内層厚は、NMDA投与4日、7日、14日目において、 64.0 ± 3.0 、 58.3 ± 2.3 、 $56.7 \pm 3.5 \mu\text{m}$ と徐々に薄くなっていった²⁾。一方、化合物A、B投与マウスでの網膜内層厚は、NMDA投与7日目に、それぞれ 64.0 ± 2.7 、 $64.0 \pm 1.7 \mu\text{m}$ であり、生食群と比較して有意に網膜厚が厚かった(A: $P < 0.0001$ 、B: $P = 0.001$ 、Dunnett's test)。NMDA投与14日目には、網膜内層厚は、化合物A、B投与群でそれぞれ 60.8 ± 2.39 、 $61.3 \pm 4.8 \mu\text{m}$ であり、化合物B投与群で生食群と比較して有意に網膜内層が厚かった(B: $P < 0.05$)。以上より、マウス生体内においても、化合物の全身投与により、NMDAによる網膜内層障害、菲薄化が抑制されることが明らかになった。

3-3) 続発閉塞隅角緑内障モデルマウス

化合物A投与群、生食投与対照群ともに、5カ月齢時から眼圧の上昇を認めたが、両群の平均眼圧に有意差はなかった。生食投与対照群では、7カ月、8カ月、9カ月齢で、緑内障の特徴である視神経乳頭陥凹拡大を示す個体が増加していった。対して、化合物A投与群では視神経乳頭陥凹拡大を示す個体は存在しなかった。また、生食投与コントロール群では、7カ月齢以降、網膜神経線維層の菲薄化が進行するが、化合物A投与群では、ほぼ正常に保たれている個体が多かった。8カ月齢での網膜内層厚を測定すると、生食投与コントロール群では $67.5 \pm 3.0 \mu\text{m}$ であったのに対し、化合物A投与群では $71.0 \pm 1.3 \mu\text{m}$ であり、化合物A投与群で網膜内層が有意に厚

かった (P = 0.005、t-test)。

10カ月齢での摘出眼球の薄切のHE染色では、生食投与対照群では、網膜神経節細胞が脱落し、細胞数が減少、網膜神経線維層も菲薄化していた。化合物A投与群では、比較的神経節細胞が保たれ、網膜神経線維層も厚い状態で維持されている傾向にあった。

以上より、続発閉塞隅角緑内障モデルマウスであるDBA/2Jマウスにおいて、化合物A投与により、網膜神経節細胞の脱落が抑制され、視神経乳頭陥凹拡大および神経線維層の菲薄化が抑制されることが明らかになった。

4. まとめ

京都大学にて新規に開発された合成化合物には、網膜器官培養、NMDA硝子体注射モデルマウス、続発閉塞隅角緑内障モデルマウスにおいて、網膜神経節細胞の保護効果があり、各系にて神経節細胞死を抑制することが明らかになった。このことより、実際の緑内障患者においても、神経節細胞の変性・脱落を抑制できる可能性がある。今後は、どのような機構でこの化合物が神経節細胞保護効果をもたらしているのか検討するとともに、他の緑内障モデル動物を用いて、さらに検討を続け、将来的には、臨床応用につなげていきたい。また、視細胞変性によって視機能障害をもたらされる他の眼難治疾患、たとえば、治療法の確立していない網膜色素変性症などに対しても、この薬剤が、疾患進行遅延効果があるかどうか、モデル動物を用いて、検討を進めていきたいと考えている。

5. 発表論文、参考文献

- 1) Iwase A, et al. The prevalence of primary open-angle glaucoma in Japanese: the Tajimi Study. *Ophthalmology*, 111:1641-1648, 2004.
- 2) Nakano N, et al. Longitudinal and Simultaneous Imaging of Retinal Ganglion Cells and Inner Retinal Layers in a Mouse Model of Glaucoma Induced by *N*-Methyl-D-Aspartate. Paper in preparation.
- 3) Anderson MG, et al. Mutations in genes encoding melanosomal proteins cause pigmentary glaucoma in DBA/2J mice. *Nat Genet* 30:81-85, 2002.