

# モデル動物を用いた網膜リアルタイムイメージング法の開発と応用

京都大学医学部附属病院 眼科学教室

池田 華子

## 1. 背景

現在、日本において、緑内障は途中失明の一番、網膜色素変性症は三番目の原因疾患であり、大きな社会問題となっている。緑内障では、眼圧下降のみが唯一の治療法となっており、新たな眼圧下降点眼薬が開発・使用されている。しかし、薬剤や手術にて眼圧を十分に下げてもなお進行する例が少なくない。近年、緑内障の治療に、血流改善や神経保護が重要であると考えられるようになってきているが、新たな治療法の確立はなされていない。また、網膜色素変性症では、遺伝子治療や再生医療の試みがなされようとしているが、疾患を診断後、進行を予防することこそが重要であると考えられる。様々な神経栄養因子などで、神経保護の試みはなされているが、いずれも、十分な効果をあげていない。これらの現状をふまえ、新たな神経保護効果をもつ薬剤の開発が急がれる。

薬剤の効率よい開発に際し、動物モデルにおいてその効果の客観的・経時的評価システムを構築することは、非常に重要である。本研究では、新薬剤の開発に際し、必要かつ不可欠である、動物眼疾患モデルにおける薬剤効果の評価システムを、網膜イメージングを応用して構築することを目的とした。その後、その評価システムを使用し、神経保護など眼難治疾患に対する新たな治療法の探索を行った。

## 2. 方法

### 2-1) 撮影機械

445nmのダイオードレーザーおよび488nmカットオフフィルターを特注で装着し、CFP眼底蛍光撮影が同時にできるようにした光干渉断層計optical coherence tomography (OCT) (Multiline OCT, ハイデルベルグエンジニアリング社)にてリアルタイムでの眼底イメージングを行った。各々のマウスは散瞳剤を用い、角膜乾燥予防の目的でコンタクトレンズを装着し、ペントバルビタール麻酔下にて撮影を行った。CFP眼底撮影像を用い、視神経乳頭中心から830 $\mu$ m離れた、310x310  $\mu$ m正方内の網膜神経節細胞数を上下鼻耳4か所で計数し、平均を神経節細胞数とした。視神経乳頭周囲、直径420 $\mu$ mのサークルスキャンOCT画像を用いて、網膜内網状層・網膜神経節細胞層・神経線維層の3層を含む、網膜内層厚を付属のソフトウェアを用いマニュアルで計測した。ウサギ網膜イメージングでは、マウス同様に、散瞳剤を用い、ケタミン麻酔下にてMultiline OCTにてOCT撮影を行った。

### 2-2) モデル動物

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Thy1-CFPトランスジェニックマウス<sup>1)</sup> (8-10週齢雄、ジャクソン研究所より購入し自家繁殖させた)を使用した。NMDA (1~20nmol) は、ペントバルビタール麻酔下にて、33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。硝子体注射直前、硝子体投与後4日、7日、14日目に、OCT・CFP眼底撮影を同時に行った<sup>2)</sup>。

他の正常眼圧緑内障モデルマウスとして、グルタミン酸トランスポーターの1つであるGLAST欠損マウス<sup>3)</sup>をThy1-CFPトランスジェニックマウスと交配し使用した。生後21日、28日、35日、49日、90日齢にてOCT・CFP眼底撮影を同時に行った。

網膜色素変性症モデルマウスとして、rd10 (ジャクソン研究所より購入し自家繁殖させた)を使用し、生後21日、25日、29日、33日齢にてOCT撮影を行い、視細胞層の厚みおよび視機能を反映するとされている、視細胞の外節内節接合部の描写状態を検討した。視機能検査として、暗順応下の網膜電図検査を各日に併施した。

網膜色素変性症ウサギとして、変異ロドプシン (Pro 347 Leu) のトランスジェニックウサギ<sup>4)</sup> (北山ラベスより購入)を使用し、生後4週、6週、10週、20週齢にてOCT撮影を行い、視細胞層の厚みおよび視細胞の外節内節接合部の描写状態を検討するとともに、網膜電図にて視機能評価を行った<sup>5)</sup>。

### 2-3) 神経保護剤の投与

新規神経保護剤として、我々の開発した VCP 阻害剤を用い、上記評価系にて効果を判定した。上記 NMDA 硝子体モデルマウス (NMDA 2nmol) では、NMDA 硝子体注射一週間前から注射後 14 日目まで、VCP 阻害剤 (50 mg/kg/day) (n = 7) および対照として生食 (n = 12) を胃ゾンデにて毎日経口投与した。rd10 マウス (n = 28) には 7 日齢より VCP 阻害剤 (50 mg/kg/day) および対照として生食を毎日腹腔内投与した。

## 3. 結果

CFP 眼底撮影によって、個々のマウス神経節細胞が明瞭に描出可能であった。また、OCT 撮影により、マウスおよびウサギの網膜各層が明瞭に描出され、同一個体での網膜各層の変化をライブでとらえることができた。

### 3-1) NMDA 硝子体投与モデルマウス

網膜神経節細胞数は NMDA 注射 1 日後に急激に減少し、その減少割合は用量依存性であった (NMDA 注射前の 65.3% (2 nmol)、71.7% (5 nmol)、49.5% (10 nmol)、27.1% (20 nmol))。その後もわずかに減少し、14 日後には NMDA 注射前の 53.7% (2 nmol)、44.1% (5 nmol)、28.3% (10 nmol)、20.2% (20 nmol) になった。網膜内層厚は、1 日目にはわずかに増加し、4 日目に減少しはじめた。14 日後には NMDA 注射前の 84.6% (2 nmol)、75.7% (5 nmol)、76.5% (10 nmol)、71.4% (20 nmol) に減少した<sup>2)</sup>。

### 3-2) GLAST 欠損マウス

GLAST<sup>-/-</sup>マウスの 21 日齢での平均 RGC 数、GCC 厚は  $35.0 \pm 3.5$  個、 $79.0 \pm 4.9 \mu\text{m}$  であり、RGC 数は GLAST<sup>+/+</sup> マウスの 7 割に減少していたが、GCC 厚は有意な差がなかった。GLAST<sup>-/-</sup> マウスでは、RGC 数はその後も 49 から 90 日齢にかけて減少し、90 日齢では  $28.0 \pm 2.2$  個で GLAST<sup>+/+</sup> マウスの 56% であった。GCC 厚は 28 から 35 日齢にかけて急激に菲薄化し、90 日齢では  $56.3 \pm 3.6 \mu\text{m}$  で GLAST<sup>+/+</sup> マウスと比べ有意に薄くなっていた。

### 3-3) 網膜色素変性症モデル rd10 マウス

rd10 マウスにおいて、生後 21 日齢にてすでに視細胞層の菲薄化が始まり、視細胞内節・外節接合部の描写が困難であった。網膜全層厚は生後 21 日齢にて  $198.7 \mu\text{m}$  であり、以後 25 日齢： $160.8 \mu\text{m}$ 、29 日齢： $150.8 \mu\text{m}$ 、33 日齢： $147.8 \mu\text{m}$  と急速に菲薄化が進行した。33 日齢では、視細胞層はほとんど描出できなくなった。暗順応下網膜電図 b 波振幅は 21 日齢で正常マウスの半分程度であり、33 日齢ではほとんど平坦になった。

### 3-4) 網膜色素変性症モデルウサギ

網膜全層の厚みは、4 週齢では網膜色素変性ウサギと正常ウサギでの差はなかった。網膜色素変性症モデルウサギでは、6 週齢以降菲薄化が進行し、20 週齢では  $165.8 \pm 8.5 \mu\text{m}$  であり、正常ウサギと比べ有意に薄くなっていた ( $194.3 \pm 7.7 \mu\text{m}$ ;  $P < 0.001$ , unpaired t-test)。モデルウサギでは視細胞層から外節層にかけて、高反射となり、4 週齢ですすでに内節外節接合部の描出はできなかった。20 週齢でのモデルウサギの網膜電図での b 波振幅は  $97.3 \pm 33.2 \mu\text{V}$  であり正常ウサギより有意に小さかった ( $280.8 \pm 71.3 \mu\text{V}$ ;  $P < 0.001$ , unpaired t-test)<sup>5)</sup>。

### 3-5) イメージングを用いた評価系での新規神経保護剤効果検討

NMDA 急性神経節細胞傷害モデルマウスにおいて、NMDA 硝子体内投与後 1 日目の RGC 数は対照群において  $37.4 \pm 6.6$  個であったのに対し、VCP 阻害剤投与群では  $49.2 \pm 6.7$  個と RGC 数減少の有意な抑制を認め ( $P < 0.0001$ )、以後全評価日においても同様であった。GCC 厚においても NMDA 硝子体内投与後 7 日目に対照群で  $59.3 \pm 2.6 \mu\text{m}$  であったのに対し、VCP 阻害剤投与群では  $62.4 \pm 4.2 \mu\text{m}$  と菲薄化の有意な抑制を認めた ( $P = 0.009$ )。

rd10 マウスにおいて 21 日齢時、VCP 阻害剤投与群では対照群と比較して網膜菲薄化の有意な抑制を ( $212 \pm 22 \mu\text{m}$ ,  $198 \pm 20 \mu\text{m}$ ,  $P = 0.005$ )、網膜電図 b 波振幅での評価にて視機能低下の有意な抑制を ( $497 \pm 248 \mu\text{V}$ ,  $324 \pm 229 \mu\text{V}$ ,  $P = 0.002$ ) それぞれ認めた。その後、薬剤投与群でも網膜菲薄化、網膜電図振幅低下が進行したが、各観察日において対照群と比べその程度は有意に緩やかであった。

## 4. 考察

眼疾患モデルマウスおよびウサギにおいて、網膜神経節細胞の可視化と同時に OCT 撮影により網膜層構造の描出が可能となり、同一個体での経時変化の観察に有用であった。網膜電図な

どの視機能検査と組み合わせることで、形態・機能の両面から、新規薬剤の効果を判定する評価系を得ることができた。この評価系は、眼疾患に対する新規治療法開発に非常に有用である。また、この評価系を用い、緑内障モデルマウスおよび網膜色素変性症モデルマウスにおいて、VCP阻害剤が、疾患の進行遅延効果をもつことが明らかになった。VCP阻害剤の疾患への適応が期待される。

5. 発表論文、参考文献

- 1) Feng G, Mellor RH, Bernstein M, et al. Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron*.28:41–51, 2000.
- 2) Nakano N, Ikeda OH, Hangai M, Muraoka Y, Toda Y, Kakizuka A, Yoshimura N. Longitudinal and simultaneous imaging of retinal ganglion cells and inner retinal layers in a mouse model of glaucoma induced by *N*-methyl-D-aspartate. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 52, 8754-62, 2011.
- 3) Harada T, et.al. The potential role of glutamate transporters in the pathogenesis of normal tension glaucoma. *J Clin Invest*. 117:1763-70, 2007.
- 4) Kondo M, et.al. Generation of a Transgenic Rabbit Model of Retinal Degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 50: 1371-1377, 2009.
- 5) Muraoka Y, Ikeda OH, Nakano N Hangai M, Toda Y, Okamoto-Furuta K, Kohda H, Kondo M, Terasaki H, Kakizuka A, Yoshimura N. Real-Time Imaging of Rabbit Retina with Retinal Degeneration by using Spectral-Domain Optical Coherence Tomography, paper in preparation.