

北里大学大学院理学研究科

2023 年度博士論文

CFP 発現マウスを用いた眼圧依存性網膜神経節細胞  
障害の評価と薬効評価への応用

鶴我 英和

# 目次

略語表	-----	1
要旨	-----	2
第1章：CFPマウスを用いた高眼圧モデルの作製と眼圧依存性網膜神経節細胞障害 の評価方法の確立		
1-1 緒言	-----	4
1-2 方法	-----	5
1-3 結果	-----	8
1-4 考察	-----	16
第2章：CFPマウスレーザー誘導高眼圧モデルの網膜神経節細胞障害に対するカル シウム拮抗薬ニルバジピンの神経保護効果		
2-1 緒言	-----	18
2-2 方法	-----	18
2-3 結果	-----	20
2-4 考察	-----	26
第3章：総括および今後の展望	-----	29
謝辞	-----	31
参考文献	-----	32
本研究に関わる査読付ありの原著論文リスト	-----	38

## 略語表

略語	正式名称	日本語
CCB	calcium channel blocker	カルシウム拮抗薬
CFP	cyan fluorescent protein	シアン蛍光タンパク質
CNTF	ciliary neurotrophic factor	毛様体神経栄養因子
FGF	fibroblast growth factor	線維芽細胞増殖因子
GON	glaucomatous optic neuropathy	緑内障性視神経障害
IOP	intraocular pressure	眼圧
RGC	retinal ganglion cell	網膜神経節細胞

## 要旨

### 【緒言】

緑内障性視神経障害は眼圧によるメカニカルな障害や血流障害を含む障害が機序として提案されており、その病態解明には、*in vivo* 実験系である動物眼での解析が必須である。緑内障の研究において、遺伝的に高眼圧を示すマウスや実験的に誘発された高眼圧症の動物が用いられている。遺伝的に高眼圧を示すマウスは緑内障の主因である高眼圧と緑内障様の病態が独立している可能性があり、別の病態を見ている可能性も否定できない。緑内障のメカニズムや薬剤による網膜の神経保護効果を評価するために、中脳の上丘からの色素注入による網膜神経節細胞（RGC）への逆行性染色の後に網膜フラットマウント標本で RGC 数を計測する方法が一般的であるが、脳内に侵襲的に色素を注入する煩雑さと、染色効率が課題である。近年、RGC 特異的に蛍光を発現する遺伝子改変マウスである B6.Cg-TgN(Thy1-CFP)23Jrs/J トランスジェニックマウス（CFP マウス）が利用できるようになった。CFP マウスは眼に遺伝的な異常が認められていない通常眼圧を示すマウスである。従って、CFP マウスを用いたレーザー誘導高眼圧モデルは慢性的な高眼圧を誘導でき、RGC の染色無しに緑内障性視神経障害の容易な評価を可能にする。

### 【目的】

CFP マウスを用いて、眼圧依存性の RGC 障害を容易に評価できる動物モデルの作製を試みた。さらに、RGC 保護効果を有する薬剤のスクリーニング系を考案し、ニルバジピンの RGC 保護効果について検討した。

### 【方法 1】

CFP マウスの片眼の角膜輪部をレーザー光凝固することにより、CFP マウスレーザー誘導高眼圧モデルを作製した。対側眼を無処置対照眼とした。処置後 1 週から 8 週まで、マイクロニードル法を用いて眼圧（IOP）を毎週測定した。個体毎に高眼圧処置眼と無処置対照眼について、それぞれの時間（x）と IOP（y）を用いて折れ線グラフを作成し、両線に囲まれた領域（ $\int IOP(y) dx$ ）を眼圧負荷量とし、網膜の圧力障害の代替値として計算した。9 週目に眼球を摘出し、網膜のフラットマウント標本作製した。蛍光顕微鏡撮影画像により、網膜の上下耳鼻側それぞれ乳頭から 600  $\mu\text{m}$  間隔で乳頭近傍、中間部、周辺部の 12 箇所、各面積 40000  $\mu\text{m}^2$  の RGC 数を測定し、無処置対照眼に対する高眼圧処置眼の RGC 生存率を算出し、眼圧負荷量と RGC 生存率の回帰分析を行った。

### 【結果 1】

高眼圧処置眼は 1 週目で平均眼圧  $29.0 \pm 16.2$  mmHg（無処置対照眼  $13.3 \pm 1.1$  mmHg）（平均値 $\pm$ 標準偏差）（n=20）を示し、7 週目まで有意な眼圧上昇を示した（ $p < 0.01$ ）。眼圧負荷量と RGC 生存率は有意な負の相関を示した（ $y = -0.070x + 97.2$ 、 $r = 0.75$ 、 $p = 0.0008$ ）。更に、視神経乳頭から測定した乳頭近傍、中間部、周辺部および、網膜の上下耳鼻側の各領域の解析においても有意な負の相関を示した。

### 【方法 2】

次に、CFP マウスレーザー誘導高眼圧モデルの作製と同時に、基剤またはニルバジピンの腹腔内投与を開始した。処置後は方法 1 と同様に眼圧測定および網膜のフラットマウント標本から RGC 数の測定を行い、各群の眼圧負荷量と RGC 生存率の回帰分析を行った。

#### 【結果 2】

高眼圧処置眼は基剤群 (n=23) およびニルバジピン群 (n=14) 共に、有意な眼圧上昇を示し ( $p<0.01$ )、両群間で眼圧負荷に差はなかった。高眼圧処置眼の RGC 数は、基剤群においては無処置対照眼に対して有意に減少したが、ニルバジピン群においては有意な減少は認められなかった。眼圧負荷量と RGC 生存率は、基剤群において有意な負の相関が認められたが ( $y=-0.078x+107.8$ ,  $r=0.76$ ,  $p<0.001$ )、ニルバジピン群において有意な相関は認められなかった ( $y=-0.015x+99.9$ ,  $r=0.43$ ,  $p=0.128$ )。

#### 【結論】

RGC 特異的に蛍光を発現する CFP マウスを用いて、レーザー誘導高眼圧モデルを作製することができた。本モデルでは侵襲的な標識法を用いることなく眼圧依存性の RGC 障害の定量的評価が可能であった。本モデルは緑内障性視神経障害の研究に有用であると考えられた。さらに、ニルバジピンは本モデルにおいて RGC に対する強力な神経保護効果を示した。本モデルは RGC 保護効果を有する薬物のスクリーニングツールとして有用である。

# 第1章：CFP マウスを用いた高眼圧モデルの作製と眼圧依存性

## 網膜神経節細胞障害の評価方法の確立

### 1-1 緒言

全世界には約 6000 万人の緑内障患者がおり、840 万人は両眼失明であると報告されている<sup>1,2</sup>。原発性開放隅角緑内障は 40 - 80 歳の人口の約 3% (4410 万人) が罹患していると推定されている<sup>3</sup>。緑内障は網膜神経節細胞 (RGC) 軸索の消失を伴う進行性視野欠損を誘発し、これは緑内障性視神経障害 (GON) として知られている<sup>4</sup>。GON の発症には複数の因子が関与しているが、現時点では眼圧下降療法が唯一の有効な治療法である<sup>3,5,6</sup>。高眼圧は緑内障の発症と進行の主要な危険因子であると考えられている<sup>7</sup>。加えて、低酸素、グルタミン酸ストレス、酸化ストレスまたは遺伝的因子のような GON の各種リスク因子が、GON の病因に関連すると考えられている。さらに、アポトーシスによる RGC 死の分子機構に関して、ストレス誘導の RGC 死を防御するための研究が行われている<sup>8-10</sup>。眼圧上昇を含む種々のストレスに対する RGC 保護を標的とする新規治療法が検討されており、眼圧上昇や様々なストレスを誘導することによって、GON を模倣する動物モデルが網膜神経保護薬のスクリーニングのために開発されてきた<sup>11,12</sup>。そして、最も効果的かつ定量的な薬剤のスクリーニングツールは、少数の動物を用いて短時間で薬効評価ができることが望ましい。

GON のメカニズムに関する以前の研究では、実験的に誘発された高眼圧症の動物モデルが用いられている。特に、マウスは比較的安価で取り扱いが容易であり、GON の分子機構を明らかにするために利用可能な種々のノックアウトまたはトランスジェニックマウスの系統が利用できることから大きな利点を有する<sup>13</sup>。しかし、眼のサイズが約 3mm と小さく眼圧データを得ることが困難であることは、緑内障研究におけるマウス眼の使用において大きな課題である。RGC 死に対する高眼圧または様々なストレスの影響を評価する研究では、中脳の上丘からの色素注入による RGC への逆行性染色の後に網膜フラットマウント標本で RGC 数を計測する方法が一般的である<sup>14</sup>。しかし、脳内に侵襲的に色素を注入する煩雑さと副作用の発生および染色効率は課題である。

近年、RGC 特異的にシアン蛍光タンパク質 (CFP) を発現する B6.Cg-TgN(Thy1-CFP)23Jrs/J トランスジェニックマウス (CFP マウス) が GON を可視化するために使用されている<sup>15,16</sup>。すなわち、実験的に誘発された高眼圧症の CFP マウスを作成することが可能ならば、RGC の侵襲的な逆行性染色無しに GON の評価が可能となる。我々のグループや Leung らは、CFP マウスの眼底写真を撮影することにより、非侵襲的な方法で RGC 死をより効果的かつ定量的に評価できることを報告した<sup>17,18</sup>。これらの報告に続いて、CFP マウスを用いた視神経挫滅モデルおよび虚血再灌流モデルによる RGC 死の評価が報告された<sup>19-22</sup>。しかし、実験的に誘発された高眼圧症の CFP マウスを用いた眼圧依存性の RGC 障害については調べられていない。小動物では眼圧上昇とそのモニタリングが特に困難であるため、マウス高眼圧モデルの確立は依然として大きな課題である。Tosi らは、自然発症慢性高眼圧モデルの

DBA2J マウスを CFP マウスと交配させることにより、RGC 障害を報告したが、眼圧負荷と RGC 障害の間の相関は明らかにされていない<sup>21</sup>。我々のグループは、従来の C57BL/6 マウス系統を用いたマウスレーザー誘導高眼圧モデルを報告し<sup>23</sup>、その後、高眼圧マウスの視神経軸索数による部位別障害を高眼圧眼と対側の正常眼で比較したところ、上方線維がより障害されやすいことを報告した<sup>24</sup>。視神経軸索を組織学的に分析し、電子顕微鏡画像で計数したが、眼圧上昇と軸索損傷の間の相関は評価しなかった。

本研究では、CFP マウスを用いたレーザー誘導高眼圧モデルを作製し、経時的な眼圧モニタリングを実施した。さらに、本モデルを網膜神経保護効果を有する薬剤の薬効評価に利用するため、眼圧依存性 RGC 障害を定量化した。

## 1-2 方法

### 1-2-1 動物

全ての研究に使用した動物は、the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research に従い実験を行った。雄性 C57BL/6J マウスは日本 SLC より購入した。Thy1 プロモーター領域を利用して Thy1 発現細胞に蛍光色素である CFP を強制発現させた B6.Cg-TgN(Thy1-CFP)23Jrs/J マウスを、Jackson Laboratory から入手した。全てのマウスは白色チップを敷いた透明ケージにて 12 時間の明暗サイクル下（6:00 点灯；18:00 消灯）にて飼育し、室温の設定は 21℃とした。飼料および飲用水は自由摂取とした。実験には 16 週齢から 24 週齢の雄性マウスを用いた。

### 1-2-2 レーザー誘導高眼圧モデルの作製

各動物の右眼の房水流出を、角膜輪部のレーザー光凝固により遮断することにより、レーザー誘導高眼圧モデルを作製した<sup>23</sup>。右眼を高眼圧処置眼とし、左眼を無処置対照眼とした。ケタミン（100 mg/kg）・キシラジン（9 mg/kg）混合液の腹腔内投与による麻酔後、トロピカミド・フェニレフリン塩酸塩点眼液（ミドリリン P 点眼液；参天製薬株式会社）を 5  $\mu$ L 点眼し、瞳孔を散大させた。次に、マイクロニードルを用いて房水を吸引することにより前房を平坦化し、角膜輪部にレーザー光凝固（波長：532 nm、出力：200 mW、持続時間：0.05 秒、スポットサイズ：200  $\mu$ m）を施行した（図 1A）。術後感染予防のため抗生物質（タリビッド眼軟膏 0.3%；参天製薬株式会社）を眼に塗布した。炎症予防のため、ステロイド点眼液（リンデロン点眼・点耳・点鼻液 0.1%；塩野義製薬株式会社）を 7 日間点眼した。

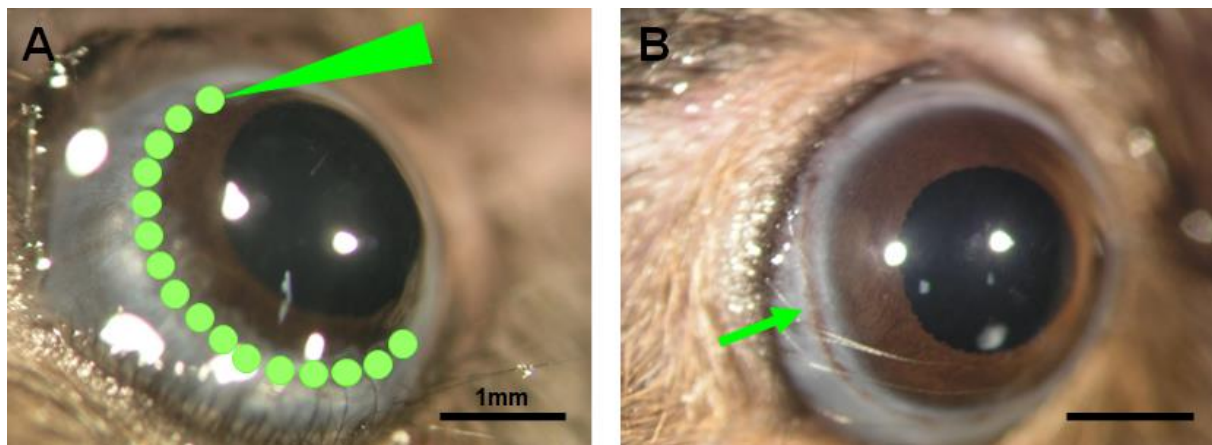


図1 レーザー誘導高眼圧モデルの作製方法

A：房水の吸引により前房を平坦化した後、角膜輪部にレーザー光凝固を施行した。  
B：レーザー光凝固施行8週間後のマウス眼。矢印はレーザー光凝固スポットを示した。

### 1-2-3 眼圧測定

眼圧は既報に従い<sup>23</sup> ケタミン (100 mg/kg) ・キシラジン (9 mg/kg) 混合液の腹腔内投与による麻酔後、マイクロニードル法を用いて8週まで毎週測定した。マイクロニードル法は眼内圧を圧トランスデューサで直接測定するもので、侵襲的だが正確に眼圧を測定できる。測定系は、加熱進展後に研磨して先端径を 50 - 100  $\mu\text{m}$  とした外径 1.0 mm のホウケイ酸塩ガラス製のマイクロニードル (World Precision Instruments) を接続した圧トランスデューサ (Model BLPR; World Precision Instruments) とデータ収集解析システム (PowerLab; ADInstruments) から成るシステムを使用した。マウス前房にマイクロニードルを刺入後、麻酔後 4 - 7 分の間で両眼の前房内圧を連続的に測定し、10 秒間をサンプリングし、平均値を眼圧値とした。

### 1-2-3 眼圧負荷量の計算

各マウスの高眼圧処置眼と無処置対照眼について、それぞれの時間 (x) と眼圧 (IOP) (y) を用いて折れ線グラフを作成し、高眼圧処置眼と無処置対照眼の曲線下面積を  $\text{mmHg} \times \text{日}$  の単位で算出し、眼圧負荷を定量化した。両線に囲まれた領域 ( $\int \Delta \text{IOP}(y) dx$ ) を眼圧負荷量とし、高眼圧処置眼の眼圧上昇による網膜の圧力障害の代替値として定義した (図 2)。



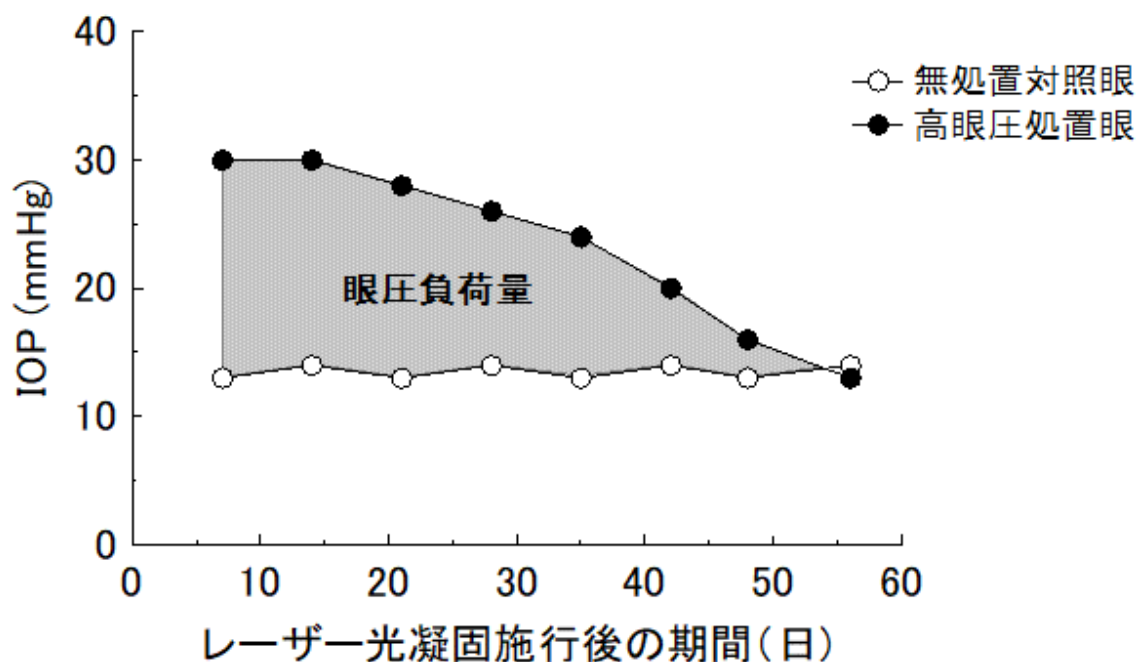


図2 眼圧負荷量の算出方法

高眼圧処置眼と無処置対照眼の時間 (x) と IOP (y) の折れ線グラフに基づいて、両線に囲まれた領域 ( $\int IOP(y) dx$ ) を圧力障害の代替値と定義した。

#### 1-2-4 RGC 数の測定

レーザ光凝固施行 9 週間後に CFP マウスを屠殺した。眼球を摘出し、直ちに 4% パラホルムアルデヒド含有 0.1 M リン酸緩衝生理食塩水で 4℃、1 時間固定した。カバースリップを有するガラススライド上に固定するため、4 箇所放射状切開を行い、網膜を平坦化し、網膜フラットマウント標本作製した。CFP フィルターセットを有する蛍光顕微鏡 (BX50 ; OLYMPUS) により画像撮影した後、網膜の上下耳鼻側それぞれ乳頭から 600  $\mu\text{m}$  間隔で乳頭近傍、中間部、周辺部の 12 箇所、各面積 40000  $\mu\text{m}^2$  の領域をサンプリングした。デジタル画像の識別情報をマスキングし、画像処理ソフトウェア (ImageJ; National Institutes of Health) を用いて RGC 数を手動で計数し、平均密度 (RGCs/ $\text{mm}^2$ ) を各領域について計算した (図 3)。無処置対照眼に対する高眼圧処置眼の RGC 生存率を算出し、眼圧負荷量と RGC 生存率の回帰分析を行った。

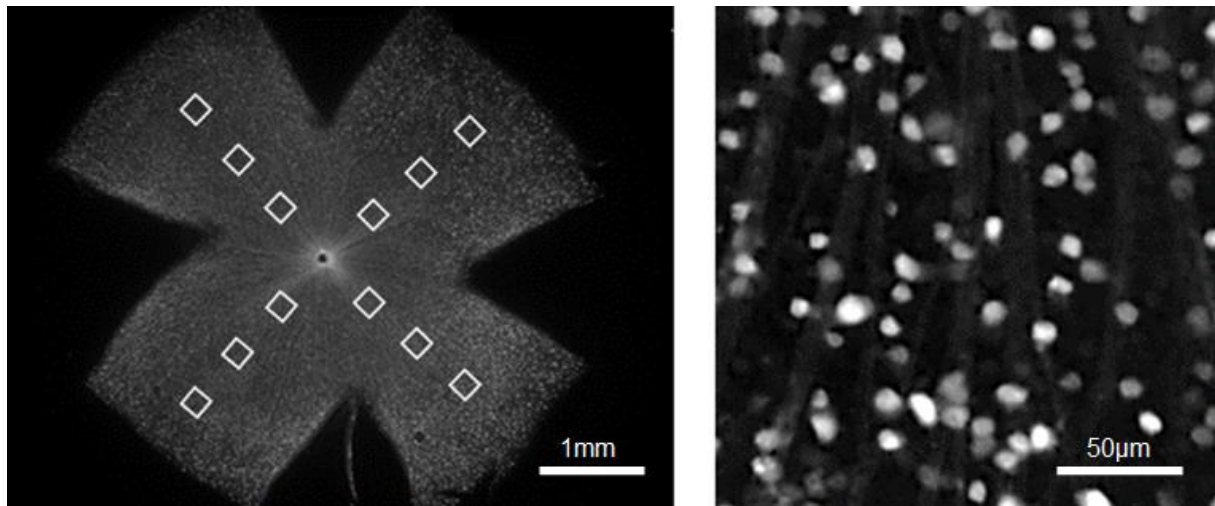


図3 RGC数の測定箇所

A：網膜の上下耳鼻側について、それぞれ視神経乳頭から 600  $\mu\text{m}$  間隔で乳頭近傍、中間部、周辺部の 12 箇所（白枠）をサンプリングした。

B：画像 A の白枠の拡大画像例を示した。

### 1-2-5 組織学的検討

高眼圧処置を行った C57BL/6J マウスについて組織学的検討を行った。レーザー光凝固施行 9 週間後にマウスを屠殺した。眼球を摘出し、直ちに 4% パラホルムアルデヒドおよび 2.5% グルタルアルデヒド含有 0.1 M PBS で固定した。眼球をパラフィン包埋し、連続切片（厚さ 10  $\mu\text{m}$ ）を作製し、切片をヘマトキシリン・エオジン染色し、光学顕微鏡（BX50；OLYMPUS）で観察した。

### 1-2-6 統計解析

データは平均値±標準偏差で示した。Paired Student's t-test を用いて、高眼圧処置眼と無処置対照眼の眼圧を比較した。各網膜領域において眼圧負荷量と RGC 生存率の回帰分析を行った。 $p < 0.05$  を統計学的に有意とみなした。

## 1-3 結果

### 1-3-1 レーザー誘導高眼圧モデルの作製

レーザー光凝固を施行した上強膜静脈領域にレーザースポットが観察された（図 1B）。パラフィン包埋した高眼圧処置眼の組織切片は、隅角が完全に閉鎖していることを示した（図 4B）。周辺部網膜の外眼部および網膜色素上皮には、レーザーの直接照射による損傷の徴候は認められなかった。

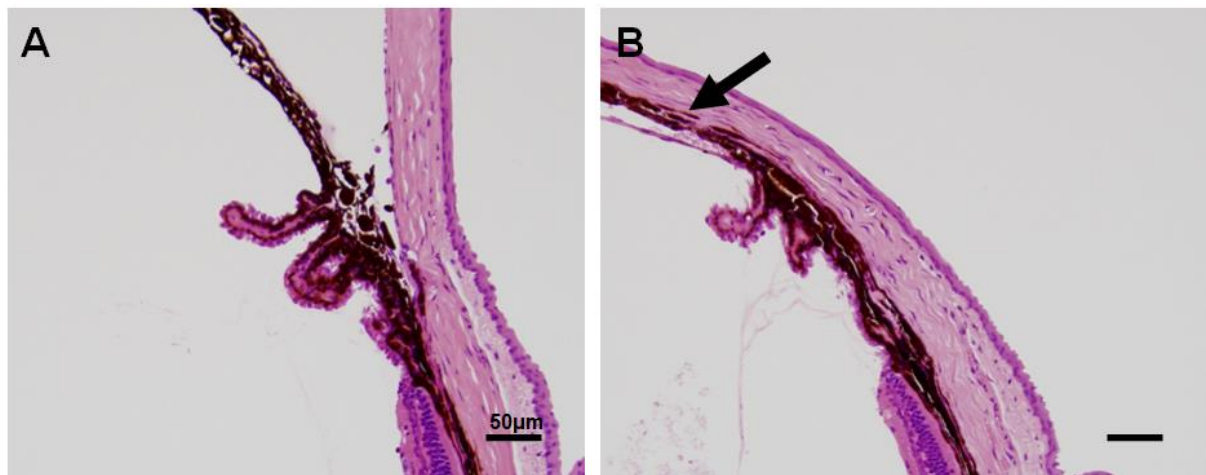


図4 レーザー光凝固施行後の隅角組織切片

A：無処置対照眼（左眼）の前眼部。

B：高眼圧処置眼（右眼）の前眼部。矢印はレーザー光凝固による閉塞隅角を示した。

眼圧上昇幅とその持続時間は各眼で異なっていた。レーザー光凝固を施行した 20 眼のうち 16 眼で、30%を超える眼圧上昇が少なくとも 1 回の測定時点で認められた。しかし、20 眼のうち 4 眼は 30%以下の眼圧上昇を示した。高眼圧処置眼の平均眼圧は 1 週間で  $29.0 \pm 16.2$  mmHg（平均±標準偏差）であり、無処置対照眼に比べて著明に上昇した（無処置対照眼： $13.3 \pm 1.1$  mmHg）。高眼圧処置眼は 7 週まで無処置対照眼に対して有意に高い眼圧を示した（ $p < 0.01$ ）。無処置対照眼の平均眼圧は、8 週間の試験期間中  $13.3 \pm 1.1$  mmHg から  $14.6 \pm 1.4$  mmHg の範囲内の安定した眼圧値を示した。高眼圧処置 20 眼のうち 16 眼（80%）は処置 1 週間後に 30%以上の眼圧上昇を示した。4 週目および 8 週目に、20 眼のうち 11 眼（55%）および 7 眼（35%）が 30%を超える眼圧上昇を維持し、平均眼圧はそれぞれ  $18.9 \pm 5.5$  mmHg および  $17.0 \pm 5.9$  mmHg であった（図 5）。

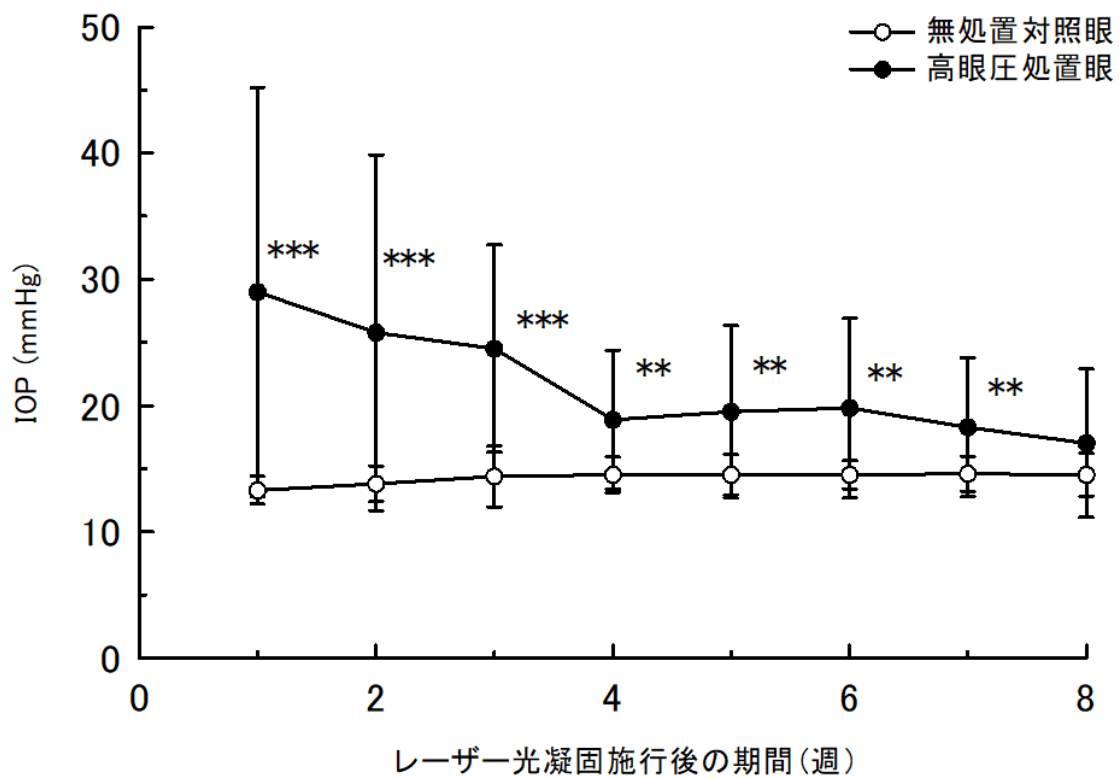


図5 レーザー光凝固施行後の眼圧推移

レーザー光凝固施行後の高眼圧処置眼と無処置対照眼の眼圧の経時推移を示した。データは平均±標準偏差で示した。\*\*  $p < 0.01$  および\*\*\*  $p < 0.001$  (Paired Student's t-test による無処置対照眼との比較)。

### 1-3-2 RGC と視神経乳頭の組織学的分析

CFP マウスの網膜における CFP 発現 RGC の低倍率および高倍率画像の代表例を図6に示した。

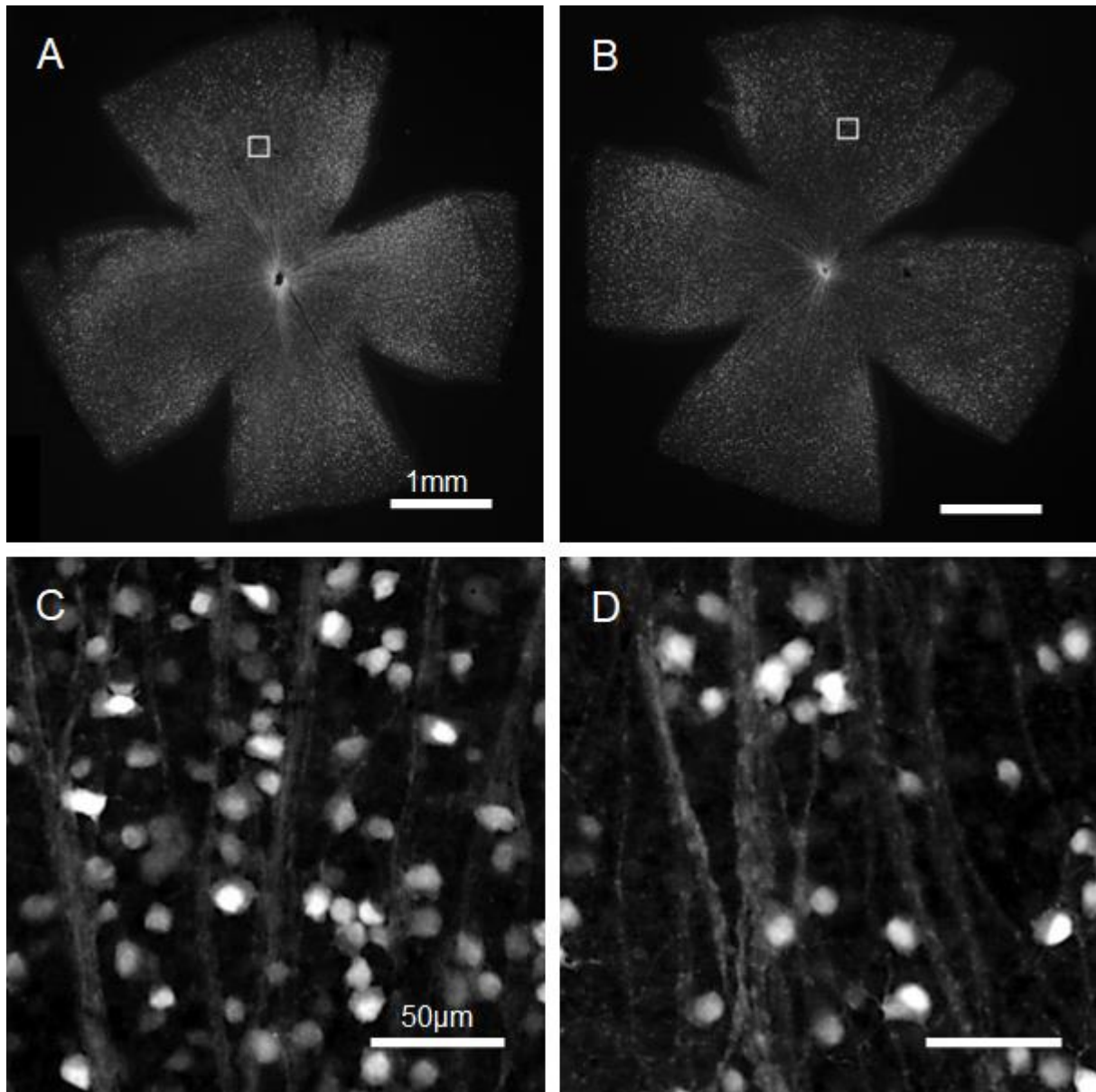
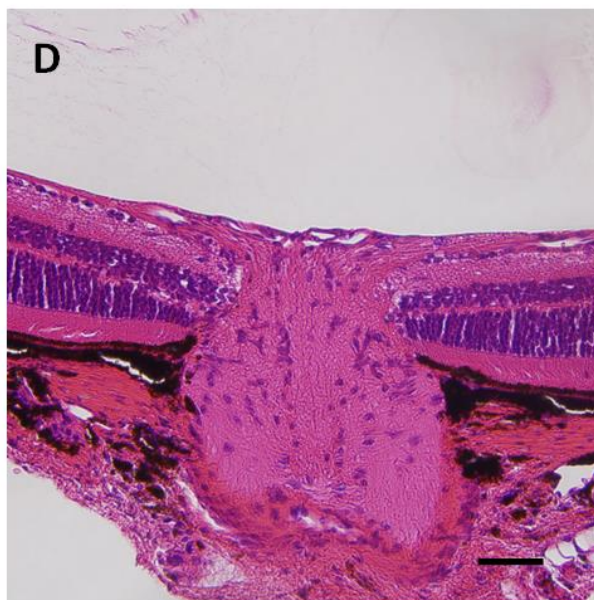
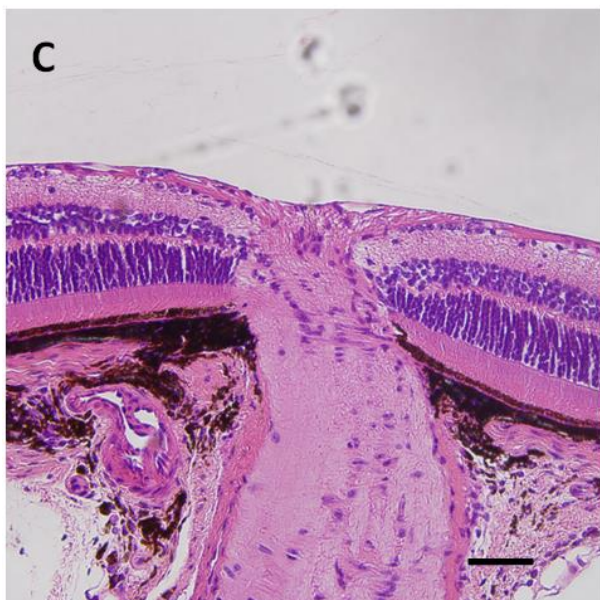
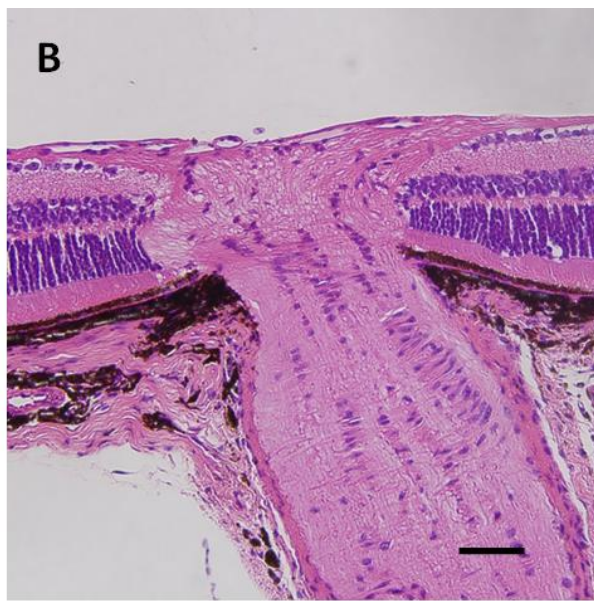
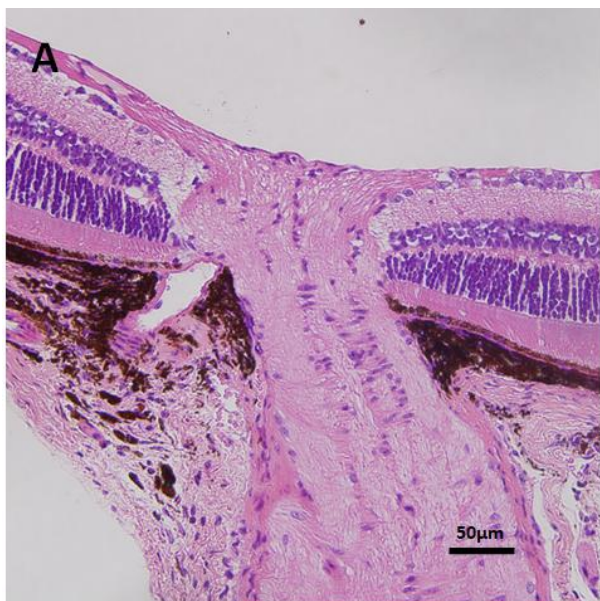


図6 CFP マウス網膜の CFP 発現 RGC

- A：無処置対照眼の網膜フラットマウント標本  
 B：高眼圧処置眼の網膜フラットマウント標本  
 C：無処置対照眼の画像 A の白枠に対応する拡大画像  
 D：高眼圧処置眼の画像 B の白枠に対応する拡大画像

組織学的検討は、視神経変性が眼圧負荷量に依存することを示した（図7）。眼圧負荷量 294 および 557 の高い値を示したマウスを高圧力障害の代表として示した。眼圧負荷量 53 および 126 の低い値を示したマウスを低圧力障害の代表として示した。視神経乳頭の陥凹は、眼圧負荷量 294 と 557 で観察されたが、53 と 126 では観察されなかった。無処置対照眼の視神経乳頭に明らかな変化は観察されなかった。







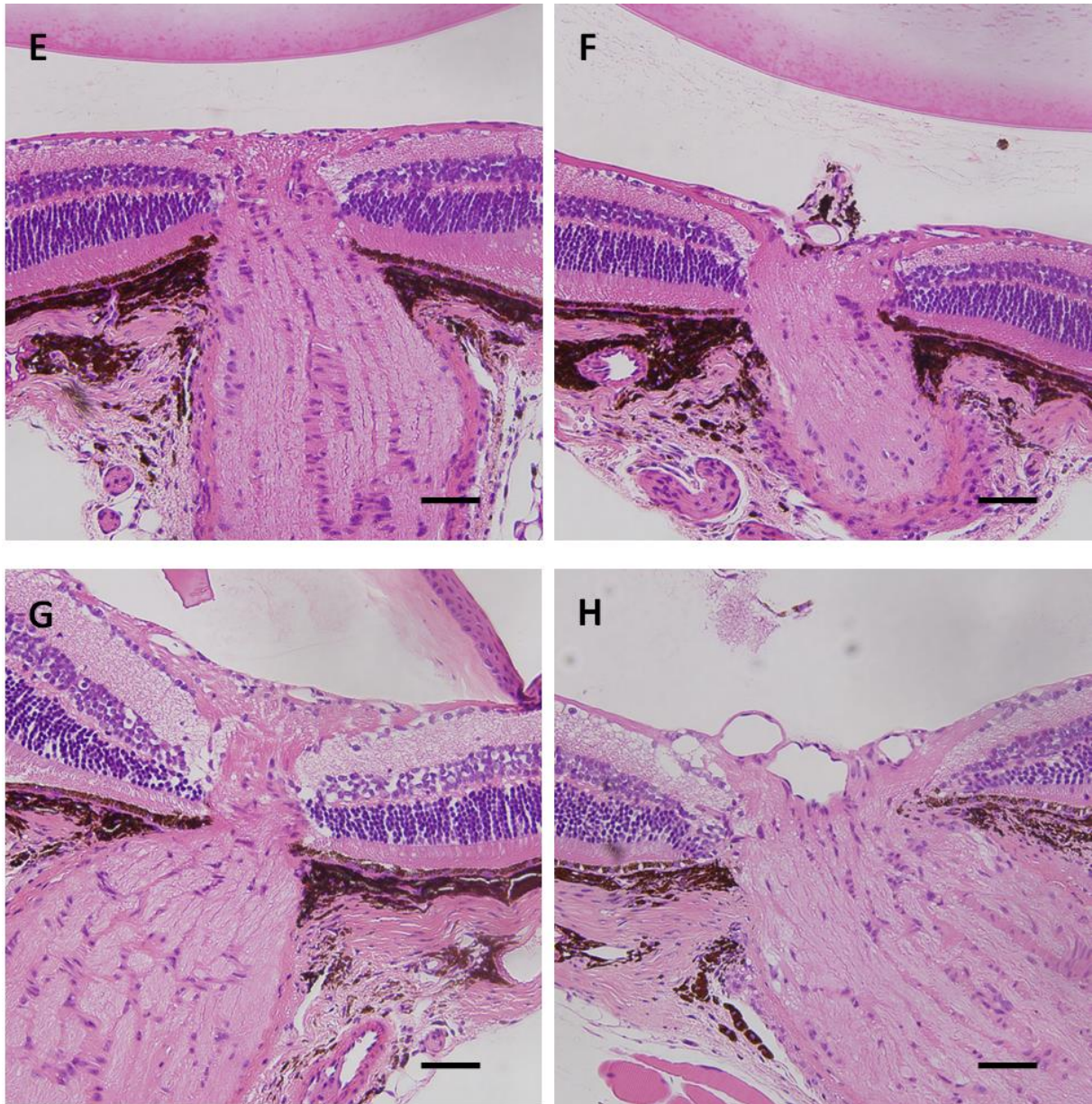


図7 視神経乳頭の組織学的評価

高眼圧処置眼（B、D、F、H）と無処置対照眼（それぞれ A、C、E、G）の光学顕微鏡画像を示した。眼圧負荷量は（B）53，（D）126，（F）294 および（H）557 を示した。

### 1-3-3 回帰分析

各網膜領域において眼圧負荷量と RGC 生存率の回帰分析を行った。網膜全体の眼圧負荷量と RGC 生存率は有意な負の相関を示した ( $y=-0.070x+97.2$ 、 $r=0.75$ 、 $p=0.0008$ ) (図 8A)。さらに、視神経乳頭からの各領域 (乳頭近傍： $y=-0.071x+99.1$ 、 $r=0.61$ 、 $p=0.0119$ 、中間部： $y=-0.077x+99.4$ 、 $r=0.80$ 、 $p=0.0002$ 、周辺部： $y=-0.063x+93.8$ 、 $r=0.73$ 、 $p=0.0012$ )、および各網膜象限 (上側： $y=-0.086x+103.8$ 、 $r=0.64$ 、 $p=0.0082$ 、耳側： $y=-0.075x+110.0$ 、 $r=0.61$ 、 $p=0.0124$ 、下側： $y=-0.065x+91.3$ 、 $r=0.63$ 、 $p=0.0086$ 、鼻側： $y=-0.055x+87.8$ 、 $r=0.51$ 、 $p=0.0427$ ) においても、眼圧負荷量と RGC 生存率の間に有意な負の相関を示した (図 8B-H)。7 領域の相関係数の値の間に有意差は認められず ( $p=0.9737$ )、全ての網膜領域が均一に損傷されていることを示した。



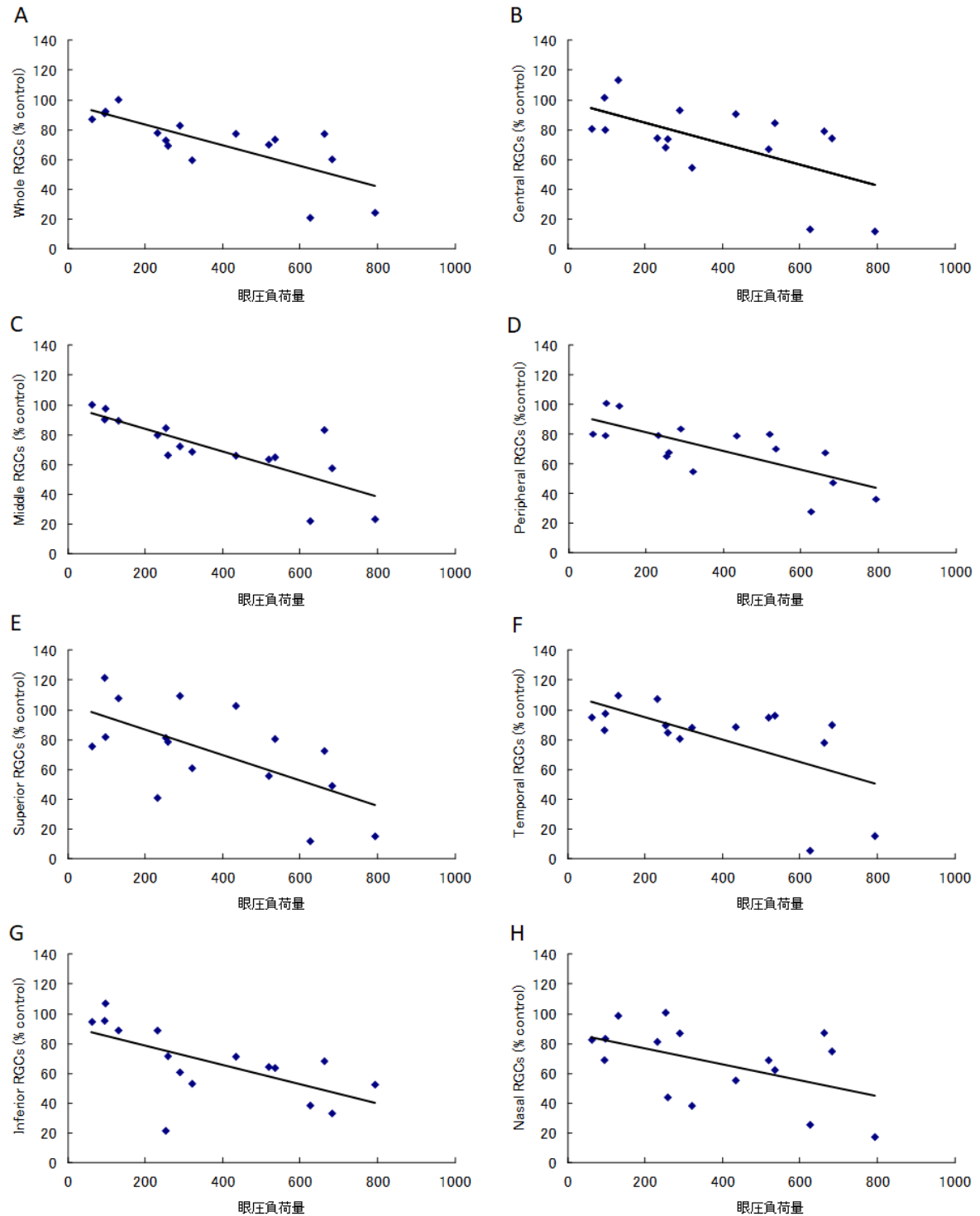


図8 眼圧負荷量と RGC 生存率の回帰分析

(A) 網膜全体 (B) 乳頭近傍 (C) 中間部 (D) 周辺部 (E) 上側 (F) 耳側 (G) 下側 (H) 鼻側に対応する網膜領域の回帰分析を示す。網膜全体 ( $r=0.75$ 、 $p=0.0008$ )、視神経乳頭からの領域 (乳頭近傍 ;  $r=0.61$ 、 $p=0.0119$ 、中間部 ;  $r=0.80$ 、 $p=0.0002$ 、周辺部 ;  $r=0.73$ 、 $p=0.0012$ ) および各網膜四分円の領域 (上側 ;  $r=0.64$ 、 $p=0.0082$ 、耳側 ;  $r=0.61$ 、 $p=0.0124$ 、下側 ;  $r=0.63$ 、 $p=0.0086$ 、鼻側 ;  $r=0.51$ 、 $p=0.0427$ ) は、眼圧負荷量と RGC 生存率の間の有意な負の相関を示した。

## 1-4 考察

レーザー誘導高眼圧モデルの限界として、慢性高眼圧モデルとして理想的な眼圧上昇範囲である 20-30 mmHg の範囲でコントロールすることが難しいことが挙げられる。そこで、各マウスの高眼圧による圧力障害の代替値として眼圧負荷量を用いた。この方法は、本モデルを網膜神経保護効果を有する薬剤の薬効評価に利用するために有用である。マウス高眼圧モデルの確立は大きな挑戦である。現在まで、角膜輪部におけるレーザー光凝固、上強膜静脈の閉塞および前房内へのマイクロビーズの注入が試みられた<sup>23,25-29</sup>。本研究では、相原ら<sup>23</sup>の方法を用い、角膜輪部へのレーザー光凝固を CFP マウスに施行し、慢性の眼圧上昇を示すレーザー誘導高眼圧モデルの作製に成功した。平均眼圧の推移は既報<sup>23</sup>と同程度であった（図 5）。レーザー光凝固を施行した高眼圧処置眼の前房の組織学的検討では、おそらく房水流出量の減少および眼圧上昇後に隅角閉塞を引き起こしたと思われる虹彩前癒着の発生が明らかになった（図 4）。さらに、既報<sup>25</sup>と同様に上強膜静脈領域に限定されたレーザースポットが認められ、房水の流出抵抗が増強された可能性がある。このように、マウスレーザー誘導高眼圧モデルは、慢性閉塞隅角により誘導される眼圧上昇を示す緑内障モデルとして有用である。しかし、人工的に誘導された高眼圧モデルにはいくつかの懸念がある。第 1 の懸念は、レーザー光凝固が一過性の炎症による急性眼圧上昇を引き起こす可能性がある。本研究では一過性の急性眼炎症を抑制するため、ステロイド点眼を 7 日間実施した。第 2 の懸念は、実験期間中（特に初期）の眼圧変動である。我々は、レーザー光凝固施行後の最初の 24 時間以内に眼圧上昇を誘発し、2 日目にピークに達することを確認している。本研究においても、高眼圧は少なくとも 7 週間持続した（図 5）。しかし、レーザー光凝固 8 週間には、65% のマウスで房水流出が回復し、虹彩前癒着の自然治癒が起きた可能性がある。数か月にわたり高眼圧を維持するモデルの確立は課題である。近年、DBA2J マウスが眼圧依存性の RGC 障害の研究に用いられているが、その遺伝的背景は非常に複雑であるため、RGC 障害は眼圧上昇以外の要因によって引き起こされる可能性がある<sup>13</sup>。そのため、遺伝的な異常が無い通常眼圧を示すマウス系統を用いた人工的高眼圧モデルが望まれる。近年、持続性高眼圧を示すマウスのデキサメタゾン誘発高眼圧モデルが報告された<sup>28</sup>。モデル作製時の組織障害が少ないため、将来的にはより理想的かもしれない。第 3 の懸念は、急性眼圧上昇に起因する一過性虚血である。実験的高眼圧モデルはしばしば 40 mmHg 以上の IOP を示す。本研究では、20 匹のマウスのうち 5 匹が 40 mmHg (42 - 60 mmHg) 以上の高眼圧を示した。CFP マウスのバックグラウンド系統である C57BL/6J マウスの平均収縮期血圧は 93 mmHg と報告されており<sup>30</sup>、本研究における眼圧は収縮期血圧より十分低かった。従って、眼圧上昇が主要な網膜血管を閉塞する可能性は低いと考えられた。我々は本評価系を用いて RGC 障害が眼圧上昇の程度と期間に起因することを明らかにしたが、理想としては 20-30 mmHg の眼圧上昇を伴う高眼圧モデルの開発が望ましい。

本研究では、マウス網膜における眼圧依存性の RGC 障害の領域差を検討した。マウス眼における RGC 障害の感受性に関する検討は、RGC 死のメカニズムを理解するために重要である。我々の結果は、網膜の視神経乳頭から乳頭近傍、中間部および周辺部と上下耳鼻側領域の各々の回帰直線の傾きが、-0.086 から -0.055 の狭い範囲に位置することを示した。従って、全ての網膜領域は眼圧上昇により均等に障害されることが示唆された。ラットの高眼圧モデルにおいては、網膜周辺部の RGC 障害は

乳頭近傍の RGC 障害よりも大きいことが複数報告されている<sup>31,32</sup>。我々のグループも以前に、マウス視神経の上方線維は眼圧上昇による感受性が高いことを報告したが<sup>24</sup>、視神経の上方線維に対応する網膜領域はマウスでは明らかにされていない。前房にマイクロビーズを注入したマウス高眼圧モデルにおいて、処置 6 週後の周辺部領域における RGC 障害が 2 週間よりも大きく、周辺部領域の RGC がより障害を受けやすいことが報告されている<sup>29</sup>。我々の研究では、9 週時点の眼圧負荷量と RGC 生存率の相関を評価したため、局所感受性を検出できなかった可能性がある。Laquis らは網膜の端部を周辺部として RGC 数を測定したが<sup>31</sup>、本研究では周辺部を視神経乳頭から 1800  $\mu\text{m}$  と定義した。既報において、眼圧障害を誘導する方法や RGC 障害の評価方法は様々だが、RGC 障害の変動や重症度は視神経内における RGC 密度の領域差、個々のマウス間の遺伝的差異および環境因子の影響により生じることが示唆されている<sup>33</sup>。

CFP マウスレーザー誘導高眼圧モデルにはいくつかの利点がある。RGC を可視化するために以前から用いられてきた逆行性染色法は、中脳の上丘への外因性色素の注入を必要とし、マウスの突然死を含む合併症リスクが高い。加えて、この逆行性染色法は CFP マウスの RGC と比較して、RGC を均一に標識することができない<sup>17</sup>。さらに、CFP 発現 RGC の蛍光はパラホルムアルデヒド固定組織においても安定であった。従って、本モデルは従来の方法と比較してより簡便でより正確に RGC 数を評価できる効率的なツールとなる。対照的に、本モデルにはいくつかの欠点がある。CFP 発現 RGC の利点の 1 つとして、眼底カメラを用いた非侵襲的評価が可能であるが、レーザー光凝固による我々の方法では、角膜や水晶体の混濁を生じることがあり、眼底写真撮影を行う実験は困難である。この点で、より非侵襲的な方法を開発する必要があると考えられる。既報において、CFP マウスの CFP 発現 RGC と逆行性染色による RGC 数との間の有意な差が示された<sup>17,34</sup>。CFP 発現 RGC と非発現 RGC の間にストレスに対する感受性の違いがあった場合、本データは高眼圧症による真の RGC 死を反映しない可能性がある。さらに、RGC における Thy1 発現は細胞死が起こらなくてもストレス条件下で減弱する可能性がある<sup>35</sup>。よって、我々のデータは必ずしも細胞死を意味しない。しかし、これらの限界を踏まえても、網膜神経保護薬のスクリーニングのために本モデルを利用することには十分意義がある。

本モデルの RGC 障害は、眼圧上昇の大きさと期間に相関することから、ヒトの慢性緑内障に似た多くの特徴を有すると考えられる。CFP マウスは種々の遺伝子改変マウスとの交配に利用可能であり、我々の方法は全てのトランスジェニックマウスにおいて高眼圧を誘発することができる。よって、我々の技術は GON の分子機構を明らかにする大きな可能性がある。

## 第2章：CFP マウスレーザー誘導高眼圧モデルの網膜神経節細胞障害に対するカルシウム拮抗薬ニルバジピンの神経保護効果

### 2-1 緒言

GON は眼圧下降治療にもかかわらず進行することが多く、網膜神経保護薬は有望な新しい選択肢である。しかし、脳梗塞<sup>36</sup>、パーキンソン病<sup>37</sup>、アルツハイマー病<sup>38,39</sup>などの神経変性疾患とは異なり、緑内障に対する神経保護薬の有効性は証明されていない<sup>12</sup>。カルシウム拮抗薬（CCB）は高血圧症の治療に承認されている薬剤である。血管壁の平滑筋細胞へのカルシウム流入を阻害することにより、血管拡張を促進し、血管抵抗を低下させ、最終的に血圧を低下させて血流を増加させる。そして、CCB の緑内障治療薬としての可能性を示唆する報告がなされている。正常眼圧緑内障患者において、ニフェジピン<sup>40</sup>、ブロビンカミン<sup>41</sup>、ジルチアゼム、ニフェジピン、ベラパミル<sup>42</sup>およびニルバジピン<sup>43</sup>は視野進行を抑制した報告がある。加えて、ニフェジピンとブロビンカミンは視神経乳頭の末梢血流を増加させ<sup>40,41</sup>、ジルチアゼム、ニフェジピンとベラパミルは視神経障害を改善し<sup>42</sup>、ニルバジピンは3年間にわたり後部脈絡膜循環血流を増加させた<sup>43</sup>。これらデータは、CCB が血流を改善することにより緑内障の進行を防ぐ可能性を示す。これらの CCB の中でも、ニルバジピンは最も脂溶性の高い構造<sup>44-47</sup>と最も高い網膜蓄積率<sup>47</sup>を有する。よって、ニルバジピンの網膜神経保護作用は明らかではないが、緑内障の有望な治療薬となる可能性がある。

我々は、CFP マウスレーザー誘導高眼圧モデルを用いた眼圧依存性 RGC 障害の定量的評価系を用いて、ニルバジピンの RGC 保護効果を検討した。

### 2-2 方法

#### 2-2-1 動物

全ての研究に使用した動物は、the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research に従い実験を行った。Thy1 プロモーター領域を利用して Thy1 発現細胞に蛍光色素である CFP を強制発現させた B6.Cg-TgN(Thy1-CFP)23Jrs/J マウスを、Jackson Laboratory から入手した。全てのマウスは白色チップを敷いた透明ケージにて 12 時間の明暗サイクル下（6:00 点灯；18:00 消灯）にて飼育し、室温の設定は 21℃とした。飼料および飲用水は自由摂取とした。実験には 18 週齢以上の雄性マウスを用いた。

#### 2-2-2 レーザー誘導高眼圧モデルの作製

各動物の右眼の房水流出を、角膜輪部のレーザー光凝固により遮断することにより、レーザー誘導高眼圧モデルを作製した<sup>23</sup>。右眼を高眼圧処置眼とし、左眼を無処置対照眼とした。ケタミン（100 mg/kg）・キシラジン（9 mg/kg）混合液の腹腔内

投与による麻酔後、トロピカミド・フェニレフリン塩酸塩点眼液（ミドリン P 点眼液；参天製薬株式会社）を 5  $\mu$ L 点眼し、瞳孔を散大させた。次に、マイクロニードルを用いて房水を吸引することにより前房を平坦化し、角膜輪部にレーザー光凝固（波長：532 nm、出力：200 mW、持続時間：0.05 秒、スポットサイズ：200  $\mu$ m）を施行した（図 1）。術後感染予防のため抗生物質（タリビッド眼軟膏 0.3%；参天製薬株式会社）を眼に塗布した。炎症予防のため、ステロイド点眼液（リンデロン点眼・点耳・点鼻液 0.1%；塩野義製薬株式会社）を 7 日間点眼した。レーザー光凝固施行 1 週間後に測定した眼圧値を用いて、レーザー誘導高眼圧モデルの成功を判定した。初回眼圧測定時に眼圧が 40 mmHg を超えて上昇または 10 mmHg 未満に低下したマウスは除外した。

### 2-2-3 薬剤投与

ニルバジピン（和光純薬株式会社）は、使用時にエタノール/ポリエチレングリコール 400/蒸留水（2:1:7）の混合液に 0.1 mg/mL になるように溶解し、これをさらに生理食塩液で 10 倍希釈した溶液を腹腔内に 10.0 ml/kg の量で投与した（最終用量 0.1 mg/kg）<sup>48-50</sup>。ニルバジピンまたは基剤を各 30 匹ずつレーザー光凝固施行直後から 1 日 1 回 8 週間腹腔内投与した。

### 2-2-4 眼圧測定

眼圧は既報に従い<sup>23</sup>、ケタミン（100 mg/kg）・キシラジン（9 mg/kg）混合液の腹腔内投与による麻酔後、マイクロニードル法を用いて 8 週まで毎週測定した。マイクロニードル法は眼内圧を圧トランスデューサで直接測定するもので、侵襲的だが正確に眼圧を測定できる方法である。測定系は、加熱進展後に研磨して先端径を 50-100  $\mu$ m とした外径 1.0 mm のホウケイ酸塩ガラス製のマイクロニードル（World Precision Instruments）を接続した圧トランスデューサ（Model BLPR; World Precision Instruments）とデータ収集解析システム（PowerLab; ADInstruments）から成るシステムを使用した。マウス前房にマイクロニードルを刺入後、麻酔後 4-7 分の間で両眼の前房内圧を連続的に測定し、10 秒間をサンプリングし、平均値を眼圧値とした。

### 2-2-5 眼圧負荷量の計算

各マウスの高眼圧処置眼と無処置対照眼について、それぞれの時間（x）と眼圧（IOP）（y）を用いて折れ線グラフを作成し、高眼圧処置眼と無処置対照眼の曲線下面積を mmHg $\times$ 日の単位で算出し、眼圧負荷を定量化した。両線に囲まれた領域（ $\int IOP(y) dx$ ）を眼圧負荷量とし、高眼圧処置眼の眼圧上昇による網膜の圧力障害の代替値として定義した（図 2）。

### 2-2-6 RGC 数の測定

レーザー光凝固施行 9 週間後に CFP マウスを屠殺した。眼球を摘出し、直ちに 4% パラホルムアルデヒド含有 0.1 M リン酸緩衝生理食塩水で 4 $^{\circ}$ C、1 時間固定した。カバースリップを有するガラススライド上に固定するため、4 箇所放射状切開を行い、網膜を平坦化し、網膜フラットマウント標本作製した。CFP フィルターセッ

トを有する蛍光顕微鏡（BX50；OLYMPUS）により画像撮影した後、網膜の上下耳鼻側それぞれ視神経乳頭から 600  $\mu\text{m}$  間隔で乳頭近傍、中間部、周辺部の 12 箇所、各面積 40000  $\mu\text{m}^2$  の領域をサンプリングした。デジタル画像の識別情報をマスキングし、画像処理ソフトウェア（ImageJ; National Institutes of Health）を用いて RGC 数を手動で計数し、平均密度（RGCs/ $\text{mm}^2$ ）を各領域について計算した（図 3）。無処置対照眼に対する高眼圧処置眼の RGC 生存率を算出し、眼圧負荷量と RGC 生存率の回帰分析を行った。

### 2-2-7 統計解析

データは平均値±標準偏差で示す。Paired Student's t-test を用いて、高眼圧処置眼と無処置対照眼の眼圧を比較した。各薬剤群の高眼圧処置眼と無処置対照眼の各曲線下面積の比較は Paired Student's t-test を用いた。各薬剤群間の高眼圧処置眼または無処置対照眼の各曲線下面積の比較は Unpaired Student's t-test を用いた。各薬剤群の高眼圧処置眼と無処置対照眼の RGC 密度の比較は Paired Student's t-test を用いた。各薬剤群間の高眼圧処置眼または無処置対照眼の RGC 密度の比較は Aspin-Welch test を用いた。各網膜領域において眼圧負荷量と RGC 生存率の回帰分析を行った。 $p < 0.05$  を統計的に有意とみなした。

## 2-3 結果

### 2-3-1 レーザー誘導高眼圧モデルの作製

レーザー光凝固施行 1 週間後に測定した眼圧値を用いて、レーザー誘導高眼圧モデルの成功を判定した。一部の眼は、高眼圧処置後に 10 mmHg 未満に低下する眼萎縮の発症（基剤群：5 例、ニルバジピン群：9 例）または緑内障モデルとして使用するには高い 40 mmHg を超える眼圧上昇（基剤群：2 例、ニルバジピン群：7 例）を示したため除外した。よって、基剤群 30 例中 23 例、ニルバジピン群 30 例中 14 例で成功した。基剤群において、レーザー光凝固施行 1 週間後の高眼圧処置眼の平均眼圧は  $23.5 \pm 8.6$  mmHg を示し、無処置対照眼の  $14.8 \pm 0.8$  mmHg よりも有意に高く、8 週間においても有意に高かった（Paired Student's t-test ;  $p < 0.001$ ）（図 9A）。さらに、高眼圧処置眼と無処置対照眼の平均眼圧は、8 週間の実験期間を通して安定していた（高眼圧処置：20.8 - 24.7 mmHg、無処置対照眼：14.8 - 15.7 mmHg）。同様に、ニルバジピン群において、レーザー光凝固施行 1 週間後の高眼圧処置眼の平均眼圧は  $22.0 \pm 6.2$  mmHg を示し、無処置対照眼の  $14.9 \pm 1.5$  mmHg より有意に高かった

（Paired Student's t-test ;  $p < 0.01$ ）（図 9B）。さらに、高眼圧処置眼と無処置対照眼の平均眼圧は、8 週間の実験期間を通して安定していた（高眼圧処置：20.6 - 24.2 mmHg、無処置対照眼：14.7 - 15.7 mmHg）。

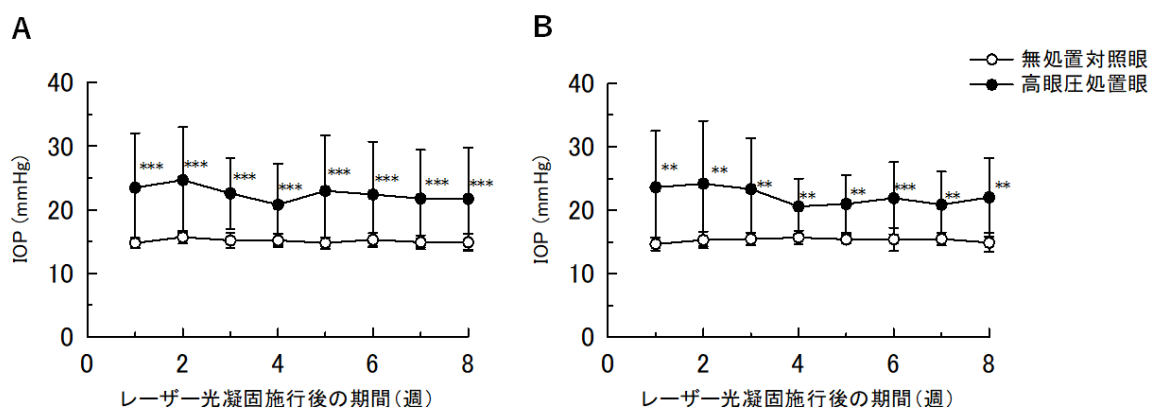


図9 レーザー光凝固施行後の基剤群およびニルバジピン群の眼圧推移  
レーザー光凝固施行後の高眼圧処置眼と無処置対照眼の眼圧の経時推移を示した。

A：基剤群の眼圧推移

B：ニルバジピン群の眼圧推移

データは平均±標準偏差で示した。\*\* p<0.01 および\*\*\* p<0.001 (Paired Student's t-test による無処置対照眼との比較)。

### 2-3-3 各薬剤群における高眼圧処置眼と無処置対照眼の曲線下面積の比較

圧力障害の代替値として算出した曲線下面積 (mmHg×日) において、両薬剤群の高眼圧処置眼に対して算出した各曲線下面積は、無処置対照眼よりも有意に高かった (基剤群の無処置対照眼 730±31 vs 基剤群の高眼圧処置眼 1085±256、Paired Student's t-test ; p<0.001) (ニルバジピン群の無処置対照眼 739±37 vs ニルバジピン群の高眼圧処置眼 1059±253、Paired Student's t-test ; p<0.001) (表1)。両薬剤群間の無処置対照眼または高眼圧処置眼で比較しても、各曲線下面積に有意差はなかった (Unpaired Student's t-test ; 基剤群 p=0.414、ニルバジピン群 p=0.761)。

表1 基剤群およびニルバジピン群の高眼圧処置眼と無処置対照眼の各曲線下面積 (mmHg×日) の比較

	無処置対照眼		高眼圧処置眼	
	基剤群	ニルバジピン群	基剤群	ニルバジピン群
曲線下面積	730 ± 31	739 ± 37	1085 ± 256***	1059 ± 253***

\*\*\* p<0.001 (Paired Student's t-test による無処置対照眼との比較)

### 2-3-4 RGC 密度の比較

両薬剤群の網膜の視神経乳頭から測定した乳頭近傍 (600 μm)、中間部 (1200 μm)、周辺部 (1800 μm) および網膜全体の RGC 密度を算出した。基剤群において、全ての箇所が高眼圧処置眼は無処置対照眼よりも有意に低い RGC 密度を示した (Paired Student's t-test ; 全領域で p<0.001) (表2)。ニルバジピン群において、高眼圧処置眼と無処置対照眼の間に RGC 密度の有意な差を示す領域はなかった (Paired Student's t-test ; p=0.094、0.150、0.171 および 0.057)。無処置対照眼の RGC

密度は、薬剤群間で有意差はみられなかったが（Aspin-Welch test ;  $p=0.716$ 、 $0.937$ 、 $0.100$  および  $0.507$ ）、高眼圧処置眼においてはニルバジピン群の方が基剤群よりも有意に RGC 密度が高かった（Aspin-Welch test ;  $p=0.020$ 、 $0.014$ 、 $0.021$  および  $0.014$ ）（表 2）。

表 2 網膜の視神経乳頭から測定した乳頭近傍、中間部、周辺部および網膜全体の RGC 密度

	RGC 密度 (RGCs/mm <sup>2</sup> )			
	無処置対照眼		高眼圧処置眼	
	基剤群	ニルバジピン群	基剤群	ニルバジピン群
乳頭近傍	1449 ± 150	1466 ± 970	1139 ± 376 <sup>***</sup>	1361 ± 176 <sup>§</sup>
中間部	1471 ± 161	1467 ± 120	1181 ± 366 <sup>***</sup>	1401 ± 139 <sup>§</sup>
周辺部	1465 ± 137	1389 ± 127	1148 ± 326 <sup>***</sup>	1336 ± 140 <sup>§</sup>
網膜全体	1462 ± 120	1440 ± 690	1156 ± 351 <sup>***</sup>	1366 ± 131 <sup>§</sup>

\*\*\*  $p < 0.001$  (Paired Student's t-test による無処置対照眼との比較)

§  $p < 0.05$  (Aspin-Welch test による基剤群の高眼圧処置眼の RGC 密度との比較)

### 2-3-5 回帰分析

両薬剤群の各網膜領域において眼圧負荷量と RGC 生存率の回帰分析を行った。基剤群は全ての領域で眼圧負荷量と RGC 生存率の間の有意な負の相関を示した（網膜全体： $y=-0.078x+107.8$ 、 $r=0.76$ 、 $p<0.001$ ；乳頭近傍： $y=-0.084x+109.9$ 、 $r=0.71$ 、 $p<0.001$ ；中間部： $y=-0.080x+109.6$ 、 $r=0.78$ 、 $p<0.001$ ；周辺部： $y=-0.071x+105.0$ 、 $r=0.71$ 、 $p<0.001$ ）（図 10A-D）。しかし、ニルバジピン群では有意な相関はみられなかった（網膜全体： $y=-0.015x+99.9$ 、 $r=0.43$ 、 $p=0.128$ ；乳頭近傍： $y=-0.023x+100.9$ 、 $r=0.40$ 、 $p=0.154$ ；中間部： $y=-0.015x+100.7$ 、 $r=0.34$ 、 $p=0.228$ ；周辺部： $y=-0.010x+99.8$ 、 $r=0.26$ 、 $p=0.370$ ）（図 11A-D）。代表的な網膜像を図 12A-H に示した。



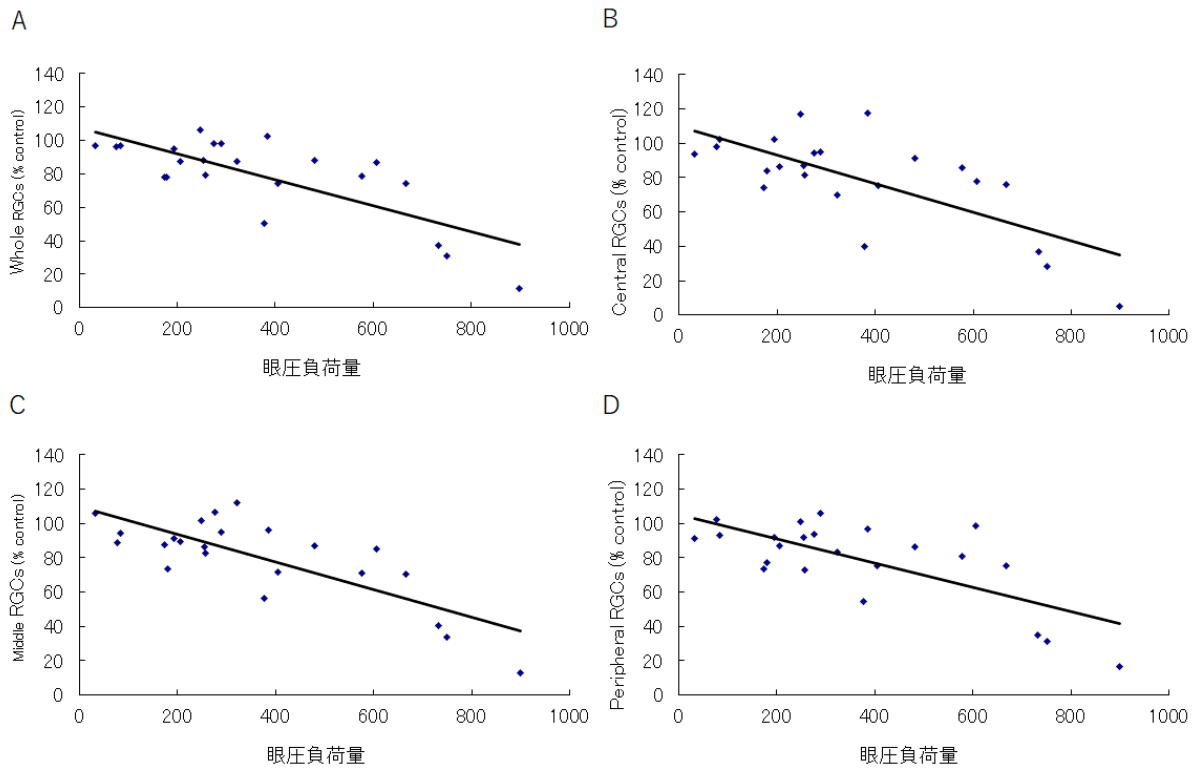


図 10 基剤群の眼圧負荷量と RGC 生存率の回帰分析  
 基剤群の網膜全体 (A)、乳頭近傍 (B)、中間部 (C) および周辺部 (D) に対する回帰分析を示した (網膜全体 :  $r=0.76$ 、 $p<0.001$  ; 乳頭近傍 :  $r=0.71$ 、 $p<0.001$  ; 中間部 :  $r=0.78$ 、 $p<0.001$  ; 周辺部 :  $r=0.71$ 、 $p<0.001$ ) 。

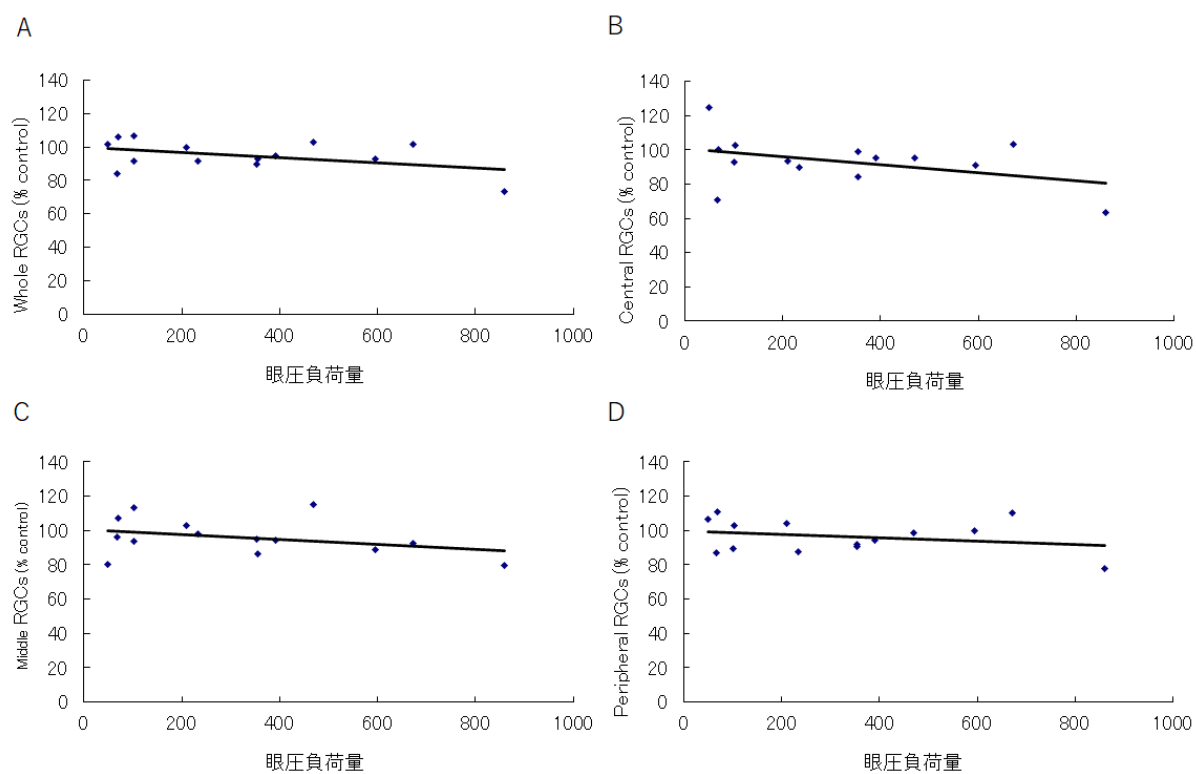


図 11 ニルバジピン群の眼圧負荷量と RGC 生存率の回帰分析  
 ニルバジピン群の網膜全体 (A)、乳頭近傍 (B)、中間部 (C) および周辺部 (D) に対する回帰分析を示した (網膜全体 :  $r=0.43$ 、 $p=0.128$  ; 乳頭近傍 ;  $r=0.40$ 、 $p=0.154$  ; 中間部 ;  $r=0.34$ 、 $p=0.228$  ; 周辺部 :  $r=0.26$ 、 $p=0.370$ ) 。

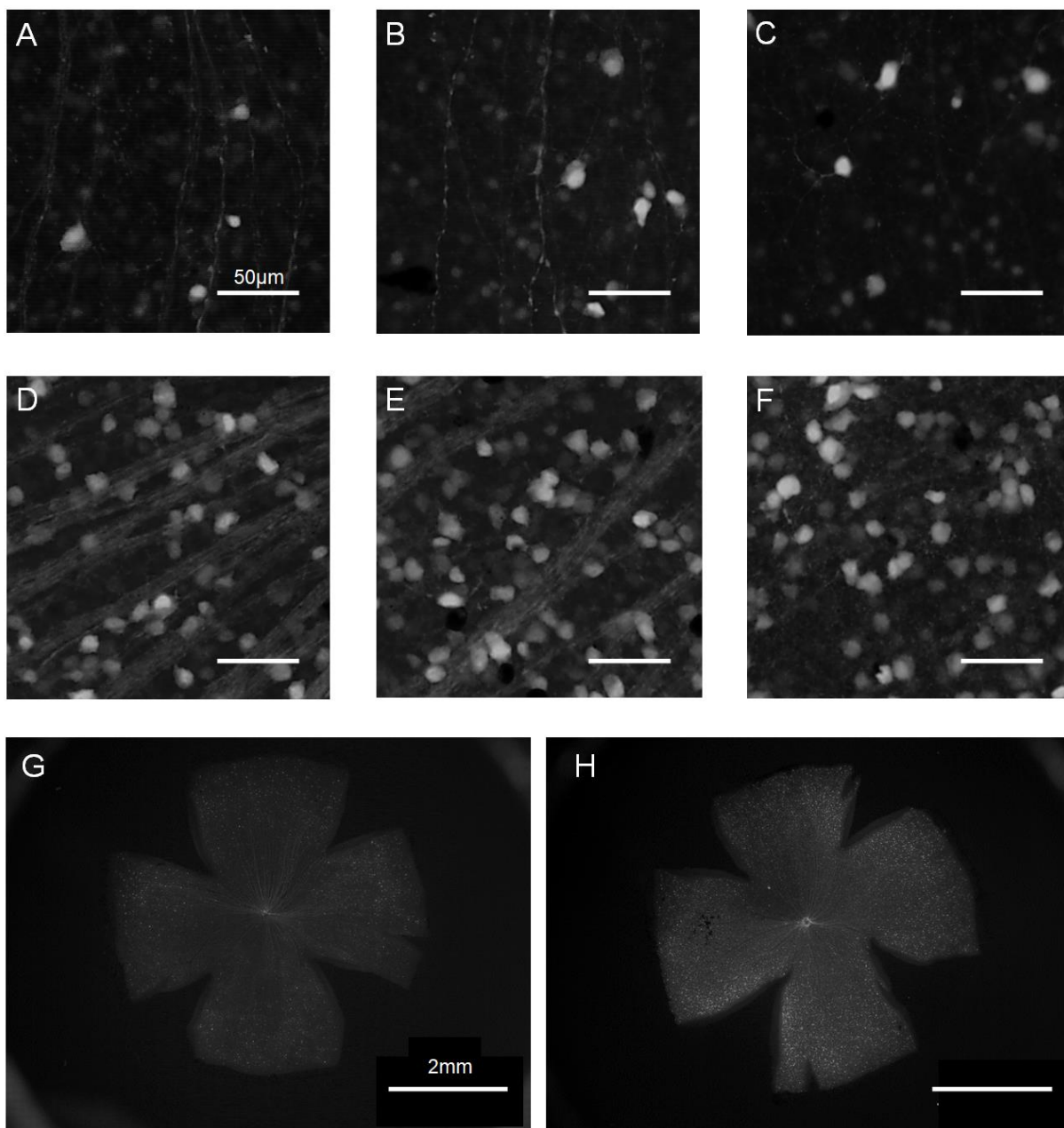


図 12 両薬剤群の各網膜領域における高眼圧処置眼の網膜像  
 基剤群における高眼圧処置眼の網膜の乳頭近傍 (A)、中間部 (B)、周辺部 (C)  
 および網膜全体 (G) の代表的な網膜像。ニルバジピン群における高眼圧処置眼の網  
 膜の乳頭近傍 (D)、中間部 (E)、周辺部 (F) および網膜全体 (H) の代表的な網  
 膜像。

## 2-4 考察

本研究では、眼に遺伝的な異常が認められていない通常眼圧を示す CFP マウスを用いてレーザー誘導高眼圧モデルを作製し、高眼圧を主因とする RGC 障害に対するニルバジピンの薬効評価に成功した。GON は機械的ストレスおよび眼圧による血液循環障害によって引き起こされると考えられている<sup>51</sup>。近年の改良された眼圧測定技術は、マウスの緑内障モデルの研究を可能にした。マウスの利用は取り扱いの容易さ、トランスジェニック技術の応用、およびコスト<sup>23,52,53</sup>の点で大きな利点がある。さらに、複数のマウス緑内障モデルの開発により、緑内障の根本原因に関する手がかりが得られている<sup>23,25,54</sup>。高眼圧症を自然発症する DBA2J マウスは緑内障研究にしばしば使用されているが、視神経変化が高眼圧症とは無関係に生じ、免疫炎症反応等の他の因子によっても生じることが報告されている<sup>55,56</sup>。我々のグループは、以前に正常マウス眼を有する CFP マウスを用いて、緑内障モデルを模した虚血再灌流モデルにおける RGC 死の評価を報告している。110 mmHg の高眼圧負荷で 60 分間虚血を生じさせた後に再灌流した後、毎週眼底撮影を行った結果、処置後 1、2、3 および 4 週間後に 34.2%、24.1%、23.0%、および 22.2% の RGC 死を観察した。さらに、RGC 層の菲薄化および RGC 数の減少も組織学的評価によって確認した<sup>17</sup>。そして、我々はヒトの原発開放隅角緑内障により近いモデルとして、軽度の高眼圧を示すレーザー誘導高眼圧モデルの作製に成功し、眼圧負荷量と RGC 生存率の相関を示した。組織学的評価においても眼圧負荷による視神経の変性を確認した<sup>57</sup>。

本研究では、網膜神経保護効果を有する薬剤を容易にスクリーニングできる新しい評価系を考案し、CFP マウスレーザー誘導高眼圧モデルで RGC 障害に対するニルバジピンの RGC 保護効果を示した。本評価系は逆行性染色のような侵襲的技術無しに RGC を同定して計数することができ、対側眼を無処置コントロール眼として利用するため、評価が容易である。比較的低予算で短期間に網膜神経保護薬の前臨床効果を評価できるスクリーニング系となる。

実験的緑内障モデルの課題の 1 つは、各眼における眼圧上昇値とその持続期間の変動である。この問題に対処するため、本研究では眼圧値と時間の曲線下面積を用いて各眼の圧力障害を定量化し、眼圧負荷量と RGC 生存率の間に負の相関を見出した<sup>57</sup>。本研究は、眼圧上昇は RGC 障害の危険因子であり、RGC 障害の程度は眼圧に依存するという見解を支持した（表 2、図 10）。対照的に、同様の眼圧負荷にもかかわらず、ニルバジピンの投与は眼圧依存性の RGC 死を減少させた（表 2、図 11）。本研究で観察された網膜神経保護作用は、ニルバジピンが緑内障患者の視野進行を阻害した臨床報告を強く支持する<sup>42,43</sup>。ニルバジピンは、マウスモデルの眼圧負荷による RGC 死の抑制に加えて、少数の緑内障患者を対象とした臨床試験においても同様の効果を示した<sup>58</sup>。この網膜神経保護効果のメカニズムの 1 つとして考えられるのは眼血流の改善である。カルシウム拮抗薬（CCB）は高血圧症の治療に承認されている薬剤である。血管壁の平滑筋細胞へのカルシウム流入を阻害することにより、血管拡張を促進し、血管抵抗を低下させ、最終的に血圧を低下させて血流を増加させる。ニフェジピン、ニカルジピンおよびジルチアゼムのような他の CCB と比べ、ニルバジピン（ジヒドロピリジン系 CCB）は、より血管選択的であり、心筋より強く血管平滑筋に結合する<sup>46,59</sup>。さらに、ニルバジピンは脳血管選択性がより高く<sup>60</sup>、他の CCB よりも脳循環を改善すると報告されている<sup>58</sup>。つまり、ニルバジピンは他の CCB と比較しても容易に中枢神経系に到達し、局所の脳血流量を増加さ

せる可能性がある<sup>61,62</sup>。CCBは動物実験において、脈絡膜、網膜および視神経乳頭の血流を増加させた報告がある<sup>63-65</sup>。そして、ニルバジピンの末梢血流改善効果が複数報告されている。正常眼圧緑内障患者にニルバジピンを投与した臨床研究では、眼球後部の血管にカラードップラーイメージングを実施し、網膜中心動脈および短後毛様動脈における血流の有意な増加を認め、血管抵抗を減少させた<sup>66</sup>。同様にレーザードップラーフローサイトメトリーによる検討では、視神経乳頭血流および眼球後部の血管抵抗を減少させた<sup>67</sup>。同じくカラードップラーイメージングで眼動脈抵抗指数を改善したと報告されている<sup>68</sup>。また、開放隅角緑内障患者の緑内障性視野障害の局在に一致する短後毛様動脈の血流速度低下と末梢血管抵抗上昇が報告されている<sup>69</sup>。慢性高眼圧症は、虚血につながる視神経乳頭微小循環の構造変化を誘発する。虚血ストレスは、細胞内カルシウムイオン濃度の過剰な増加を介し、グリア細胞とRGCのアポトーシスを誘導する。一方、ニルバジピンは血流を増加させるだけでなく、細胞内カルシウムイオン濃度の過剰な上昇を直接阻害することにより、神経細胞を保護することが報告されている。Otoriらはラット網膜の培養細胞を用いた実験において、グルタミン酸暴露に対するニルバジピンの効果を検討し、ニルバジピンが神経細胞へのカルシウム流入を抑制し、アポトーシスを阻害することを報告している<sup>70</sup>。また、ニルバジピンは遺伝子発現を変化させることが報告されている。網膜色素変性症モデルのRCSラットを用いた実験では、ニルバジピンは網膜において、アポトーシスに関連するカスパーゼ1およびカスパーゼ2の遺伝子発現を抑制したと報告している<sup>48,71</sup>。他の報告では、ニルバジピンがCD45、癌原遺伝子ErbAおよびJAK2等のアポトーシス関連遺伝子の発現を減少させ、線維芽細胞増殖因子2 (FGF2)を増加させることを報告した<sup>72-74</sup>。さらに、網膜変性症 (rd) マウスを用いた実験では、ニルバジピンは、カルシウム代謝に関与するタンパク質、アポトーシス関連タンパク質、細胞シグナル伝達関連タンパク質、神経伝達物質、アポトーシスを誘導することが知られているカスパーゼ3、9、14の発現を調節することによって神経細胞を保護したことが報告されている<sup>49</sup>。Takanoらは、Synaptogyrin IおよびFGF2の増加とカスパーゼ依存性アポトーシスの減少が神経保護に重要な役割を果たしていると推測した<sup>49</sup>。加えて、rdマウスを用いた実験で、ニルバジピンは毛様体神経栄養因子 (CNTF) およびFGF等の成長因子および神経栄養因子をコードする遺伝子発現と関係した蛋白質合成を増加し、タンパク質分解およびアポトーシス関連遺伝子の発現を低下させたことを報告している<sup>50</sup>。CNTFは網膜変性を遅らせることが報告されており、ニルバジピンはCNTFの発現を増加させることによって神経細胞を保護する可能性がある<sup>75,76</sup>。

既報は、ニルバジピンが眼血流を改善することを示す。しかし、CCBは眼灌流圧に関連する血圧および眼圧の変化にも影響を及ぼす可能性がある。これらの因子はいずれも緑内障と関連している<sup>77,78</sup>。本研究では血圧を評価していないが、臨床試験において、ニルバジピンは全身性高血圧症患者の血圧を有意に低下させたが、正常血圧には影響しなかったと報告されている<sup>45,79</sup>。本研究において、無処置対照眼の眼圧は既報<sup>64</sup>と同様に基剤群とニルバジピン群の間で差はなかったことから、ニルバジピンは眼灌流圧に影響することなく、網膜血流を改善する可能性が想定される。

動物モデルを用いた報告は、網膜疾患の治療に対するニルバジピンの有用性を示している。ニルバジピン投与により、急性網膜虚血<sup>47</sup>および癌関連網膜症<sup>80</sup>のラットモデルにおける網膜障害の抑制および網膜形態の改善が報告され、RCSラットにおいては網膜電位図の悪化が抑制されたと報告されている<sup>48,81</sup>。加えて、ニルバジピ

ンは網膜の菲薄化を抑制し、rd マウスの視細胞を維持したと報告されている<sup>49,50</sup>。これらの報告は、ニルバジピンは有効濃度で網膜に送達され、網膜疾患に対する治療効果を有することを示唆する。さらに、CCB を用いた複数の臨床試験では、緑内障治療薬としてのニルバジピンの可能性が報告されている<sup>40-43</sup>。本研究で用いたニルバジピンの用量は、既報においてマウスおよびラットの網膜疾患モデルに有効性を示した用量を設定しており<sup>48-50</sup>、その用量は高血圧症患者の臨床試験の用量を元に設定されている<sup>82</sup>。本研究で観察された網膜神経保護効果に対するニルバジピンの作用機序は明らかではないが、眼圧により誘導される神経障害に対して、血流の改善、カルシウムの細胞内流入の抑制およびアポトーシス関連遺伝子の発現調節等の複合効果により観察されたと推測される。本研究の結果は、ニルバジピンが緑内障の治療において眼圧下降治療の追加療法として有望であることを示唆する。ニルバジピンは、高血圧症の治療薬として承認されており、豊富な臨床経験から忍容性の高い薬剤である。緑内障の治療においても有望な神経保護薬になる可能性がある<sup>83</sup>。

本研究には限界がある。第1に、レーザー誘導高眼圧モデルは、ヒトの中等度の開放隅角緑内障と同様に、眼圧を制御することが困難であるため、2群間で不均衡が生じる。第2に、レーザー光凝固直後の眼炎症が過度な眼圧変動を引き起こす。本研究では、レーザー光凝固の1週間後に眼圧を測定し、変動の大きい症例を除外したが、眼圧の急上昇は初回測定以前に生じている可能性がある。このような眼圧変動は閉塞隅角緑内障又は落屑緑内障で臨床的にも起こり得るが、虚血性視神経症または炎症が結果に影響を及ぼす可能性がある。第3に、より低侵襲の緑内障モデルを確立する必要がある。第4に、本研究ではニルバジピンを腹腔内投与した。ニルバジピンは経口投与が可能であるため、投与経路により臨床的影響が異なる可能性がある。第5に、本試験では網膜機能を評価していない。高眼圧による RGC 死を予防できたとしても、網膜機能は保持できない可能性がある。第6に、同じ実験条件下で、基剤群とニルバジピン群の両方をレーザー光凝固で処理したが、CFP マウスレーザー誘導高眼圧モデルは、基剤群 76.7% (23/30 例)、ニルバジピン群 46.7% (14/30 例) であった。ニルバジピンは眼圧に影響を及ぼさないことが報告されていることから<sup>43,64</sup>、ニルバジピン投与がモデル作製に影響を及ぼす可能性は低いと考えた。しかし、ニルバジピン投与がモデル作製に及ぼす影響は否定できない。しかし、本研究手法は眼圧負荷量と RGC 生存率の評価であるため、ニルバジピン群の高眼圧処置眼は平均 22.0 mmHg と基剤群と同程度の高い眼圧を示していることから、本研究結果に影響しないと考えられる。

## 第3章：総括および今後の展望

### 総括

GONは最終的にRGCとその軸索からなる視神経が障害される神経変性疾患である。緑内障は主として高眼圧ストレスによる多因子性の視神経変性疾患であるが、高眼圧に加えて、低酸素、グルタミン酸ストレス、酸化ストレスまたは遺伝的因子等が病因に関連すると考えられている。GONは緑内障治療として承認されている眼圧下降治療にもかかわらず進行することが多く、網膜神経保護薬は有望な新しい選択肢である。

本研究は、GONを研究対象とし、CFP発現マウスを用いた眼圧依存性RGC障害の評価と薬効評価への応用を試みた。第1章の研究では、RGC特異的に蛍光蛋白CFPが発現しているトランスジェニックマウスに既存のレーザー誘導高眼圧処置を施行することにより、新規の眼圧依存性RGC障害の評価モデルを作製した。我々はCFPマウスレーザー誘導高眼圧モデルの作製に成功し、本モデルは眼圧負荷量とRGC生存率の間の有意な負の相関を示した。この結果は、眼圧上昇はRGC障害の危険因子であり、RGC障害の程度は眼圧に依存するという見解を支持した。さらに、眼圧依存性のRGC障害の領域差を検討したところ、各領域は眼圧上昇により均等に障害されることが示唆された。本研究では、既存の侵襲的なRGC染色法を用いることなく、より簡便な眼圧依存性RGC障害の評価方法を確立することができた。第2章の研究では、本モデルを用いて、RGC障害に対するカルシウム拮抗薬ニルバジピンの神経保護効果を評価した。ニルバジピンは複数の動物実験における眼血流量の改善<sup>64-65</sup>と網膜神経保護効果<sup>48-49</sup>および臨床研究<sup>43</sup>においても正常眼圧緑内障に対する効果が報告されており、本薬効評価系においても有効性が期待されたため選択した。本研究では、基剤群とニルバジピン群の回帰分析により、基剤群は眼圧負荷量とRGC生存率の間の有意な負の相関を示したが、ニルバジピン群は有意な相関を認めなかった。本研究により、我々はCFPマウスレーザー誘導高眼圧モデルを用いた薬効評価系を確立し、眼圧依存性RGC障害に対するニルバジピンの神経保護効果を明らかにした。本研究の結果は、ニルバジピンが緑内障の治療において眼圧下降治療の追加療法として有望であることを示唆する。本薬効評価系は比較的低予算で短期間に網膜神経保護薬の前臨床効果を評価できるスクリーニングツールになることが期待された。

GONの病態解明と治療薬の開発において、動物実験による解析は必須である。特にマウスを用いた研究は、他の動物と比較して、比較的安価で取り扱いが容易であり、ノックアウトまたはトランスジェニックマウスの系統が利用でき、病態解明の分子生物学的アプローチを促進する。また、マウス眼の隅角構造はヒトと類似しており線維柱帯、シュレム管の存在、ぶどう膜・強膜路が存在していることから、ヒトのRGC障害の病態解明と新規緑内障治療薬の効率的な探索が可能となり、本評価系も有用な研究ツールとなることが期待される。

一方、本モデルには改善すべき課題がある。レーザー誘導高眼圧モデルは実験期間中（特に初期）の眼圧変動が大きい。現時点で、我々のグループにおいては最も確実で確率の高い技術であるが、モデル作製の成功率は十分ではない。モデル作製時の組織障害が少なく、慢性高眼圧モデルとして理想的な眼圧上昇範囲である20-30

mmHg の範囲で安定した高眼圧を示すモデルが必要である。本研究の成果は、マイクロニードル法によるマウスの眼圧測定と遺伝子改変マウスである CFP マウスの開発という技術革新がもたらしたものである。今後の課題についても新しい技術を取り入れて改善を試みたい。

## 今後の展望

本研究成果により、ヒトの原発性開放隅角緑内障のような比較的軽度の高眼圧を示し、RGC 障害が眼圧上昇と相関する慢性高眼圧症のマウスモデルを用いた評価系が利用可能となった。本評価系はヒトの緑内障を模した動物モデルとして有用であり、RGC 障害の病態解明と新規緑内障治療薬の効率的な探索研究に役立つことが期待される。

GON の本態である RGC 障害の基礎データとして、本研究では網膜部位別の眼圧障害度の解析を実施したが、高眼圧処置後 9 週時点の結果に限られている。本評価系において、眼圧障害からの時間経過と RGC 障害の関係を検討することも緑内障の視神経障害の進行を評価する上で重要な知見となる。その上でヒトとマウスの相同性を考慮しながら、視神経障害のパターンを比較することで、GON の病態解明の知見が得られる可能性がある。

また、緑内障は神経変性疾患の一つと考えられ、種々のストレスに対する RGC 保護を標的とする網膜神経保護薬が検討されている。近年、本研究で評価したニルバジピン以外の CCB、NMDA 拮抗薬、BDNF、抗酸化物質、フリーラジカルスカベンジャー、イチョウエキス、一酸化窒素合成酵素阻害薬等の臨床研究が行われており<sup>12</sup>、本薬効評価系を用いたこれらの薬剤および新規の候補薬剤の基礎データの取得が可能となる。本評価系は逆行性染色のような侵襲的技術無しに RGC を同定して計数することができ、対側眼を無処置コントロール眼として利用できるため、評価が容易である。比較的低予算で短期間に網膜神経保護薬の前臨床効果を評価できることが強みである。候補薬物があれば 3 ヶ月以内の薬効評価が可能であり、本薬効評価系は臨床応用を目指す薬剤の足掛かりになることが期待される。



## 謝辞

本研究を行うにあたり、終始多大なご指導、ご鞭撻を賜りました東京大学大学院医学系研究科外科学専攻眼科学 名誉教授 新家 眞 博士、教授 相原 一 博士、助教 村田 博史 博士に厚く御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、格別のご指導、ご協力を頂きました東京大学大学院医学系研究科外科学専攻眼科学 佐伯 忠賜朗 博士、藤代 貴志 博士、中川 卓 博士および東京大学医学部眼科学教室の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、研究の機会を与えて頂いたわかもと製薬株式会社 白澤 榮一 博士、内藤 聡 博士、葛西 洋芳 博士に謹んで御礼申し上げます。

最後に、私の研究生活を激励し、常に支えてくれた家族に深く感謝致します。

## 参考文献

1. Tham, Y.C., Li, X., Wong, T.Y., Quigley, H.A., Aung, T., and Cheng, C.Y. (2014). Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology* 121, 2081-2090. 10.1016/j.ophtha.2014.05.013.
2. Davis, B.M., Crawley, L., Pahlitzsch, M., Javaid, F., and Cordeiro, M.F. (2016). Glaucoma: the retina and beyond. *Acta Neuropathol.* 132, 807-826. 10.1007/s00401-016-1609-2.
3. Coleman, A.L., and Miglior, S. (2008). Risk factors for glaucoma onset and progression. *Surv. Ophthalmol.* 53 Suppl1, S3-10. 10.1016/j.survophthal.2008.08.006.
4. Quigley, H.A., Addicks, E.M., Green, W.R., and Maumenee, A.E. (1981). Optic nerve damage in human glaucoma. II. The site of injury and susceptibility to damage. *Arch. Ophthalmol.* 99, 635-649. 10.1001/archopht.1981.03930010635009.
5. The Advanced Glaucoma Intervention Study (AGIS): 7. The relationship between control of intraocular pressure and visual field deterioration. The AGIS Investigators. (2000). *Am. J. Ophthalmol.* 130, 429-440.
6. Kass, M.A., Heuer, D.K., Higginbotham, E.J., Johnson, C.A., Keltner, J.L., Miller, J.P., Parrish, R.K., 2nd, Wilson, M.R., and Gordon, M.O. (2002). The Ocular Hypertension Treatment Study: a randomized trial determines that topical ocular hypotensive medication delays or prevents the onset of primary open-angle glaucoma. *Arch. Ophthalmol.* 120, 701-713; discussion 829-730.
7. Friedman, D.S., Wilson, M.R., Liebmann, J.M., Fechtner, R.D., and Weinreb, R.N. (2004). An evidence-based assessment of risk factors for the progression of ocular hypertension and glaucoma. *Am. J. Ophthalmol.* 138, S19-31. 10.1016/j.ajo.2004.04.058.
8. Mozaffarieh, M., Grieshaber, M.C., and Flammer, J. (2008). Oxygen and blood flow: players in the pathogenesis of glaucoma. *Mol. Vis.* 14, 224-233.
9. Fan, B.J., and Wiggs, J.L. (2010). Glaucoma: genes, phenotypes, and new directions for therapy. *J. Clin. Invest.* 120, 3064-3072. 10.1172/jci43085.
10. Venkataraman, S.T., Flanagan, J.G., and Hudson, C. (2010). Vascular reactivity of optic nerve head and retinal blood vessels in glaucoma--a review. *Microcirculation* 17, 568-581. 10.1111/j.1549-8719.2010.00045.x.
11. Levin, L.A., and Peebles, P. (2008). History of neuroprotection and rationale as a therapy for glaucoma. *Am. J. Manag. Care* 14, S11-14.
12. Sena, D.F., and Lindsley, K. (2017). Neuroprotection for treatment of glaucoma in adults. *Cochrane Database Syst. Rev.* 1, Cd006539. 10.1002/14651858.CD006539.pub4.
13. McKinnon, S.J., Schlamp, C.L., and Nickells, R.W. (2009). Mouse models of retinal ganglion cell death and glaucoma. *Exp. Eye Res.* 88, 816-824. 10.1016/j.exer.2008.12.002.
14. Leung, C.K., and Weinreb, R.N. (2009). Experimental detection of retinal ganglion cell damage in vivo. *Exp. Eye Res.* 88, 831-836. 10.1016/j.exer.2008.09.006.
15. Feng, G., Mellor, R.H., Bernstein, M., Keller-Peck, C., Nguyen, Q.T., Wallace, M., Nerbonne, J.M., Lichtman, J.W., and Sanes, J.R. (2000). Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron* 28, 41-51. S0896-6273(00)00084-2 [pii].

16. Dratviman-Storobinsky, O., Hasanreisoglu, M., Offen, D., Barhum, Y., Weinberger, D., and Goldenberg-Cohen, N. (2008). Progressive damage along the optic nerve following induction of crush injury or rodent anterior ischemic optic neuropathy in transgenic mice. *Mol. Vis.* 14, 2171-2179.
17. Murata, H., Aihara, M., Chen, Y.N., Ota, T., Numaga, J., and Araie, M. (2008). Imaging mouse retinal ganglion cells and their loss in vivo by a fundus camera in the normal and ischemia-reperfusion model. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 5546-5552. 10.1167/iovs.07-1211.
18. Leung, C.K., Lindsey, J.D., Crowston, J.G., Ju, W.K., Liu, Q., Bartsch, D.U., and Weinreb, R.N. (2008). In vivo imaging of murine retinal ganglion cells. *J. Neurosci. Methods* 168, 475-478. 10.1016/j.jneumeth.2007.10.018.
19. Leung, C.K., Lindsey, J.D., Crowston, J.G., Lijia, C., Chiang, S., and Weinreb, R.N. (2008). Longitudinal profile of retinal ganglion cell damage after optic nerve crush with blue-light confocal scanning laser ophthalmoscopy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 4898-4902. 10.1167/iovs.07-1447.
20. Leung, C.K., Lindsey, J.D., Chen, L., Liu, Q., and Weinreb, R.N. (2009). Longitudinal profile of retinal ganglion cell damage assessed with blue-light confocal scanning laser ophthalmoscopy after ischaemic reperfusion injury. *Br. J. Ophthalmol.* 93, 964-968. 10.1136/bjo.2008.150482.
21. Tosi, J., Wang, N.K., Zhao, J., Chou, C.L., Kasanuki, J.M., Tsang, S.H., and Nagasaki, T. (2010). Rapid and noninvasive imaging of retinal ganglion cells in live mouse models of glaucoma. *Mol. Imaging Biol.* 12, 386-393. 10.1007/s11307-009-0292-2.
22. Nakano, N., Ikeda, H.O., Hangai, M., Muraoka, Y., Toda, Y., Kakizuka, A., and Yoshimura, N. (2011). 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, 8754-8762. 10.1167/iovs.10-6654.
23. Aihara, M., Lindsey, J.D., and Weinreb, R.N. (2003). Experimental mouse ocular hypertension: establishment of the model. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 4314-4320.
24. Mabuchi, F., Lindsey, J.D., Aihara, M., Mackey, M.R., and Weinreb, R.N. (2004). Optic nerve damage in mice with a targeted type I collagen mutation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45, 1841-1845.
25. Grozdanic, S.D., Betts, D.M., Sakaguchi, D.S., Allbaugh, R.A., Kwon, Y.H., and Kardon, R.H. (2003). Laser-induced mouse model of chronic ocular hypertension. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 4337-4346. 10.1167/iovs.03-0015.
26. Gross, R.L., Ji, J., Chang, P., Pennesi, M.E., Yang, Z., Zhang, J., and Wu, S.M. (2003). A mouse model of elevated intraocular pressure: retina and optic nerve findings. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* 101, 163-169; discussion 169-171.
27. Ruiz-Ederra, J., and Verkman, A.S. (2006). Mouse model of sustained elevation in intraocular pressure produced by episcleral vein occlusion. *Exp. Eye Res.* 82, 879-884. S0014-4835(05)00345-3 [pii] 10.1016/j.exer.2005.10.019 [doi].
28. Whitlock, N.A., McKnight, B., Corcoran, K.N., Rodriguez, L.A., and Rice, D.S. (2010). Increased intraocular pressure in mice treated with dexamethasone. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 6496-6503. 10.1167/iovs.10-5430.
29. Chen, H., Wei, X., Cho, K.S., Chen, G., Sappington, R., Calkins, D.J., and Chen, D.F. (2011). Optic neuropathy due to microbead-induced elevated intraocular pressure in the mouse. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 36-44. 10.1167/iovs.09-5115.

30. Schlager, G., and Weibust, R.S. (1967). Genetic control of blood pressure in mice. *Genetics* 55, 497-506. 10.1093/genetics/55.3.497.
31. Laquis, S., Chaudhary, P., and Sharma, S.C. (1998). The patterns of retinal ganglion cell death in hypertensive eyes. *Brain Res.* 784, 100-104. 10.1016/s0006-8993(97)01189-x.
32. Urcola, J.H., Hernández, M., and Vecino, E. (2006). Three experimental glaucoma models in rats: comparison of the effects of intraocular pressure elevation on retinal ganglion cell size and death. *Exp. Eye Res.* 83, 429-437. 10.1016/j.exer.2006.01.025.
33. Williams, R.W., Strom, R.C., Rice, D.S., and Goldowitz, D. (1996). Genetic and environmental control of variation in retinal ganglion cell number in mice. *J. Neurosci.* 16, 7193-7205. 10.1523/jneurosci.16-22-07193.1996.
34. Wang, X., Archibald, M.L., Stevens, K., Baldrige, W.H., and Chauhan, B.C. (2010). Cyan fluorescent protein (CFP) expressing cells in the retina of Thy1-CFP transgenic mice before and after optic nerve injury. *Neurosci. Lett.* 468, 110-114. 10.1016/j.neulet.2009.10.077.
35. Huang, W., Fileta, J., Guo, Y., and Grosskreutz, C.L. (2006). Downregulation of Thy1 in retinal ganglion cells in experimental glaucoma. *Curr. Eye Res.* 31, 265-271. H228679681548044 [pii] 10.1080/02713680500545671 [doi].
36. Das, A.S., Regenhardt, R.W., Feske, S.K., and Gurol, M.E. (2019). Treatment Approaches to Lacunar Stroke. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 28, 2055-2078. 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2019.05.004.
37. Lang, A.E., and Espay, A.J. (2018). Disease Modification in Parkinson's Disease: Current Approaches, Challenges, and Future Considerations. *Mov. Disord.* 33, 660-677. 10.1002/mds.27360.
38. Sahoo, A.K., Dandapat, J., Dash, U.C., and Kanhar, S. (2018). Features and outcomes of drugs for combination therapy as multi-targets strategy to combat Alzheimer's disease. *J. Ethnopharmacol.* 215, 42-73. 10.1016/j.jep.2017.12.015.
39. Dhapola, R., Sarma, P., Medhi, B., Prakash, A., and Reddy, D.H. (2022). Recent Advances in Molecular Pathways and Therapeutic Implications Targeting Mitochondrial Dysfunction for Alzheimer's Disease. *Mol. Neurobiol.* 59, 535-555. 10.1007/s12035-021-02612-6.
40. Kitazawa, Y., Shirai, H., and Go, F.J. (1989). The effect of Ca<sup>2+</sup>(+) -antagonist on visual field in low-tension glaucoma. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 227, 408-412.
41. Sawada, A., Kitazawa, Y., Yamamoto, T., Okabe, I., and Ichien, K. (1996). Prevention of visual field defect progression with brovincamine in eyes with normal-tension glaucoma. *Ophthalmology* 103, 283-288.
42. Netland, P.A., Chaturvedi, N., and Dreyer, E.B. (1993). Calcium channel blockers in the management of low-tension and open-angle glaucoma. *Am. J. Ophthalmol.* 115, 608-613.
43. Koseki, N., Araie, M., Tomidokoro, A., Nagahara, M., Hasegawa, T., Tamaki, Y., and Yamamoto, S. (2008). A placebo-controlled 3-year study of a calcium blocker on visual field and ocular circulation in glaucoma with low-normal pressure. *Ophthalmology* 115, 2049-2057. 10.1016/j.opht.2008.05.015.
44. Furuta, T., Shibata, S., Kodama, I., and Yamada, K. (1983). Cardiovascular effects of FR34235, a new dihydropyridine slow channel blocker, in isolated rabbit myocardium and aorta. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 5, 836-841.
45. Terakawa, M., Tokuma, Y., Shishido, A., and Noguchi, H. (1987). Pharmacokinetics of nilvadipine in healthy volunteers. *J. Clin. Pharmacol.* 27, 111-117.

46. Ohtsuka, M., Koibuchi, Y., Sakai, S., Tsujioka, K., Fujiwara, T., Ozaki, T., Maeda, K., Motoyama, I., Horiai, H., Ono, T., and et al. (1988). Effects of nilvadipine on the cardiovascular system in experimental animals. *Arzneimittelforschung* 38, 1605-1618.
47. Uemura, A., and Mizota, A. (2008). Retinal concentration and protective effect against retinal ischemia of nilvadipine in rats. *Eur. J. Ophthalmol.* 18, 87-93.
48. Yamazaki, H., Ohguro, H., Maeda, T., Maruyama, I., Takano, Y., Metoki, T., Nakazawa, M., Sawada, H., and Dezawa, M. (2002). Preservation of retinal morphology and functions in royal college surgeons rat by nilvadipine, a Ca(2+) antagonist. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43, 919-926.
49. Takano, Y., Ohguro, H., Dezawa, M., Ishikawa, H., Yamazaki, H., Ohguro, I., Mamiya, K., Metoki, T., Ishikawa, F., and Nakazawa, M. (2004). Study of drug effects of calcium channel blockers on retinal degeneration of rd mouse. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313, 1015-1022.
50. Takeuchi, K., Nakazawa, M., and Mizukoshi, S. (2008). Systemic administration of nilvadipine delays photoreceptor degeneration of heterozygous retinal degeneration slow (rds) mouse. *Exp. Eye Res.* 86, 60-69. 10.1016/j.exer.2007.09.008.
51. Clark, A.F., and Yorio, T. (2003). Ophthalmic drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2, 448-459. 10.1038/nrd1106.
52. John, S.W., Hagaman, J.R., MacTaggart, T.E., Peng, L., and Smithes, O. (1997). Intraocular pressure in inbred mouse strains. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 38, 249-253.
53. Danias, J., Kontiola, A.I., Filippopoulos, T., and Mittag, T. (2003). Method for the noninvasive measurement of intraocular pressure in mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 1138-1141.
54. Biswas, S., and Wan, K.H. (2019). Review of rodent hypertensive glaucoma models. *Acta Ophthalmol* 97, e331-e340. 10.1111/aos.13983.
55. John, S.W., Smith, R.S., Savinova, O.V., Hawes, N.L., Chang, B., Turnbull, D., Davisson, M., Roderick, T.H., and Heckenlively, J.R. (1998). Essential iris atrophy, pigment dispersion, and glaucoma in DBA/2J mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 951-962.
56. Scholz, M., Buder, T., Seeber, S., Adamek, E., Becker, C.M., and Lutjen-Drecoll, E. (2008). Dependency of intraocular pressure elevation and glaucomatous changes in DBA/2J and DBA/2J-Rj mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 613-621. 10.1167/iovs.07-0745.
57. Tsuruga, H., Murata, H., Araie, M., and Aihara, M. (2012). A model for the easy assessment of pressure-dependent damage to retinal ganglion cells using cyan fluorescent protein-expressing transgenic mice. *Mol. Vis.* 18, 2468-2478.
58. Shimamoto, H., and Shimamoto, Y. (1995). Nilvadipine increases cerebral blood flow in elderly hypertensives: comparison with nifedipine. *J. Hum. Hypertens.* 9, 271-279.
59. Warltier, D.C., Zyvoloski, M.G., Gross, G.J., and Brooks, H.L. (1984). Comparative actions of dihydropyridine slow channel calcium blocking agents in conscious dogs: systemic and coronary hemodynamics with and without combined beta adrenergic blockade. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 230, 367-375.
60. Tokuma, Y., Fujiwara, T., and Noguchi, H. (1987). Absorption, distribution and excretion of nilvadipine, a new dihydropyridine calcium antagonist, in rats and dogs. *Xenobiotica* 17, 1341-1349. 10.3109/00498258709047164.
61. Murata, T., Suzuki, R., Higuchi, T., and Oshima, A. (2000). Regional cerebral blood flow in the patients with depressive disorders. *Keio J. Med.* 49 Suppl 1, A112-113.
62. Hanyu, H., Hirao, K., Shimizu, S., Iwamoto, T., Koizumi, K., and Abe, K. (2007). Favourable effects of nilvadipine on cognitive function and regional cerebral blood

- flow on SPECT in hypertensive patients with mild cognitive impairment. *Nucl. Med. Commun.* 28, 281-287. 10.1097/MNM.0b013e32804c58aa.
63. Harino, S., Riva, C.E., and Petrig, B.L. (1992). Intravenous nicardipine in cats increases optic nerve head but not retinal blood flow. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 33, 2885-2890.
  64. Shimazawa, M., Sugiyama, T., Azuma, I., Araie, M., Iwakura, Y., Watari, M., Sakai, T., and Hara, H. (1999). Effect of lomerizine, a new Ca(2+)channel blocker, on the microcirculation in the optic nerve head in conscious rabbits: a study using a laser speckle technique. *Exp. Eye Res.* 69, 185-193. 10.1006/exer.1999.0689.
  65. Tomita, K., Araie, M., Tamaki, Y., Nagahara, M., and Sugiyama, T. (1999). Effects of nilvadipine, a calcium antagonist, on rabbit ocular circulation and optic nerve head circulation in NTG subjects. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40, 1144-1151.
  66. Yamamoto, T., Niwa, Y., Kawakami, H., and Kitazawa, Y. (1998). The effect of nilvadipine, a calcium-channel blocker, on the hemodynamics of retrobulbar vessels in normal-tension glaucoma. *J. Glaucoma* 7, 301-305.
  67. Tomita, G., Niwa, Y., Shinohara, H., Hayashi, N., Yamamoto, T., and Kitazawa, Y. (1999). Changes in optic nerve head blood flow and retrobulbar hemodynamics following calcium-channel blocker treatment of normal-tension glaucoma. *Int. Ophthalmol.* 23, 3-10.
  68. Niwa, Y., Yamamoto, T., Harris, A., Kagemann, L., Kawakami, H., and Kitazawa, Y. (2000). Relationship between the effect of carbon dioxide inhalation or nilvadipine on orbital blood flow in normal-tension glaucoma. *J. Glaucoma* 9, 262-267.
  69. Rankin, S.J., Drance, S.M., Buckley, A.R., and Walman, B.E. (1996). Visual field correlations with color Doppler studies in open angle glaucoma. *J. Glaucoma* 5, 15-21.
  70. Otori, Y., Kusaka, S., Kawasaki, A., Morimura, H., Miki, A., and Tano, Y. (2003). Protective effect of nilvadipine against glutamate neurotoxicity in purified retinal ganglion cells. *Brain Res.* 961, 213-219.
  71. Katai, N., Kikuchi, T., Shibuki, H., Kuroiwa, S., Arai, J., Kurokawa, T., and Yoshimura, N. (1999). Caspase-like proteases activated in apoptotic photoreceptors of Royal College of Surgeons rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40, 1802-1807.
  72. Faktorovich, E.G., Steinberg, R.H., Yasumura, D., Matthes, M.T., and LaVail, M.M. (1990). Photoreceptor degeneration in inherited retinal dystrophy delayed by basic fibroblast growth factor. *Nature* 347, 83-86. 10.1038/347083a0.
  73. Lyford, G.L., Yamagata, K., Kaufmann, W.E., Barnes, C.A., Sanders, L.K., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Lanahan, A.A., and Worley, P.F. (1995). Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron* 14, 433-445.
  74. Sato, M., Ohguro, H., Ohguro, I., Mamiya, K., Takano, Y., Yamazaki, H., Metoki, T., Miyagawa, Y., Ishikawa, F., and Nakazawa, M. (2003). Study of pharmacological effects of nilvadipine on RCS rat retinal degeneration by microarray analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306, 826-831.
  75. Cayouette, M., Behn, D., Sendtner, M., Lachapelle, P., and Gravel, C. (1998). Intraocular gene transfer of ciliary neurotrophic factor prevents death and increases responsiveness of rod photoreceptors in the retinal degeneration slow mouse. *J. Neurosci.* 18, 9282-9293.
  76. Wen, R., Tao, W., Li, Y., and Sieving, P.A. (2012). CNTF and retina. *Prog. Retin. Eye Res.* 31, 136-151. 10.1016/j.preteyeres.2011.11.005.
  77. Leske, M.C., Heijl, A., Hyman, L., Bengtsson, B., Dong, L., and Yang, Z. (2007). Predictors of long-term progression in the early manifest glaucoma trial. *Ophthalmology* 114, 1965-1972. 10.1016/j.ophtha.2007.03.016.

78. Leske, M.C., Wu, S.Y., Hennis, A., Honkanen, R., and Nemesure, B. (2008). Risk factors for incident open-angle glaucoma: the Barbados Eye Studies. *Ophthalmology* *115*, 85-93. 10.1016/j.opthta.2007.03.017.
79. Ogasawara, K., Noda, A., Yasuda, S., Kobayashi, M., Yukawa, H., and Ogawa, A. (2003). Effect of calcium antagonist on cerebral blood flow and oxygen metabolism in patients with hypertension and chronic major cerebral artery occlusion: a positron emission tomography study. *Nucl. Med. Commun.* *24*, 71-76. 10.1097/01.mnm.0000051634.18733.46.
80. Ohguro, H., Ogawa, K., Maeda, T., Maruyama, I., Maeda, A., Takano, Y., and Nakazawa, M. (2001). Retinal dysfunction in cancer-associated retinopathy is improved by Ca(2+) antagonist administration and dark adaptation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *42*, 2589-2595.
81. Takano, Y., Ohguro, H., Ohguro, I., Yamazaki, H., Mamiya, K., Ishikawa, F., and Nakazawa, M. (2003). Low expression of rhodopsin kinase in pineal gland in Royal College of Surgeons rat. *Curr. Eye Res.* *27*, 95-102.
82. Kuramoto, K. (1989). Double-blind studies of calcium antagonists in the treatment of hypertension in Japan. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* *13 Suppl 1*, S29-35.
83. Ohtsuka, M., Yokota, M., Kodama, I., Yamada, K., and Shibata, S. (1989). New generation dihydropyridine calcium entry blockers: in search of greater selectivity for one tissue subtype. *Gen. Pharmacol.* *20*, 539-556.

## 本研究に関わる査読付ありの原著論文リスト

1. Tsuruga, H., Murata, H., Araie, M., and Aihara, M. (2012). A model for the easy assessment of pressure-dependent damage to retinal ganglion cells using cyan fluorescent protein-expressing transgenic mice. *Mol. Vis.* 18, 2468-2478.
2. Tsuruga, H., Murata, H., Araie, M., and Aihara, M. (2023). Neuroprotective effect of the calcium channel blocker nilvadipine on retinal ganglion cell death in a mouse ocular hypertension model. *Heliyon*. 9, e13812.