

網膜変性疾患に対する新規治療薬の探索と  
その作用機序に関する研究

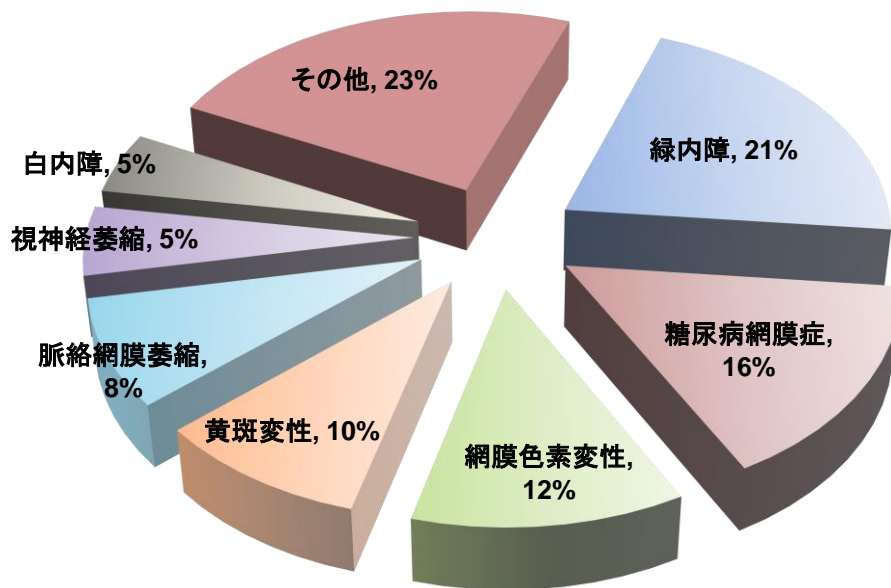
今井 俊佑

## 目 次

序論	1 頁
第1章 網膜光障害モデルにおけるラジカルスカベンジャーの網膜保護作用	8 頁
第1節 諸言	
第2節 実験材料及び方法	
第3節 実験成績	
第4節 考察	
第2章 網膜光障害モデルにおけるカルパイン阻害薬の網膜保護作用	35 頁
第1節 諸言	
第2節 実験材料及び方法	
第3節 実験成績	
第4節 考察	
第3章 網膜血管透過性に対するトリアムシノロンアセトニドの作用	57 頁
第1節 諸言	
第2節 実験材料及び方法	
第3節 実験成績	
第4節 考察	
総括及び結論	77 頁
謝辞	79 頁
引用文献	80 頁
略語一覧表	94 頁

## 序 論

日本の中途失明原因の上位は、緑内障 (21%)、糖尿病網膜症 (16%)、網膜色素変性症 (12%)、加齢黄斑変性 (10%) であり、いずれも最終的に網膜の障害によって失明に至り著しい QOL の低下を招く (Wako et al., 2014) (Fig. 1)。

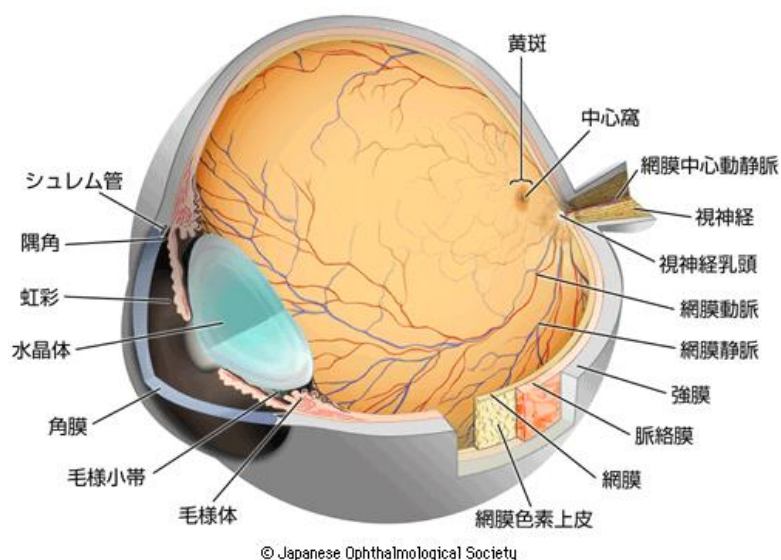


**Fig. 1 The rate of visual disorder in Japan.**

Source: Nihon Ganka Gakkai Zasshi 118: 495-501, 2014

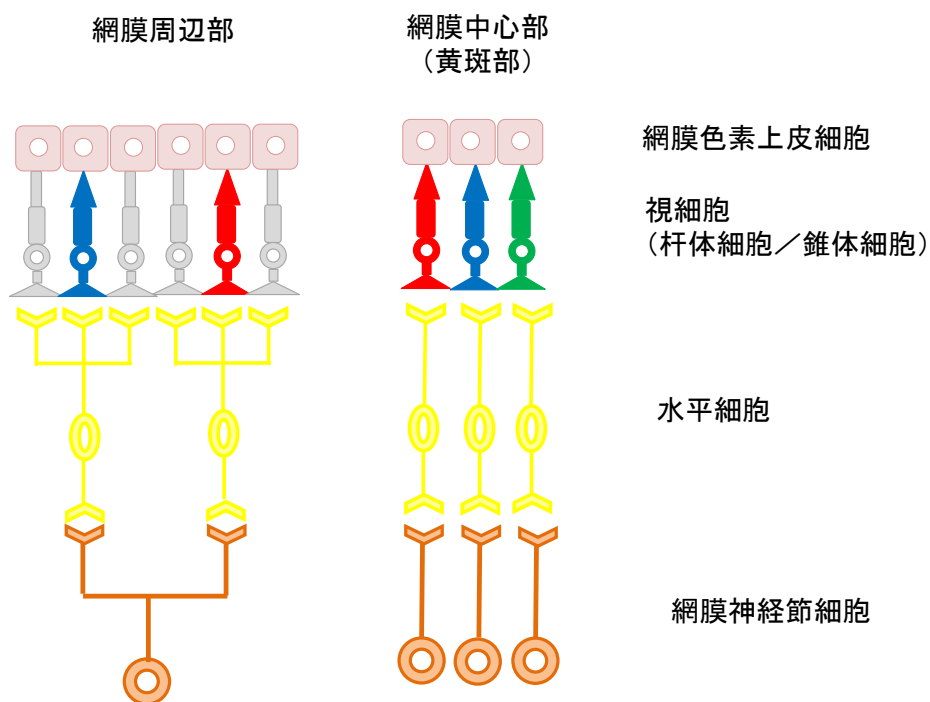
外界から得た光情報は、網膜視細胞によって電気信号へと変換され網膜内層の双極細胞から網膜神経節細胞へと伝えられる。さらに網膜神経節細胞から脳へと電気信号が伝達されて視覚が発生する。黄斑は網膜の中心部にあり、視力を司る最も重要な部位である。黄斑部には明暗や色覚を知覚する 2 種類の視細胞 (錐体細胞及び桿体細胞) のうち色覚に重要な役割を果たす錐体細胞が高密度に

集合している。通常、多数の視細胞と一つの双極細胞が接合し、複数の双極細胞が一つの網膜神経節細胞と接合する収斂型をとるが、中心窩においては視細胞・網膜神経節細胞の接合はほぼ 1 : 1 に近くなるため一つの視細胞の重要性が高い(Curcio and Allen, 1990; Dacey, 1993) (Fig. 2 及び Fig. 3)。また、中心窩には血管を含む網膜内層がないため良好な視力を得ることができる一方で、虚血性病変や浮腫性病変に対して脆弱である (Campbell et al., 2017)。視覚障害の上位を占める加齢黄斑変性や糖尿病網膜症では黄斑が障害を受けるため、重篤な視力低下を招く。これらの疾患により黄斑部が障害を受けると視野の中心の歪みを始めとして、中心暗点が生じやがては視力低下へと至り文字の読み書きや顔の判別ができないなど日常生活に支障をきたす。ヒトは両眼で物を視るため初期症状を自覚しにくく、症状を自覚した時には病態が進行している例も少なくなく治療が困難になる可能性も考えられるので、早期発見のためにも定期的な検査が必要である。



**Fig. 2 Structure of the eye**

Source: [http://www.nichigan.or.jp/public/disease/momaku\\_karei.jsp](http://www.nichigan.or.jp/public/disease/momaku_karei.jsp)



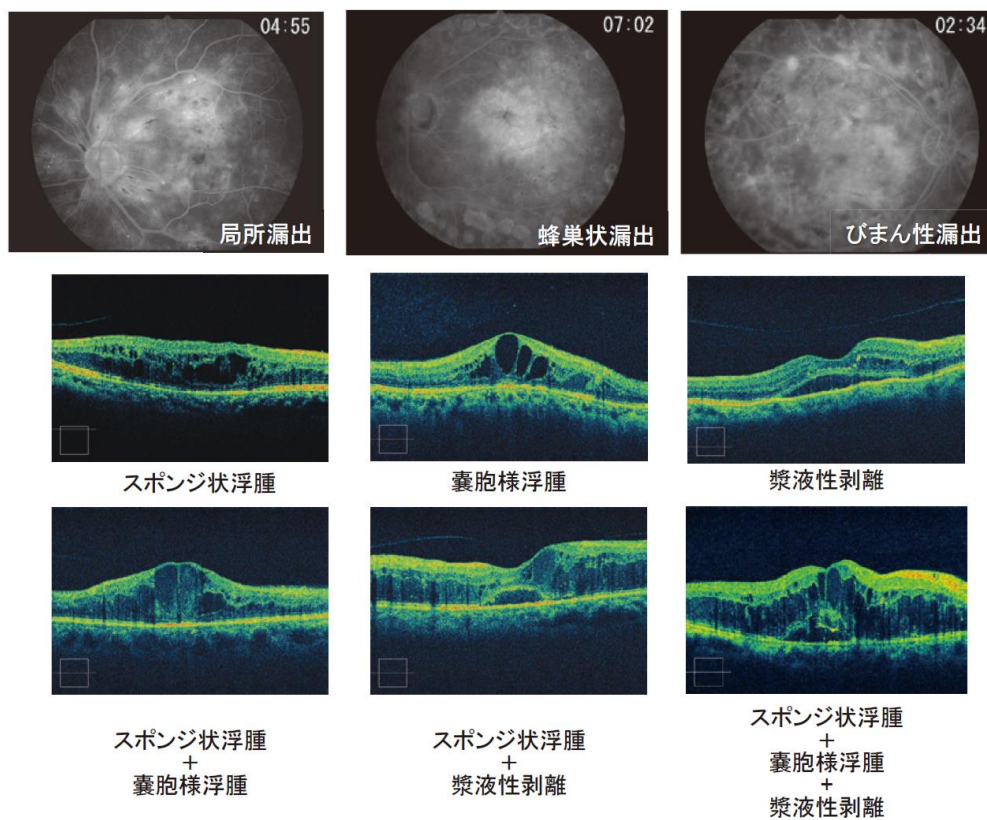
**Fig. 3 Connection of retinal ganglion cells, bipolar cells, and photoreceptor cells at peripheral and central retina.**

加齢黄斑変性は欧米における中途失明原因や視力低下の主原因であり、1998年に日本で行われた久山町研究によると加齢黄斑変性の有病率は50歳以上の0.9% (約37万人) であり、2007年の研究では1.3% (約69万人) と報告されていることから、高齢化が進むにつれてさらに患者数の増加が予想される(Yasuda et al., 2009)。加齢黄斑変性の病態には主に滲出型と萎縮型の2タイプの病態が存在し、久山町研究では滲出型1.2%、萎縮型0.1%の割合で患者が存在することが報告されている(Oshima, 2001)。日本では加齢黄斑変性の大半が滲出型となるが、欧米では大半の患者が萎縮型で、滲出型の患者は10~15%程度である (Ambati and Fowler, 2012)。滲出型では、網膜と強膜の間に位置する脈絡膜と呼ばれる部位から血管新生が生じる。この異常血管からの血液成分の漏出による浮腫や、

異常血管が破裂することによる出血によって黄斑部が傷害をうけ視力低下に至る (Ambati and Fowler, 2012; Nowak, 2006)。したがって、この異常血管の発生を抑制もしくは発生した異常血管を退縮させることが治療法となる。薬物治療としては、血管新生の主要因である Vascular endothelial growth factor (VEGF) を標的とした医薬品であるアフリベルセプト (アイリーア<sup>®</sup> ; バイエル薬品株式会社)、 ラニビズマブ (ルセンティス<sup>®</sup> ; ノバルティスファーマ株式会社) などの硝子体内注射が行われ、重篤な視力障害に至る可能性を抑えることができるが、こうした医薬品は高額であり、追加治療の必要もあるため医療費の問題がある。また、VEGF 阻害薬が効果を示さない患者 (ノンレスポンド)、再投与を行っても効果が減弱する患者 (タキフィラキシー)、VEGF 阻害薬の投与によって一時的に効果が得られても病態が再発する患者が存在するという問題点もある (Eghøj and Sørensen, 2012; Kim et al., 2017; Kuroda et al., 2015; Suzuki et al., 2014)。一方、萎縮型は明確な原因はわかっておらず、加齢と共に網膜色素上皮細胞や網膜視細胞が徐々に障害され、網膜の菲薄化や地図状萎縮を伴う病態である (Ambati and Fowler, 2012; Bowes Rickman et al., 2013)。萎縮型には現在のところ明確な治療法がないので、ライフスタイルと食生活改善の指導や Evidence-based medicine (EBM) に基づいたサプリメント摂取を行い経過観察するしかなく、早急な治療薬の開発が望まれている。米国では視覚サイクル調節薬として、エミクススタト塩酸塩 (窪田ホールディングス株式会社) を萎縮型加齢黄斑変性の治療薬として開発していたが、臨床試験の第 2/3b 相試験で良好な成績を得ることができず依然として治療薬のない状況が続いている。

糖尿病網膜症は、糖尿病の三大合併症の一つであり、2010 年の患者数は世界中で 1 億 2,000 万人程度であり、2030 年には 1 億 9,000 万人にまで増加すると推定されている (Zheng et al., 2012)。症状が進行すると増殖糖尿病網膜症へと至り、

高血糖によって網膜中に生じた新生血管が硝子体に進出し、その血管の破綻によって硝子体出血が起こり急激な視力低下が起こる。また、出血によって増殖性組織が出現し、この増殖組織が網膜を牽引し網膜剥離を起こすことによって視力が低下する。糖尿病網膜症の程度に関わらず生じる合併症として糖尿病黄斑浮腫が知られている。糖尿病網膜症によって生じた新生血管が破綻し血液成分が黄斑部へ漏出すると、黄斑部に浮腫が起こり重篤な視力障害が起こる。その病態は多様であり、蛍光眼底造影によって局所性浮腫またはびまん性浮腫と診断され、光干渉断層撮影 (optical coherence tomography ; OCT) によって、スポンジ状浮腫、嚢胞様浮腫及びスポンジ状浮腫と診断される。さらにこれらの3つの病態は単独で生じるだけではなく相互に組み合わせられることによって複雑な病態となる (Fig. 4)。



**Fig. 4 The types of diabetic macular edema**

Source: Toidaishi 72 (3): 213-223, 2014

糖尿病網膜症の治療は初期には血糖コントロールを行うが、症状の進行に伴って新生血管をレーザーで焼灼し、新生血管の発生の予防や発生した新生血管の減少を目的とする網膜光凝固術や、硝子体出血や網膜剥離が生じてしまった場合は硝子体手術によって出血の除去や剥離した網膜を元に戻す治療が行われる。糖尿病黄斑浮腫に対しては、網膜光凝固術や硝子体手術以外にも薬物治療として新生血管からの血液成分漏出による黄斑浮腫を抑制する目的でルセンチイス<sup>®</sup>、アイリーア<sup>®</sup>などの VEGF 阻害薬やステロイドであるトリアムシノロンアセトニド (Triamcinolone acetonide ; TA) (マキュエイド<sup>®</sup>; わかもと製薬株式会社) の眼内注射が行われ治療効果を上げている。しかし、糖尿病黄斑浮腫の病態は多様であり、VEGF や炎症性サイトカインの関連度も異なり、単独の治療では症状の緩和及び視力の回復は難しいこともある。TA は投与後約 3 ヶ月、VEGF 阻害薬も投与後約 1~3 ヶ月程度浮腫抑制効果が得られるが、効果を失うと再投与が必要となる (Beer et al., 2003; Gaudreault et al., 2005)。TA は浮腫抑制効果こそ高いものの、白内障や眼圧上昇のリスクを伴う。VEGF 阻害薬も TA も治療効果は高いが、高額な治療費、反復投与による副作用、治療効果の減弱など、定期的に投与するにはどちらの薬にもリスクがある。

加齢黄斑変性や糖尿病黄斑浮腫のように治療薬のない疾患や一定の効果があるものの作用が限定的な薬に対して病態や薬のメカニズムを解明することは、最適な治療法の開発につながると考えられる。

本研究では、明確な治療法のない萎縮型加齢黄斑変性の病態解明と薬物治療を目的として病態モデルであるマウス網膜光障害モデルを用いた化合物の薬効評価を行うとともに、用いた化合物及びその標的が疾患の治療薬と成りうる可能性について検討を行った。また、トリアムシノロンアセトニドの薬効のメカニズムの一部を検討することによって糖尿病黄斑浮腫の治療の発展につなげる



ことを目的とした研究を行った。

第一章では萎縮型加齢黄斑変性モデルであるマウス網膜光障害モデルに対して抗酸化薬（ラジカルスカベンジャー）であるエダラボン（ラジカット<sup>®</sup>；田辺三菱製薬株式会社）の薬効を検討することで、萎縮型加齢黄斑変性の病態における酸化ストレスの関与とエダラボンが萎縮型加齢黄斑変性の治療薬となり得る可能性を検討した。第二章では、マウス網膜光障害モデルに対してカルパイン阻害薬である SNJ-1945 の薬効を評価し、萎縮型加齢黄斑変性におけるカルパインの関与及び SNJ-1945 が治療薬の候補となり得る可能性を検討した。第三章では糖尿病性黄斑浮腫の病態の一つである網膜血管透過性を指標としてトリアムシノロンアセトニドの作用機序を検討した。

## 第1章 網膜光障害モデルにおけるラジカルスカベンジャーの網膜保護作用

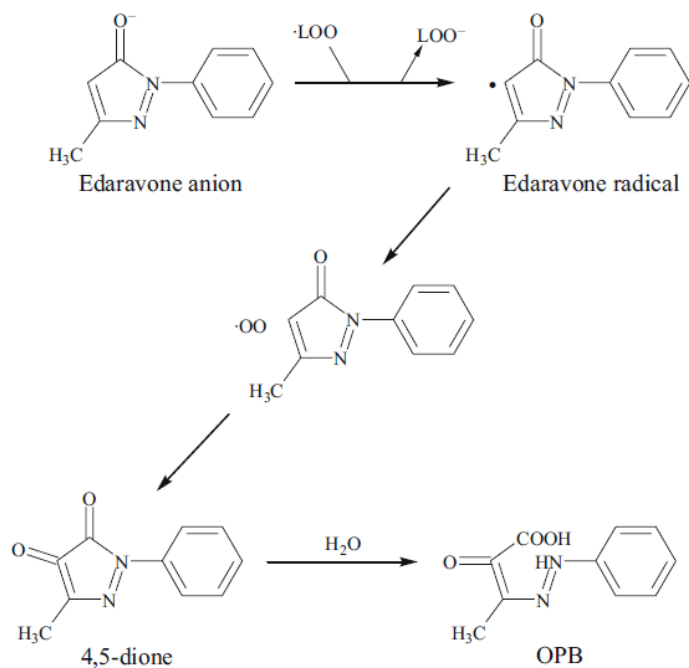
### 第1節 諸言

視細胞変性は不可逆的な障害で、夜盲や視野狭窄の原因となり最終的には中心視野の欠損に発展する。この視細胞変性には様々な原因が報告されており、活性酸素や一酸化窒素 (Nitric oxide : NO) の産生、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の上昇、ミトコンドリアの異常などが関連しているとされている (Wenzel et al., 2005)。生体内で網膜は特に酸素消費の激しい器官でスーパーオキシド ( $\text{O}_2^-$ ) や過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) のような活性酸素が発生しやすい。特に  $\text{O}_2^-$  や  $\text{H}_2\text{O}_2$  のような活性酸素が、生体内の金属イオンや紫外線と反応して生じるヒドロキシラジカル ( $\cdot\text{OH}$ ) は酸化力が非常に強く、脂質、タンパク質、核酸などの生体成分を攻撃し、受容体や酵素の機能に影響を与えたり、DNA 切断によって変異を起こすなど様々な影響を及ぼす。酸化ストレスとは生体内での酸化反応と抗酸化反応のバランスが崩れた状態のことで、酸化ストレスを受けると活性酸素の神経毒性によって神経細胞死を引き起こし、網膜症を始めとした様々な疾患の原因となることが知られている (Pettmann and Henderson, 1998)。過度の光に暴露されることは加齢黄斑変性の発症や症状の進行と関連していることから (Cruickshanks et al., 1993)、動物モデルにおいても過度の光照射によって網膜の視細胞変性が生じる (Noell et al., 1966; Shahinfar et al., 1991)。光照射によって起こる網膜視細胞変性の原因は環境要因や遺伝的要因など様々あり、光照射した直後に視細胞内節及び外節に酸化ストレス障害が生じている (Demontis et al., 2002; Yang et al., 2003)。視細胞では  $\text{O}_2^-$  を  $\text{H}_2\text{O}_2$  に変換する Superoxide dismutase (SOD) や、 $\text{H}_2\text{O}_2$  を水と酸素に分解するカタラーゼ、グルタチオンの存在下で  $\text{H}_2\text{O}_2$  を酸化型グルタチオンと水に還元するグルタチオンペルオキシダーゼなどの働きによってミトコンドリアの代謝によって産生される活性酸素の攻撃から細胞を保護している。SOD が適切

に機能しない遺伝子改変マウスでは、光照射による網膜障害が増悪し、さらに酸化ストレスの指標の1つである 4-Hydroxynonenal 及び 4-Hydroxyhexenal の産生が視細胞で増加する (Tanito et al., 2005)。また、光照射によって網膜中に  $H_2O_2$  の蓄積が生じ網膜障害を誘発する (Yamashita et al., 1992)。これらのことから、光照射によって活性酸素である  $O_2^-$ 、 $H_2O_2$ 、 $\cdot OH$  が産生され、酸化ストレスによって網膜視細胞障害へと至ると考えられる。光は加齢黄斑変性のリスクファクターの一つであることも知られている。加齢とともに光毒性の標的物質であるリポフスチンが蓄積するため、高齢者はより光暴露による影響を受けやすくなる (Warner et al., 2013)。リポフスチンは網膜色素上皮細胞内のリソソームが網膜視細胞内節を消化しきれずに発生する老廃物が蓄積した顆粒状物質である (Kennedy et al., 1995)。また、網膜は酸素消費が高く活性酸素の発生しやすい組織であり細胞膜中の多価不飽和脂肪酸濃度も高い。すなわちフリーラジカルによる脂質過酸化反応が生じ細胞膜が障害されやすく、そのため視細胞は障害を受けやすいと考えられる。これらのことや加齢黄斑変性と酸化ストレスの関与が報告されていることから考えると、加齢黄斑変性に対して酸化ストレスを標的とする治療薬は網膜保護効果が期待できる (Beatty et al., 2000)。

萎縮型加齢黄斑変性の患者では視細胞の萎縮によって網膜厚が減少する (Pappuru et al., 2011)。さらにラットに過度の光を照射することによって視細胞変性をはじめとした萎縮型加齢黄斑変性の末期状態と類似した網膜形態が認められる (Marc et al., 2008)。これらのことから光障害モデルは萎縮型加齢黄斑変性の末期の網膜の状態を再現することができ、病態解明に用いられるモデルの一つとして用いられている。過去に網膜光障害モデルを用いて様々な抗酸化薬の効果が検討されているが、実用化されたものはない (Organisciak et al., 1992; Ranchon et al., 2001; Tanito et al., 2002, 2007)。そこで臨床でも使用されている抗酸

化薬であるエダラボンに着目した。エダラボン (ラジカット®) (田辺三菱製薬株式会社) は脳梗塞の急性期及び筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の治療薬として臨床で使用されている。エダラボンは生理条件下では 50%がアニオンとして存在しており、 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{ONOO}^-$ 、脂質ペルオキシラジカル ( $\text{LOO}\cdot$ ) に対してエダラボンアニオンが電子を供与することによってラジカルスカベンジング作用を示す (Yoshida et al., 2006) (Fig. 5)。静脈内投与によって血液脳関門を通過するため血液網膜関門 (blood-retinal barrier: BRB) を通過し網膜に達することが考えられ、実際に *N*-Methyl-D-aspartate (NMDA) によるマウス網膜障害モデルにおいて、マウス網膜神経節細胞死を抑制する (Inokuchi et al., 2009)。臨床応用されていることから安全性も確保されており眼科応用による副作用の懸念も低いと考えられる。



**Fig. 5 Interaction of edaravone with free radical**

$\cdot\text{LOO}$ , lipid peroxy radical;  $\text{LOO}^-$ , lipid peroxy anion; 4,5-dione, 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-4,5-dione; OPB, 2-oxo-3-(phenylhydrazono)-butanoic acid.

Source : CNS Drug Rev. 2006 Spring;12(1):9-20.

第 1 章では、マウス網膜光障害モデルに対するエダラボンの網膜保護作用を検討するとともに、萎縮型加齢黄斑変性と酸化ストレスの関連について研究した。

## 第2節 実験材料及び方法

### 2-1 実験材料

本試験に用いた薬物及び試薬は下記のとおりである。

パラホルムアルデヒド (Paraformaldehyde)、スクロース (Sucrose)、塩化カリウム (Potassium chloride)、エタノール (Ethanol)、メタノール (Methanol)、過酸化水素 (Hydrogen peroxide)、サンプルバッファー (Sample buffer)、エダラボン (Edaravone) は和光純薬工業株式会社 (Osaka, Japan)、Block One-P、ペントバルビタール (Pentobarbital)、リン酸水素二ナトリウム・12 水 (Sodium hydrogenphosphate 12-water) 及びリン酸二水素ナトリウム二水和物 (Sodium dihydrogenphosphate dehydrate) はナカライテスク株式会社 (Kyoto, Japan)、キシレン (Xylene)、塩化ナトリウム (Sodium chloride) はキシダ化学株式会社 (Osaka, Japan)、ブロックエース (Block ace) は 大日本住友製薬株式会社 (Osaka, Japan)、ケタラル® (Ketalar) は第一三共株式会社 (Tokyo, Japan)、セラクター® (Celactal) はバイエル薬品株式会社 (Osaka, Japan)、O.C.T. compound はサクラファイネック株式会社 (Tokyo, Japan)、Vectastain elite Avidin Biotinylated Enzyme complex (ABC) kit、M.O.M. immunodetection kit 及び diaminobenzidine (DAB) peroxidase substrate kit は Vector Labs (Burlingame, CA, USA)、*In situ* Cell Death Detection Kit は Roche Diagnostics (Basel, Switzerland)、Protease K solution は Invitrogen (Carlsbed, CA, USA)、TSA Biotin system は Perkin Elmer (Waltham, MS, USA)、RIPA buffer、Protease inhibitor cocktail、Phosphatase inhibitor cocktail II、

Phosphatase inhibitor cocktail III は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)、Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate は Thermo Fischer SCIENTIFIC (Waltham, MA, USA)、オイキット (EUKITT) は O.Kindler (Freiburg, Germany)、Can get signal solution 1、Can get signal solution 2 は東洋紡 (Osaka, Japan)、Mouse anti-8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) monoclonal antibody は日本老化制御研究所 (Shizuoka, Japan)、ミドリン P<sup>®</sup> (Mydrin-P)、サイプレジン<sup>®</sup> (Cyplegin) は参天製薬株式会社 (Osaka, Japan) より購入した。

## 2-2 実験方法

### 2-2-1 実験動物

10 週齢雄性 ddY マウスは、日本エスエルシー株式会社 (Shizuoka, Japan) より購入した。動物は自由給水下に固形飼料 (CE-2; CLEA Japan, Tokyo, Japan) を用いて飼育した。実験を行うにあたっては、岐阜薬科大学動物飼育・動物実験委員会に動物実験承認申請を行い、許可を受けた上で実施した。

### 2-2-2 光誘発網膜障害モデル

マウスを 24 時間完全な暗室で飼育し暗順応させた。光照射 30 分前にサイプレジン<sup>®</sup>により散瞳させた後、鏡張りの光障害モデル作製装置の中で白色蛍光灯 (Toshiba, Tokyo, Japan) を用いて、8,000 lux の光環境下で 3 時間マウスを飼育することにより網膜障害を惹起した。光照射中の飼育環境は  $25 \pm 1.5$  °C を維持した。光照射後、マウスを暗室で 24 時間飼育しその後通常の明暗条件 (照明: 午前 8:00 - 午後 8:00) に戻して飼育した。

### 2-2-3 薬物の調製及び処置

エダラボンは、生理食塩液に溶解し投与した。腹腔内投与 (intraperitoneal injection; i.p.) には生理食塩液またはエダラボン 3 mg/kg を、静脈内投与 (intravenous injection; i.v.) には生理食塩液またはエダラボン 1 mg/kg を用いて作用を検討した。腹腔内投与では、光照射 30 分前と照射直後、その後 1 日 2 回投与した。静脈内投与はエダラボン 1 mg/kg の用量で光照射 30 分前と照射直後に投与した。溶媒群には、それぞれ生理食塩液を 10 ml/kg 投与した。

#### 2-2-4 Electroretinogram (ERG)測定

ERG (Mayo, Aichi, Japan) は、光照射 5 日後に暗室内で赤色灯下で測定を行った。マウスは測定の前 24 時間前から暗室にて飼育し暗順応させた。測定するマウスには、ケタラール® (ケタミン塩酸塩として 120 mg/kg)

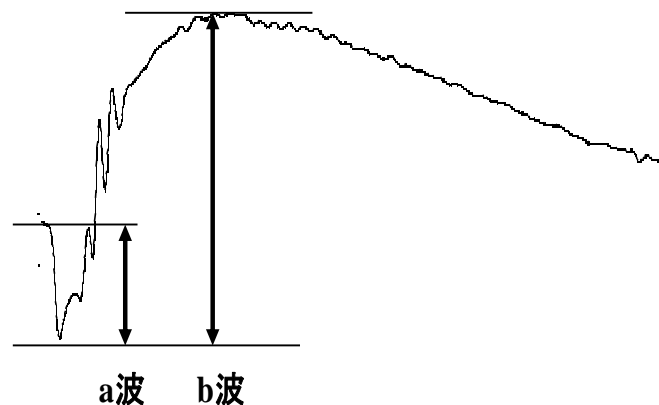


Fig. 6 Waveform of ERG in normal retina

及びセラクター® (キシラ

ジン塩酸塩として 6 gm/kg) の混合麻酔を腹腔内投与した。麻酔の確認後、マウスの瞳孔をミドリン P®を点眼することで散瞳させた。ERG は、マウスの角膜に光源付きの測定電極 (Mayo) を接触させ、不関電極 (Nihon Kohden, Tokyo, Japan) をマウスの口内に、アース電極 (Nihon Kohden) をマウスの尾付近の皮下に挿入後、予め設定した輝度条件の光によって網膜を刺激することで測定を行った。測定した ERG の波形から a 波と b 波の振幅を計測し評価を行った (Fig. 6)。a 波は網膜視細胞の細胞機能を評価する指標として用い、b 波はミュラー細胞や水平細胞などの網膜内層の細胞機能を評価する指標として用いた。

## 2-2-5 組織学的解析

### 2-2-5-1 組織切片の作成

マウスは、ペントバルビタールナトリウム (80 mg/kg) を腹腔内投与することで安楽死させた。安楽死の確認後、眼球を摘出し 4%パラホルムアルデヒド含有 0.1 M リン酸緩衝液 (pH7.4) を硝子体内投与し、同液中で 24 時間眼球を固定処理した。固定処理後、眼球は 70%エタノール 2 時間、90%エタノール 2 時間、95%エタノール 2 時間、99%エタノール 12 時間、無水エタノール 2 時間×2 回、キシレン 2 時間×2 回、キシレン 12 時間、融解パラフィン 2 時間×2 回、融解パラフィン 12 時間の順にそれぞれ浸透させた。その後、眼球をパラフィンで包埋し、ミクロトーム (Leica, Tokyo, Japan) を用いて 5  $\mu$ m の厚さに薄切し作製した切片をスライドガラス (Matsunami, Osaka, Japan) 上で一日乾燥させ室温で保存した。

### 2-2-5-2 ヘマトキシリン-エオジン染色

薄切した切片はキシレンに浸漬してパラフィンを溶解させた。その後段階的に濃度を下げたエタノールに浸透させ、蒸留水に浸透させた後、ヘマトキシリン液に 2 分間、エオジン液に 5 分間浸透させた。その後さらに段階的に濃度を上げたエタノールで脱水処理を行い、最後にキシレンで浸透しオイキットを用いて切片を封入した。

### 2-2-5-3 免疫染色用凍結切片の作製

マウスは、ペントバルビタールナトリウム (80 mg/kg) を腹腔内投与することで安楽死させた。安楽死の確認後、眼球を摘出し 4%パラホルムアルデヒド含有 0.1 M リン酸緩衝液 (pH7.4) を硝子体内投与し、同液中で 24 時間固定処理した。



ついで、25%スクロース含有 0.1 M リン酸緩衝液 (pH7.4) に交換し、4°C で 48 時間静置した。その後、O.C.T compound を用いて眼球を包埋し、薄切まで-80°C にて保管した。薄切はクリオスタット (Leica) を用いて-20°C で厚さ 10 µm の切片を作製した。薄切した切片は MAS コーティングされたスライドガラス (Matsunami) に貼り付け、免疫染色を行うまで-80°C にて保管した。

#### 2-2-5-4 TUNEL 染色

-80°C で保存した凍結切片を-20°C で 1 時間放置した後、室温で 10 分間乾燥させ、Phosphate buffered saline (PBS) に浸して O.C.T. Compound を洗浄した。その後、Super PAP pen (Invitrogen) にて反応液の流出を防ぐために切片の周囲を囲んだ。TUNEL 染色には、*In Situ* Cell Death Detection Kit 及び TSA Biotin system を用いた。氷上で Permeabilization buffer で 5 分間反応させ、抗体の浸透性を高めた。洗浄後、予め調製し氷冷しておいた反応調製液 (TdT Enzyme : labeling safe buffer = 1:10) を滴下し、乾燥防止のためカバーガラスを乗せて 37°C で 60 分間反応させた。その後 PBS による洗浄を行い、水溶性封入剤を用いて封入し蛍光観察した。

#### 2-2-5-5 免疫染色

-80°C で保存した凍結切片を-20°C で 1 時間放置した後、室温で 10 分間乾燥させ、PBS に浸して O.C.T. Compound を洗浄した。その後、Super PAP pen にて反応液の流出を防ぐために切片の周囲を囲んだ。0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含有メタノールで 10 分間反応させた後、1% Bovine serum albumin (BSA) 及び及び 1.5% Normal goat serum で 2 時間ブロッキングした。ブロッキング後、抗 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) 抗体 (1:20) を用いて 37°C で 2 時間反応

させた。その後、二次抗体 Biotinylated anti-mouse IgG によって 1~2 時間反応させ、Vectastain Elite ABC kit 及び DAB peroxidase substrate kit を用いて染色した。染色後、2-2-5-1 と同様に段階的にアルコールで脱水し、キシレンで浸透し封入した。ネガティブコントロールには、一次抗体を除いたコントロールを用意し、一次抗体の特異性について検討を行った。

## 2-2-6 ウェスタンブロット解析

### 2-2-6-1 試料採取

マウスは、ペントバルビタール (80 mg/kg) の腹腔内投与によって安楽死させた。安楽死の確認後、マウス眼球を摘出し、さらに網膜を単離し、マイクロチューブの中に入れ、液体窒素で急速凍結させた。サンプルは使用時まで-80°C で保管した。タンパク質抽出には RIPA buffer [50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、0.5% デオキシコール酸ナトリウム、0.1% Sodium dodecyl sulfate (SDS)、1% Igepal CA-630]、Protease inhibitor cocktail、Phosphatase inhibitor cocktail II 及び III を混合しタンパク質抽出液として用いた (それぞれ 100 : 1 : 1 : 1)。網膜に対して 100  $\mu$ L のタンパク質抽出液を添加し、ホモジナイザー (Pycotron, Microtec Co., Chiba, Japan) を用いて氷中で 30 秒間ホモジナイズした。その後、20 分間氷中に静置させ、12,000  $\times$ g、4°C、20 分間遠心分離した。遠心分離した上清を回収し、タンパク質抽出液とした。

### 2-2-6-2 タンパク質定量

タンパク質定量は BCA Protein Assay kit を用いて行った。スタンダードとして、Albumin standard を 0~2,000  $\mu$ g/ml の濃度範囲で用いた。希釈液には RIPA buffer を用いた。それぞれのサンプルは RIPA buffer で 10 倍希釈した。Working reagent

を添加後、37°C のインキュベーターで 30 分間反応させ、その後 Varioskan Flash (Thermo Fischer SCIENTIFIC) を用いて 532 nm の吸光度を測定した。タンパク質濃度は、RIPA buffer を用いて 10 µg/ml に調整し、同量のサンプルバッファー (20% 2-Mercaptoethanol 含有) を加えて 5 µg/ml とした。調製後のサンプルは、電気泳動まで -80°C に保存した。

#### 2-2-6-3 電気泳動及び転写

タンパク質濃度を調整したサンプルを -80°C から取り出し、氷上で融解させた後 100°C で 5 分間煮沸処理し、室温にて 5 分間、12,000 ×g で遠心した。SDS polyacrylamide gel (SuperSep 10%) を用い、1 well 当たりの添加量は、分子量マーカーを 5 µL、各サンプルを 5 µg とした。サンプルを添加後、ゲル 1 枚当たり 20 mA で 70 分間泳動した。泳動後、ゲルを

]に 15 分間浸した。転写膜 (Immobilon P) (Millipore, Billerica, MA, USA) はメタノールに 30 秒間浸し、超純水に 15 分間浸した。その後、Anode buffer 2 (25 mM Tris、20% メタノール) に 15 分間浸した。陽極側から、Anode buffer 1 (0.3 M Tris、20% メタノール) に浸したろ紙、Anode buffer 2 に浸したろ紙、転写膜、ゲル、2 枚の Cathode buffer に浸したろ紙の順に重ね、転写膜 1 枚当たり 0.8 mA/cm<sup>2</sup> で 45 分間転写した。

#### 2-2-6-4 ウェスタンブロッティング

転写後、0.05% Tween 20 含有 50 mM TBS (T-TBS: 10 mM Tris、40 mM Tris hydrochloride、150 mM NaCl) で洗浄し、Block One-P または T-TBS で 10 倍希釈したブロックエースに浸して、それぞれ室温で 30 分間または 1 時間ブロッキングした。その後 T-TBS で洗浄し、Can get signal solution 1 または T-TBS で 10 倍

希釈したブロックエースで希釈した一次抗体に浸し、4°Cで一晩反応させた。その後、転写膜は T-TBS で洗浄し、Can get signal solution 2 または T-TBS で 10 倍希釈したブロックエースで希釈した二次抗体に浸し、室温で 1 時間静置した。T-TBS で洗浄した後、イムノスター<sup>®</sup>LD (Wako) に 5 分間浸した。その後、Luminescent image analyzer LAS-4000 UV mini (Fujifilm, Tokyo, Japan) 及び Multi Gauge Ver. 3.0 (Fujifilm) を用いて検出した。

一次抗体には、Mouse anti phosphorylated-p38 monoclonal antibody (Promega, Tokyo, Japan) (1:1000)、Rabbit anti phosphorylated-JNK polyclonal antibody (Cell Signaling Technology Japan, Tokyo, Japan) (1:1000)、Rabbit anti phosphorylated-ERK 1/2 polyclonal antibody (Cell Signaling) (1:1000)、Mouse anti p38 monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) (1:1000)、Rabbit anti JNK polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) (1:1000)、Rabbit anti ERK 1/2 polyclonal antibody (Cell Signaling) (1:1000) and Mouse anti  $\beta$ -actin monoclonal antibody (Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan) (1:4000)、二次抗体には、Goat anti rabbit HRP-conjugated (Thermo Fischer SCIENTIFIC) (1:2000) or Goat anti-mouse HRP-conjugated (Thermo Fischer SCIENTIFIC) (1:2000) を用いた。

#### 2-2-7 統計学的解析

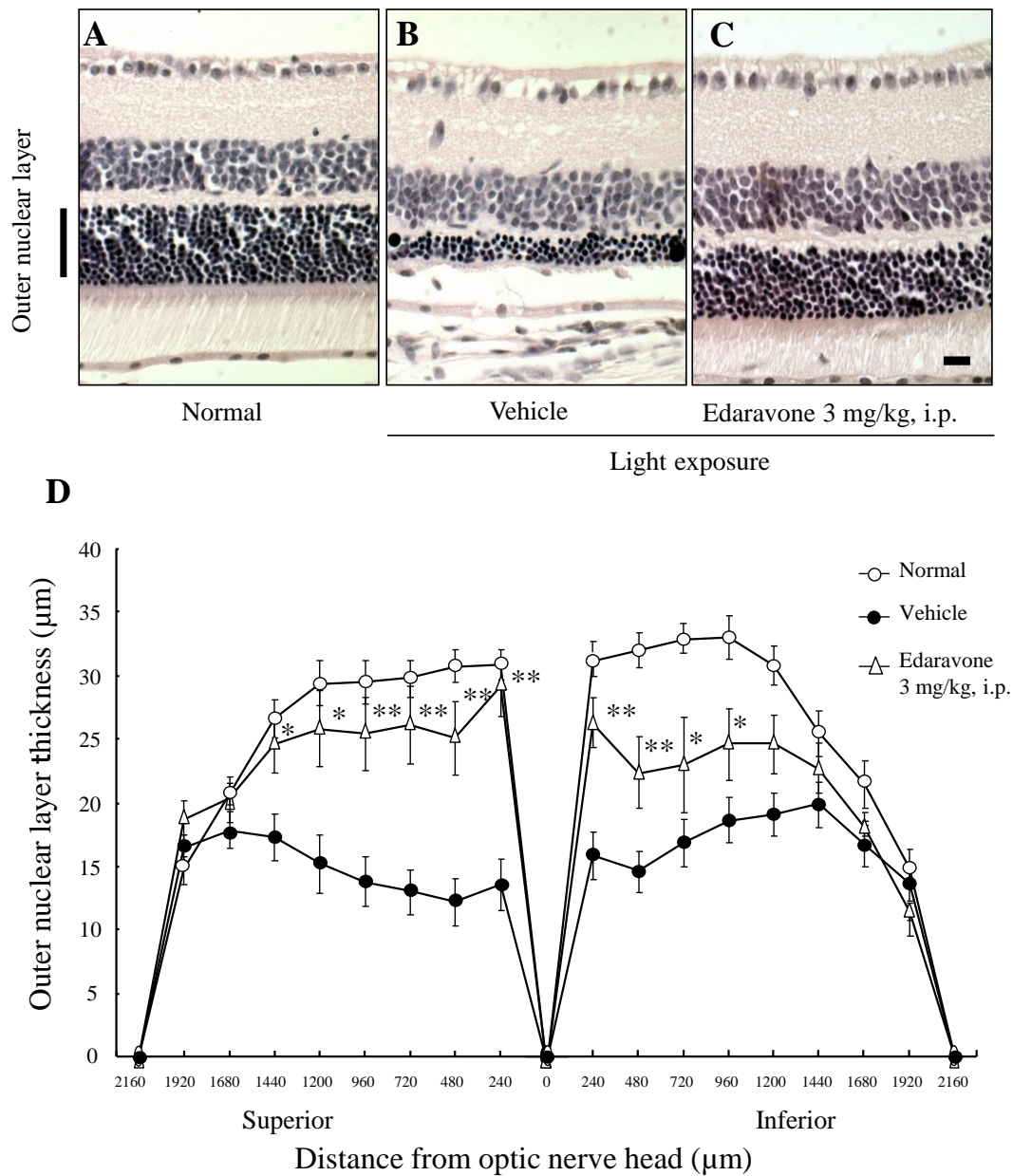
データは平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。統計学的な比較は、STAT VIEW (SAS Institute Japan 株式会社, Tokyo, Japan) を用いて Student's *t*-test あるいは Dunnett's test により行った。危険率 5 %未満を有意差有りとした。

### 第3節 実験成績

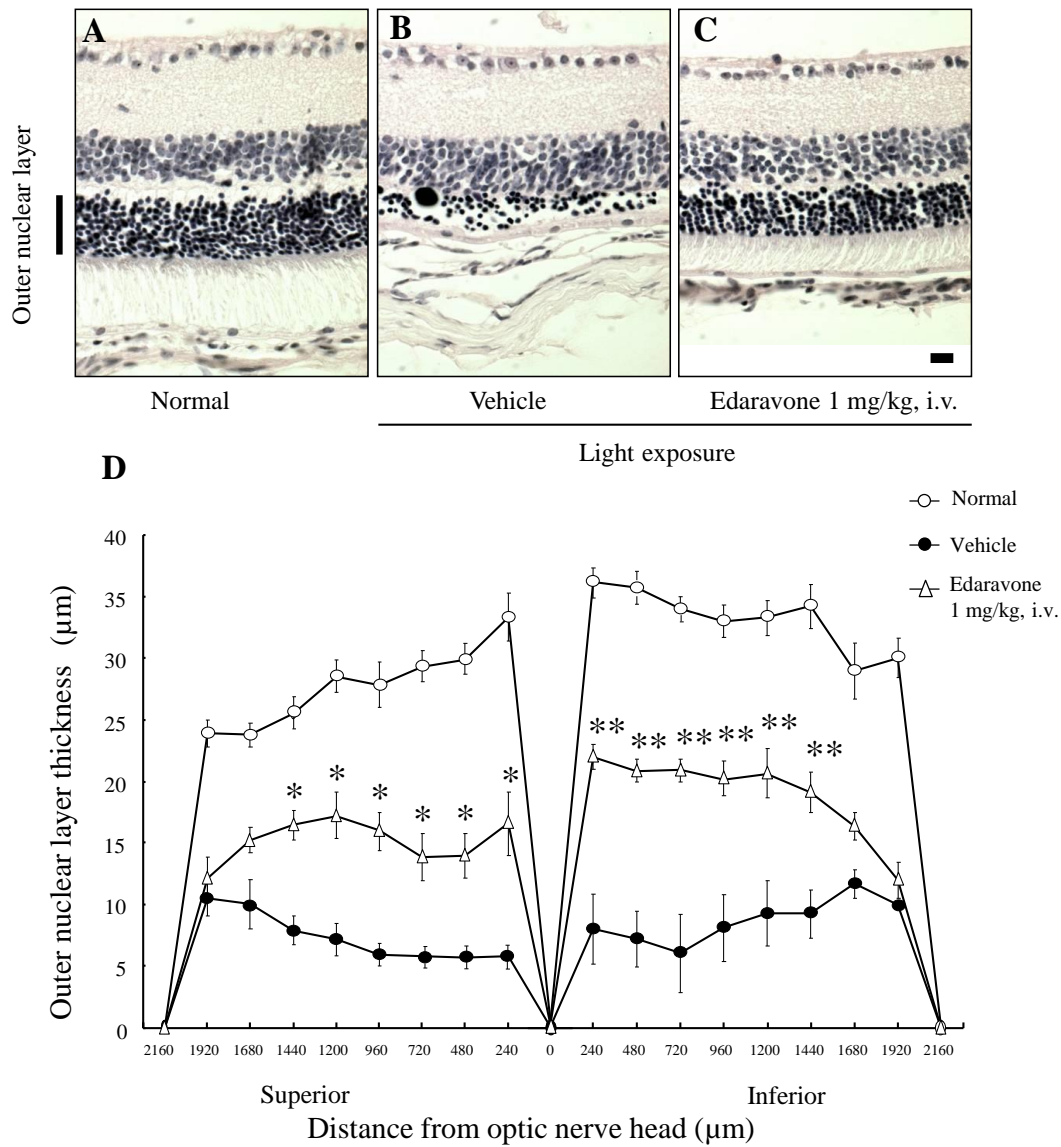
#### 3-1 光誘発網膜障害に対するラジカルスカベンジャーの視細胞保護作用

ラジカルスカベンジャーであるエダラボンの視細胞保護作用を検討するために、マウス網膜に光誘発網膜障害を惹起させ、視細胞層の厚みの変化を検討した。視細胞層は視神経から 240  $\mu\text{m}$  間隔で 1920  $\mu\text{m}$  まで測定した。また、網膜の上部及び下部の両側で評価を行った。エダラボンは 3 mg/kg を腹腔内投与または 1 mg/kg を静脈内投与して評価を行った。その結果、光照射を行っていない正常網膜群と比較して、光照射を行い生理食塩水の腹腔内投与を行った溶媒投与群では有意な視細胞層 (ONL) の萎縮が認められた (Superior :  $p < 0.01$  at 240, 480, 720, 960, 1200, 1440  $\mu\text{m}$ ) (Inferior :  $p < 0.05$  at 1440  $\mu\text{m}$ ,  $p < 0.01$  at 240, 480, 720, 960, 1240  $\mu\text{m}$ ) (Fig. 7A, B, D)。溶媒群に対して、エダラボン (3 mg/kg, i.p.) 投与群では、光照射 30 分前と照射直後、その後 5 日間 1 日 2 回投与することにより、光照射による ONL の萎縮を有意に抑制し (Fig. 7B, C, D)、その萎縮を最大 24% 軽減させた。

また、エダラボンの臨床における投与経路である静脈内投与による効果も検討した。その結果、無処置の正常網膜群と比較して生理食塩水を静脈内投与した溶媒群では有意な ONL の萎縮が認められた (Fig. 8A, B, D)。溶媒投与群と比較してエダラボン投与群 (1 mg/kg, i.v.) では、光照射 30 分前と照射直後に投与することにより、光照射による ONL の萎縮を有意に抑制した (Fig. 8B, C, D)。以上の結果から、エダラボンは光照射による網膜障害に対して保護作用を示すことが示唆された。



**Fig. 7** Effects of edaravone (i.p.) on retinal damage induced by exposure to light in mice. (A) Nontreated, (B) light exposure (8,000 lux) plus vehicle-treated, and (C) light exposure plus edaravone-treated (3 mg/kg i.p.) retinal cross sections at 5 days after light exposure in mice. (D) Measurement of thickness in the outer nuclear layer (ONL) at 5 days after light exposure. Data are shown as means  $\pm$  S.E.M.,  $n = 6 \sim 8$ . \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. light exposure plus vehicle-treated group. The scale bar represents 25  $\mu\text{m}$ .



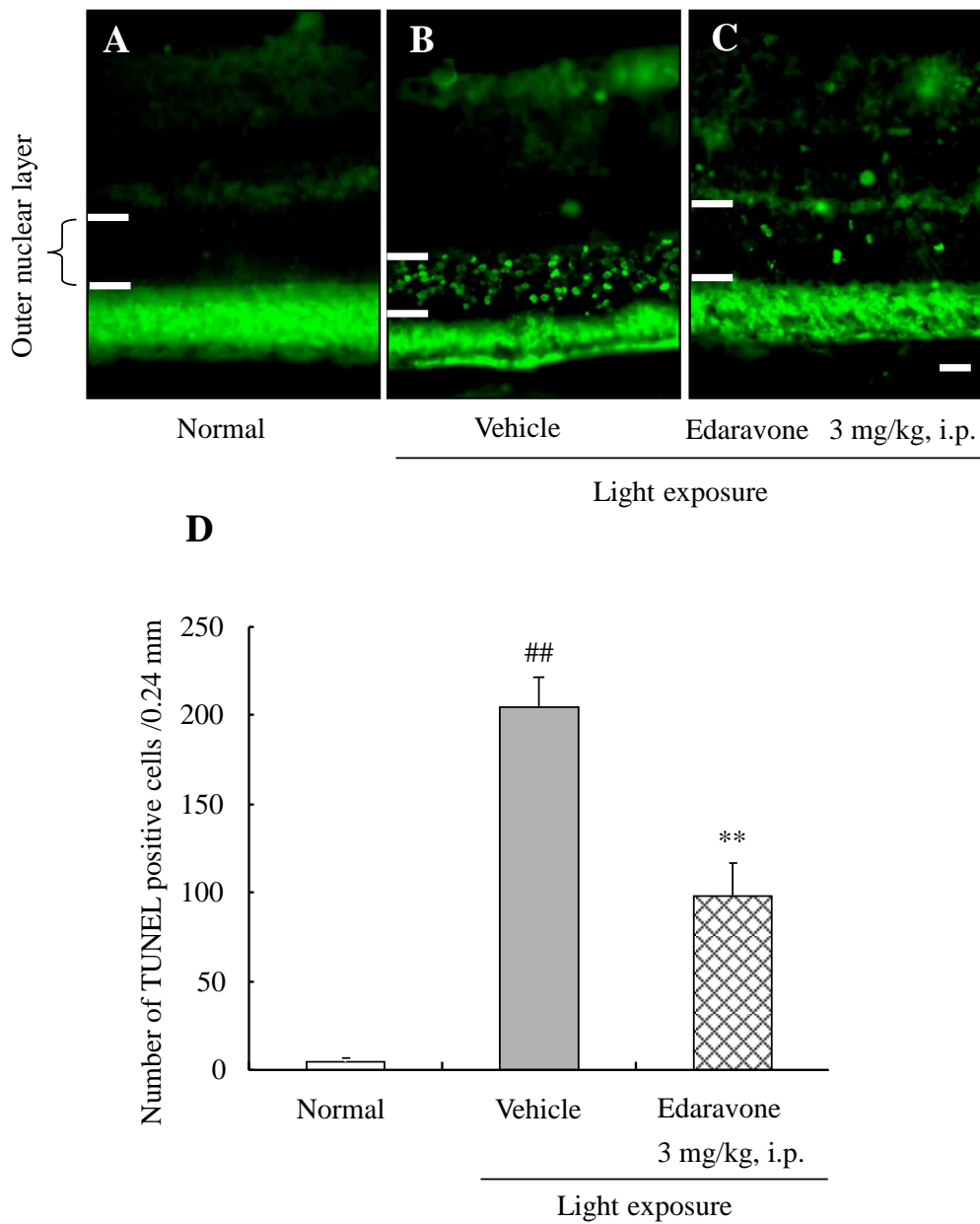
**Fig. 8** Effects of edaravone (i.v.) on retinal damage induced by exposure to light in mice.

(A) Nontreated, (B) light exposure (8,000 lux) plus vehicle-treated, and (C) light exposure plus edaravone-treated (1 mg/kg, i.v.) retinal cross sections at 5 days after light exposure in mice. (D) Measurement of the thickness in the outer nuclear layer at 5 days after light exposure. Data are shown as means  $\pm$  S.E.M.,  $n = 6 \sim 8$ . \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. light exposure plus vehicle-treated group. The scale bar represents 25  $\mu\text{m}$ .

### 3-2 光誘発 TUNEL 陽性細胞発現に対する効果の検討

光照射によって生じる網膜視細胞のアポトーシスに対するエダラボンの効果を検討するため、TUNEL 染色を行った。TUNEL 陽性細胞の発現は、無処置の正常網膜の ONL には認められなかった。一方、光照射 48 時間後、生理食塩液を腹腔内投与した溶媒投与群では ONL に TUNEL 陽性細胞の発現が認められた (Fig. 9A, B, D)。この溶媒投与群と比較して、エダラボン (3 mg/kg, i.p.) 投与群では TUNEL 陽性細胞の発現増加は有意に抑制された (Fig. 9B, C, D)。エダラボンは、光照射の前後、光照射後 2 日間投与することで TUNEL 陽性細胞の増加を 52%抑制した (Fig. 9D)。以上の結果から、エダラボンは光照射による視細胞のアポトーシスを抑制することが示唆された。



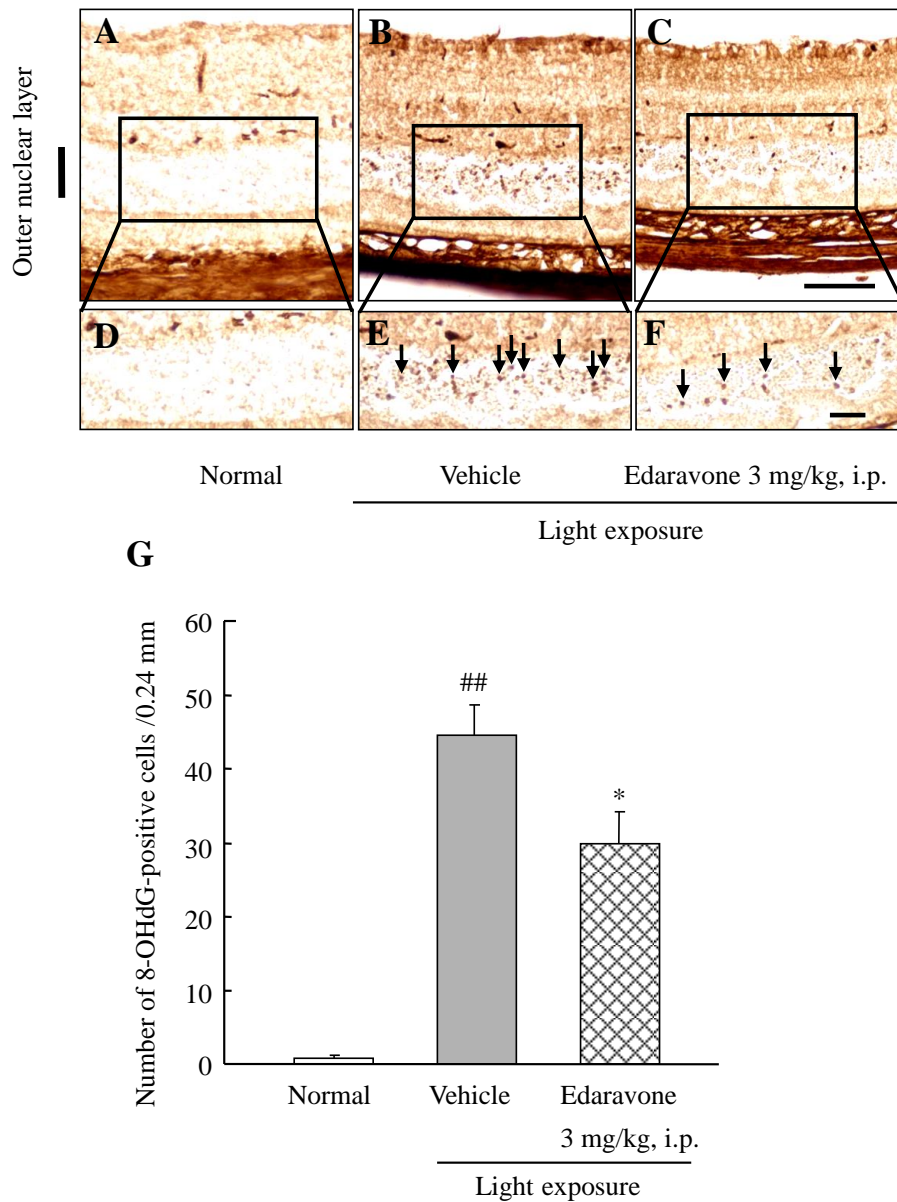


**Fig. 9** Effects of edaravone on light-induced expression of TUNEL-positive cells in the mouse retina.

(A) Nontreated, (B) light exposure (8,000 lux) plus vehicle-treated, and (C) light exposure plus edaravone-treated (3 mg/kg, i.p.) retinal cross sections at 48 h after light exposure. (D) Quantitative analysis of the number of TUNEL-positive cells in the outer nuclear layer at 48 h after light exposure. Data are shown as means  $\pm$  S.E.M.,  $n = 7$  or  $8$ .  $**p < 0.01$  vs. light exposure plus the vehicle-treated group.  $^{##}p < 0.01$  vs. Normal. The scale bar represents 25  $\mu\text{m}$ .

### 3-3 光誘発 8-OHdG 陽性細胞発現に対するラジカルスカベンジャーの効果の検討

光照射による網膜障害と酸化ストレスとの関連を解明するために、視細胞層における酸化ストレスマーカーである 8-OHdG の産生に関する検討を行った。その結果、無処置の正常網膜群では視細胞層に 8-OHdG の産生はほとんど認められなかった (Fig. 10A, D, G)。一方、正常網膜群と比較して溶媒投与群では視細胞層において 8-OHdG の発現が認められた (Fig. 10B, E, G)。この溶媒投与群に対して、エダラボン (3 mg/kg, i.p.) 投与群では視細胞層における 8-OHdG の発現が有意に抑制された (Fig. 10C, F, G)。また、溶媒投与群と比較したエダラボン (3 mg/kg, i.p.) 投与群の 8-OHdG 陽性細胞の抑制率は 37%であった (Fig. 10G)。以上の結果から、エダラボンは光照射によって生じる酸化ストレスを抑制して網膜障害に対する保護作用を有することが示唆された。

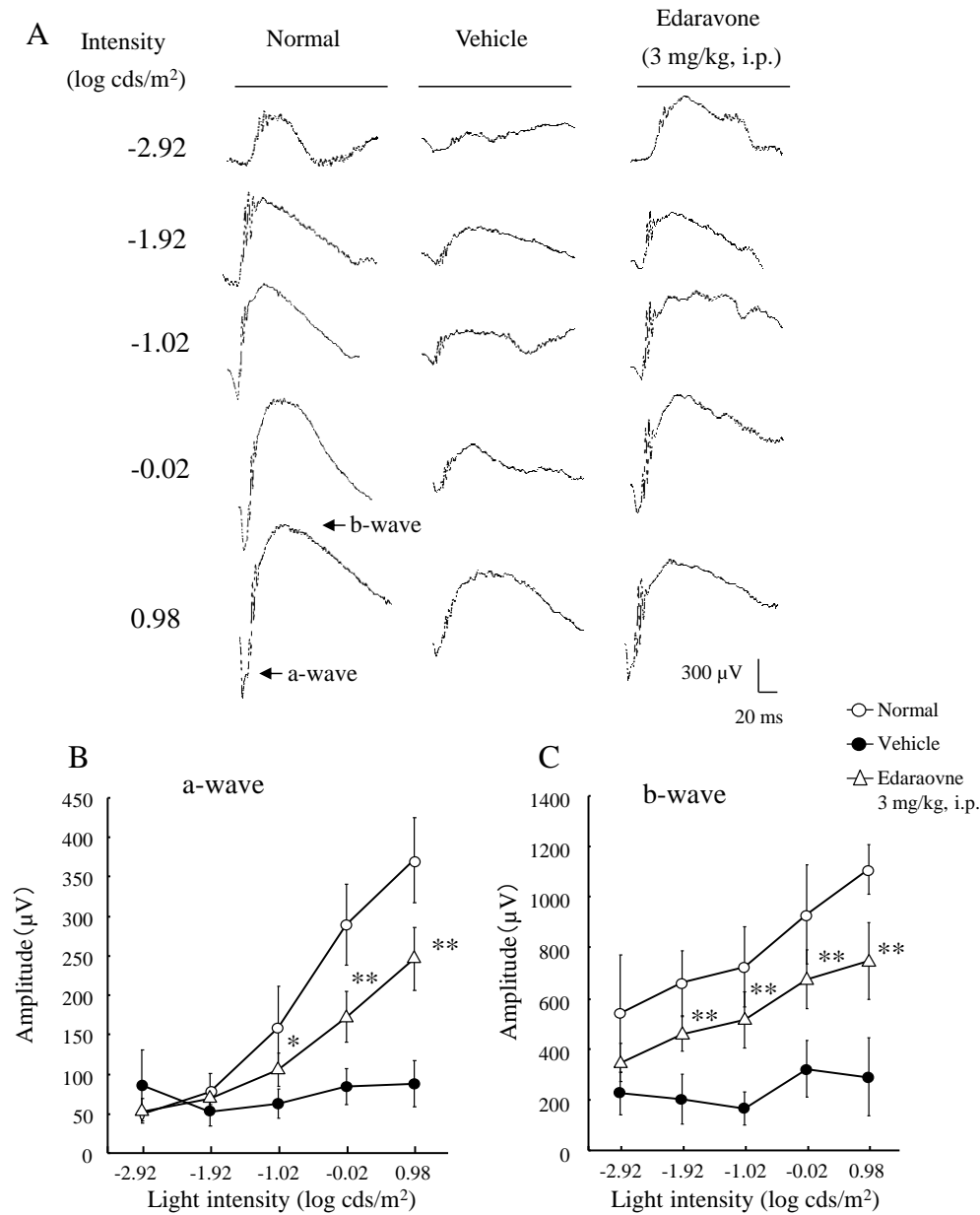


**Fig. 10** Effect of edaravone on light-induced expression of 8-OHdG-positive cells in the mouse retina.

Expression of 8-OHdG-positive cells in (A and D) nontreated, (B and E) light exposure (8,000 lux) plus vehicle-treated, and (C and F) light exposure plus edaravone-treated (3 mg/kg, i.p.) retinal cross section at 24 h after light exposure. Arrows (E and F) show the 8-OHdG-positive cells. (G) Quantitative analysis of the number of 8-OHdG-positive cells in the outer nuclear layer at 24 h after light exposure. Data are shown as means  $\pm$  S.E.M.,  $n = 8 \sim 10$ . \* $p < 0.05$  vs. vehicle plus the light-exposed group. <sup>##</sup> $p < 0.01$  vs. Normal. The scale bars represent 50  $\mu\text{m}$  (A-C) and 25  $\mu\text{m}$  (D-F).

### 3-4 光照射による網膜機能低下に対するラジカルスカベンジャーの効果の検討

光照射によって網膜障害が惹起され、エダラボンは網膜障害を保護することが示された。エダラボンは網膜障害を保護するだけでなく、網膜機能に対しても保護効果を示すかを解明することを目的として ERG を測定することによって網膜機能の評価を行った。光照射による網膜機能の低下は、視細胞機能の指標である a 波振幅、ミュラー細胞や双極細胞機能の指標である b 波振幅の低下によって確認した。a 波について光照射を行わなかった正常網膜群と比較して、溶媒投与群において光照射による網膜機能の低下が認められた ( $p < 0.05$ ;  $-1.02 \text{ cds/m}^2$ ,  $p < 0.01$ ;  $-0.02 \text{ cds/m}^2$ ,  $p < 0.01$ ;  $0.98 \text{ cds/m}^2$ ) (Fig. 11A, B)。また、b 波についても正常網膜群と比較して溶媒投与群において光照射による網膜機能の低下が認められた ( $p < 0.01$ ;  $-1.92 \text{ cds/m}^2$ ,  $p < 0.01$ ;  $-1.02 \text{ cds/m}^2$ ,  $p < 0.01$ ;  $-0.02 \text{ cds/m}^2$ ,  $p < 0.01$ ;  $0.98 \text{ cds/m}^2$ ) (Fig. 11A, C)。ERG 測定における最大測定強度である  $0.98 \text{ cds/m}^2$  におけるそれぞれの低下率は a 波が 76%、b 波が 73%であった (Fig. 11B, C)。この溶媒投与群に対して、エダラボン (3 mg/kg, i.p.) 投与群では光照射による網膜機能の低下の抑制が認められた (Fig. 11B, C)。エダラボン (3 mg/kg, i.p.) は光照射 30 分前と光照射直後、その後 5 日間 1 日 2 回投与することによって、a 波の振幅低下を 47%、b 波の振幅の低下を 41%抑制した (Fig. 11B, C)。以上の結果から、エダラボンは光照射による視細胞萎縮を抑制するだけでなく、網膜機能も維持していることが明らかになった。

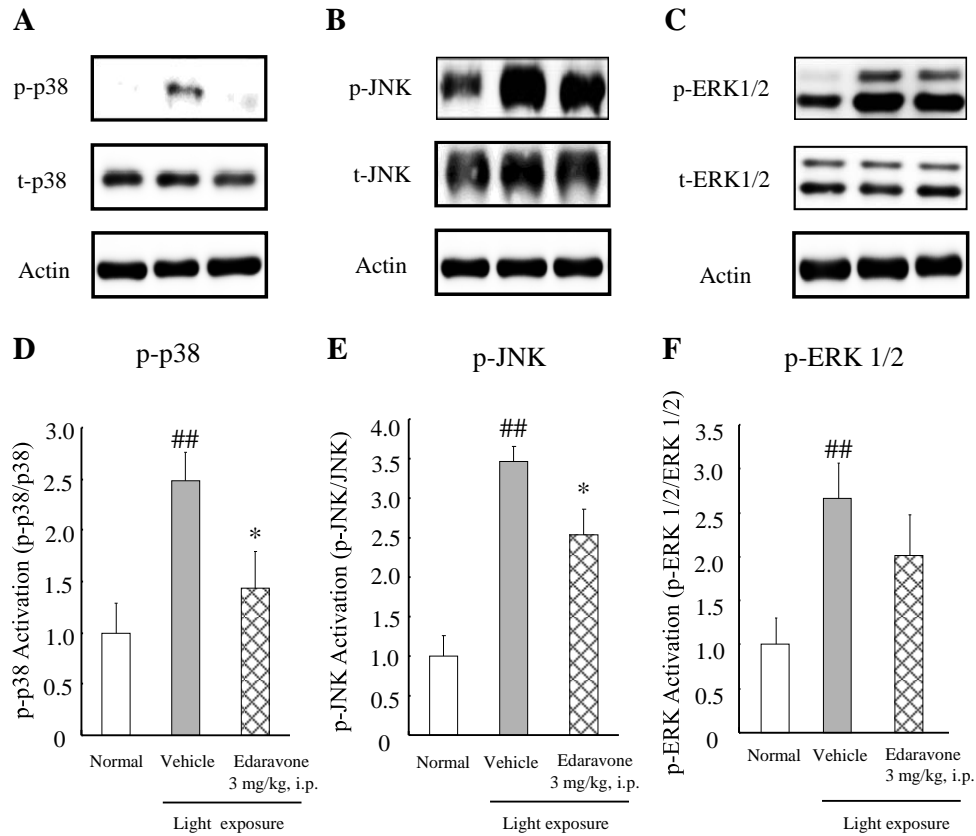


**Fig. 11 Measurement of the dark-adapted ERG amplitudes at 5 days after exposure to light in the mouse retina.**

(A) Typical traces of dark-adapted ERG responses measured at 5 days after exposure to light. Stimulus flashes were used from -2.92 to 0.98 log cds/m<sup>2</sup>. (B and C) Amplitudes of a- and b-waves of light exposure (8,000 lux) plus the vehicle-treated group vs. light exposure plus the edaravone-treated group (3 mg/kg, i.p.). Data are shown as means ± S.E.M., n = 6 ~ 8. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 vs. light exposure plus the vehicle-treated group.

### 3-5 光照射による MAPKs (p38、JNK、ERK1/2) のリン酸化に対するラジカルスカベンジャーの効果の検討

*In vivo* 及び *in vitro* のいずれにおいても、網膜障害によって Mitogen-activated Protein Kinases (MAPKs) がリン酸化されることが報告されている (Munemasa et al., 2005; Yang et al., 2007)。そこで、光誘発網膜障害に対するエダラボンの保護作用のメカニズムを解明するために、MAPKs のリン酸化に対するエダラボンの作用を検討した。MAPKs は p38、c-Jun N-terminal kinase (JNK) 、extracellular signal regulated protein kinases 1/2 (ERK1/2) の 3 種類を測定した。正常網膜群と比較して、光照射を行った溶媒投与群では p38、JNK 及び ERK1/2 のいずれの MAPKs もリン酸化の亢進が認められた。溶媒投与群と比較して、エダラボン(3 mg/kg, i.p.) 投与群は、p38 及び JNK のリン酸化を有意に抑制した (Fig. 12A, B, D, E)。しかし、ERK1/2 のリン酸化に対して抑制傾向は認められたが有意ではなかった (Fig. 12C, F)。これらの結果より、エダラボンの投与によって光照射による MAPKs のリン酸化を抑制することで網膜保護作用を示すことが示唆された。



**Fig. 12 Effect of edaravone on light-induced expressions of phosphorylated-p38, JNK, and ERK in the mouse retina.**

Representative band images showing activation of p38 (A), JNK (B), and ERK (C) in the non-treated, light exposure (8,000 lux) plus vehicle treated, and light exposure plus edaravone (3 mg/kg, i.p.)-treated retina. Quantitative analysis of the band density of p38 (D), JNK (E), and ERK (F) at 6 h after exposure to light plus vehicle-treated and edaravone (3 mg/kg, i.p.)-treated group in mice. Data are shown as means  $\pm$  S.E.M.,  $n = 6$  or  $7$ . \* $p < 0.05$  vs. light exposure plus vehicle-treated group. <sup>##</sup> $p < 0.01$  vs. Normal.

#### 第4節 考察

光誘発網膜障害は、光照射によるフリーラジカルの産生、細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度や NO の上昇などが起こるために生じる (Wenzel et al., 2005)。本研究では、光照射による網膜障害に対する酸化ストレスの関与を解明するとともに、新たな治療薬の開発を目的としてラジカルスカベンジャーであるエダラボンを用いて薬効評価を行った。これまでにエダラボンは網膜をはじめとして脳、腎臓、肝臓などで活性酸素の関連した障害モデルにおける保護効果が報告されている (Matsuyama et al., 2006; Taniguchi et al., 2007; Inokuchi et al., 2009)。そのため、エダラボンには活性酸素の関連した疾患に対する治療効果が期待される。今回筆者は、エダラボンが光誘発マウス網膜障害において強い保護作用を示すことを明らかにした。

網膜が強い光に暴露されると多量の活性酸素を生じる。通常であれば SOD、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼなどの抗酸化機構によって活性酸素は分解され網膜は保護される (Dong et al., 2006)。しかし、光照射後のラット網膜中では、SOD の抗酸化能を上回る  $\text{O}_2^-$  が産生されることによって網膜障害に至る (Yamamoto et al., 1999)。また、SOD1 変異マウスは、通常の光環境下でも  $\text{O}_2^-$  を処理できないため網膜障害が惹起される (Mittag et al., 1999)。これらの報告から、光照射によって  $\text{O}_2^-$  が多量に産生された結果、 $\text{H}_2\text{O}_2$  や  $\cdot\text{OH}$  が生体内の抗酸化機構を上回るほど産生され、酸化ストレスが網膜機能の低下や網膜細胞死と関連していることが示唆される (Hashizume et al., 2008)。

エダラボン 3 mg/kg をラットに腹腔内投与した時の最大血中濃度 (maximum drug concentration ;  $\text{C}_{\text{max}}$ ) は 1728.7 ng/mL (9.9  $\mu\text{M}$ ) となることが非臨床試験において報告されている (Takamatsu et al., 1997)。*In vitro* において網膜前駆細胞株 (RGC-5) を用いて  $\text{O}_2^-$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$  及び  $\cdot\text{OH}$  に対するエダラボンのラジカル消去能が検討され、エダラボンは  $\text{O}_2^-$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$  及び  $\cdot\text{OH}$  に対して 1  $\mu\text{M}$  以上でラジカル消去能



を示した。特に、 $\cdot\text{OH}$  に対しては  $\text{O}_2^-$  や  $\text{H}_2\text{O}_2$  よりも強い抑制作用を示した (Inokuchi et al., 2009)。この結果を踏まえて、マウスを用いた本実験におけるエダラボンの投与用量は 3 mg/kg の腹腔内投与に設定し、さらに網膜神経節細胞保護作用を示した 1 mg/kg における静脈内投与も検討した。

本検討では、光照射 5 日後、生理食塩液投与群において外顆粒層 (ONL) の萎縮が認められた。これに対して、エダラボン 3 mg/kg 腹腔内投与群及び 1 mg/kg 静脈内投与群は、この萎縮を抑制した。光照射による細胞死の大半はアポトーシス依存性である (Wenzel et al., 2005)。本検討に用いたマウス光障害モデルの外顆粒層 (ONL) 中でも光照射 12 時間後から TUNEL 陽性細胞の発現が増加し始め、48 時間後にピークに達したことから、光照射によって視細胞にアポトーシスが誘導されていることが確認された。光照射 48 時間後マウス網膜の ONL 中に TUNEL 陽性細胞数が増加したが、エダラボン投与によってこの TUNEL 陽性細胞数の増加が有意に抑制された。エダラボンは、光照射によって発生した網膜内の  $\text{O}_2^-$  や  $\cdot\text{OH}$  を消去して視細胞のアポトーシスを抑制し、網膜保護作用を示すと考えられた。

エダラボンが光照射による視細胞変性を抑制したことから、光照射によって視細胞内でフリーラジカル産生が起これ、その結果アポトーシスが誘導され視細胞変性を惹起することが示唆された。この際に ONL に酸化ストレスが生じていることを確認するために、酸化ストレスの指標である 8-Hydroxy-2'-deoxyguanine (8-OHdG) を用いた。8-OHdG は DNA を構成する塩基の一つであるグアニンがヒドロキシル化された物質で、 $\cdot\text{OH}$  によって DNA 中のデオキシグアノシンが酸化されることによって生成されることから、酸化ストレスを受けて DNA が損傷したことを示す酸化ストレスマーカーである (Valavanidis et al., 2009)。光照射によって照射 24 時間後に ONL に 8-OHdG 陽性細胞の増加が確認された。これに対して、

エダラボン投与によって 8-OHdG 陽性細胞数の増加が抑制された。この結果から、光照射によって ONL に酸化ストレスが誘導されアポトーシスへ繋がっていることが示唆された。また、エダラボンが光照射によって産生されたフリーラジカルを消去して視細胞保護作用を示していることが明らかになった。エダラボンは光照射による視細胞の萎縮を抑制することが明らかになったが、細胞は保持されていてもその機能が維持されていなければ治療にはつながらない。光照射によって、生理食塩液投与群では a 波及び b 波の振幅の低下が認められた。しかし、エダラボン 3 mg/kg 腹腔内投与は、光照射による a 波及び b 波の振幅低下を有意に抑制した。よって、エダラボンは光照射による視細胞萎縮を抑制するだけでなく、視機能も維持することが明らかになった。

活性酸素が生じると MAPKs の上流にある MAPK キナーゼキナーゼ (MAP3Ks) が酸化的修飾を受け活性化される。その結果、その下流の MAPK キナーゼ (MAPK2) がリン酸化され MAPKs が活性化される (Son et al., 2013)。また、活性酸素は、MAPKs を脱リン酸化することによって活性を制御する役割をもつ MAPK ホスファターゼ (MPK) を抑制して MAPKs を活性化させる。MAPKs ファミリーは、セリン/スレオニンキナーゼの一種であり細胞外のシグナルを細胞内へ伝達する役割を持つことが知られており、MAPKs ファミリーには p38、JNK 及び ERK1/2 が存在する。MAPKs は生体内で細胞の増殖や細胞死を制御しており、神経変性疾患と関与することも知られている (Miloso et al., 2008)。Yang らは *in vitro* において 661W 細胞に光照射を行い視細胞死と MAPKs の関連を検討し、光照射によって p38、JNK 及び ERK1/2 がリン酸化されることを報告している (Yang et al., 2007)。本研究において、光照射によって照射 6 時間後のマウス網膜中で p38、JNK 及び ERK1/2 がリン酸化されることを確認した。さらに、エダラボンの投与によって p38 及び JNK のリン酸化が抑制されたが、ERK1/2 のリン酸化は抑制傾向ではあ

るものの有意ではなかった。ERK1/2 は epidermal growth factor receptor (EGFR) を介してリン酸化され、 $H_2O_2$  は EGFR を活性化し ERK1/2 を制御する (Meng et al., 2007)。光照射によって EGFR 受容体の発現が増加することが報告されていることから (Close et al., 2006)、増加した EGFR に光照射によって生じた活性酸素が反応して ERK1/2 のリン酸化に寄与していると考えられる。エダラボンは  $H_2O_2$  を含む活性酸素を消去することから EGFR 受容体を介した ERK1/2 のリン酸化に対して抑制傾向を示したと考えられる。Activator protein-1 (AP-1) はアポトーシスに関連しており視細胞変性に関与している (Grimm et al., 2000)。AP-1 は Jun タンパク質、Fos タンパク質などから構成される二量体タンパク質で c-Jun N-terminal kinase (JNK) による Jun タンパク質である c-jun の活性化や p38 によって AP-1 が活性化される。エダラボンは、光照射による活性酸素によって p38 や JNK がリン酸化されたことによる AP-1 活性化を抑制し視細胞変性を抑制している可能性が考えられる。また、活性酸素は Apoptosis signal-regulated kinase 1 (ASK1) を活性化する。ASK1 は通常は生体内の抗酸化物質であるチオレドキシシンと複合体を形成しているが、活性酸素によって酸化されると ASK-1 がチオレドキシシンから乖離し p38 及び JNK を活性化する。エダラボンはこの ASK-1 の乖離を抑制し、p38 及び JNK の活性化を抑制する (Tsujiimoto et al., 2005)。MAPKs の活性化は、MAPKs の脱リン酸化酵素である MAPK phosphatase (MKP) によっても制御されており、この MKP は活性酸素によって不活性化される (Suzuki et al., 2005)。また、ヒト網膜色素上皮細胞株 (ARPE-19) に光照射を行うと MKP が不活性化され JNK の活性化が促進される (Lornejad-Schäfer et al., 2009)。以上のことから、エダラボンは活性酸素を消去した結果、EGFR の活性化抑制による ERK1/2 のリン酸化抑制、チオレドキシシンからの ASK-1 の乖離の抑制による p38 及び JNK のリン酸化抑制及び MKP の活性化による MAPKs 脱リン酸化の促進などを介して MAPKs の活性化を

抑制している可能性が考えられた。

本研究では、エダラボンが光誘発網膜障害モデルに対して保護作用を示すことを明らかにした。この結果から、光照射による視細胞変性には酸化ストレスが大きく関わっており、この酸化ストレスシグナル伝達機構は萎縮型加齢黄斑変性の薬物治療の標的となることが考えられる。エダラボンは候補化合物の一つに成得る可能性が示唆された。さらに、エダラボンは薬物送達システム (DDS) の一つであるリポソームに封入することによって点眼で NMDA 網膜障害モデルや光障害モデルで保護作用を示すことから (Shimazaki et al., 2011)、今後点眼製剤として加齢黄斑変性治療薬としての開発が期待される。

## 第2章 網膜光障害モデルにおけるカルパイン阻害薬の網膜保護作用

### 第1節 諸言

カルパインは  $\text{Ca}^{2+}$  依存性の細胞質内システインプロテアーゼであり、カルパインファミリーは生体内に普遍的に存在するカルパイン 1 ( $\mu$ -カルパイン) 及びカルパイン 2 (m-カルパイン) を始め 15 種のカルパイン遺伝子が同定されている (Evans and Turner, 2007)。カルパイン 1 及び 2 は、細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  及び生体内カルパイン阻害タンパク質であるカルパスタチンによって活性が制御されている (Saido et al., 1992)。また、生体内では細胞骨格や細胞運動性の制御、細胞周期の調節、アポトーシスや長期増強など様々な機能を発揮していることが示唆されている (Goll et al., 2003)。

カルパインによるタンパク質分解は、神経変性疾患に関わるとされており、アルツハイマー病、脳虚血、ハンチントン病やパーキンソン病など様々な疾患に関与していることが報告されている (Artal-Sanz and Tavernarakis, 2005)。網膜において、カルパイン及びカルパスタチンは、ウサギの網膜色素上皮細胞をはじめ視細胞を含む網膜外層及び内層に発現が認められている (Persson et al., 1993)。ヒト、サル及びラット網膜においてもカルパイン及びカルパスタチンの遺伝子発現が確認されており、ラット及びサルではカルパイン 1 に対してカルパイン 2 の発現が高く、ヒトではカルパイン 1 及び 2 よりカルパスタチンの遺伝子発現が高い (Oka et al., 2006)。このようにカルパインは視細胞をはじめとして網膜に広く存在し、緑内障、加齢黄斑変性、網膜色素変性症などの網膜症とカルパインの活性化との関連も報告されている (Paquet-Durand et al., 2007)。マウス網膜視細胞株 (661W) を用いた実験において、加齢黄斑変性のリスクファクターである光照射によってカルパインが活性化され、カルパイン阻害薬によって細胞死を抑制することが報告されている (Kanan et al., 2007)。また、遺伝性の

網膜視細胞変性マウスや *N-Methyl-N-nitrosourea* (MNU) 誘発マウス網膜視細胞変性モデルにおいても視細胞内でカルパインの活性化が認められており、カルパイン阻害薬が視細胞死を抑制する (Paquet-Durand et al., 2010 ; Kuro et al., 2011)。これらの報告からカルパインは萎縮型加齢黄斑変性における網膜視細胞変性に関して重要な役割を果たしていることが考えられる。そこで、萎縮型加齢黄斑変性の視細胞萎縮の原因の一つとしてカルパインに着目した。

本章では、マウス網膜光障害モデルに対するカルパイン阻害薬 SNJ-1945 の網膜保護作用を検討するとともに、萎縮型加齢黄斑変性におけるカルパインの関与を検討した。また、その結果からカルパインは萎縮型加齢黄斑変性の治療標的と成りうるか検討した。

## 第2節 実験材料及び方法

### 2-1 実験材料

本試験に用いた薬物及び試薬は下記のとおりである。

パラホルムアルデヒド、スクロース、塩化カリウム、エタノール、メタノール、過酸化水素、サンプルバッファー、SNJ-1945 は千寿製薬株式会社 (Osaka, Japan)、Block One-P、リン酸水素二ナトリウム・12 水及びリン酸二水素ナトリウム二水和物、ペントバルビタールはナカライテスク株式会社、キシレン、塩化ナトリウムはキシダ化学株式会社、ブロックエースは大日本住友製薬株式会社、ケタラール<sup>®</sup>は第一三共株式会社、セラクター<sup>®</sup>はバイエル薬品株式会社、O.C.T. compound はサクラファインテック株式会社、Vectastain elite Avidin Biotinylated Enzyme complex (ABC) kit、M.O.M. immunodetection kit 及び Diaminobenzidine (DAB) peroxidase substrate kit は Vector Labs、*In Situ Cell Death Detection Kit* は Roche Diagnostics (Basel, Switzerland)、Protease K solution は

Invitrogen、TSA Biotin system は Perkin Elmer (Waltham, MS, USA)、RIPA buffer、Protease inhibitor cocktail、Phosphatase inhibitor cocktail II、Phosphatase inhibitor cocktail III は Sigma-Aldrich、Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate は Thermo Fischer SCIENTIFIC、オイキットは O.Kindler、Can get signal solution 1、Can get signal solution 2 は東洋紡、ミドリン P<sup>®</sup>、サイプレジン<sup>®</sup>は参天製薬株式会社、Caspase-Glo 3/7 Assay Systems は Promega (Madison, WI, USA) より購入した。

## 2-2 実験方法

### 2-2-1 実験動物

9～10 週齢の雄性 ddY マウスは日本エスエルシー株式会社より購入した。動物は自由給水下に固形飼料を用いて飼育した。実験を行うにあたっては、岐阜薬科大学動物飼育・動物実験委員会に動物実験承認申請を行い、許可を受けた上で実施した。

### 2-2-2 薬物の調製及び処置

カルパイン阻害薬である ((1S)-1-(((1S)-1-benzyl-3-cyclopropylamino-2,3-di-oxopropyl) amino) carbonyl)-3-methylbutyl)carbamic acid 5-methoxy-3-oxapentyl ester (SNJ-1945) は千寿製薬株式会社 (Kobe, Japan) から恵与された。SNJ-1945 は 0.5%の Carboxymethyl cellulose に懸濁して 100 及び 200 mg/kg を経口投与または 100 mg/kg を腹腔内投与した。対照群には 0.5%の Carboxymethyl cellulose を 10 mL/kg の容量で経口投与または腹腔内投与した。

### 2-2-3 光誘発網膜障害モデル

マウス光誘発網膜障害モデルの作製は、第 1 章 2-2-2 に準じて行った。

### 2-2-4 ERG 測定

ERG (Mayo, Aichi, Japan) は光照射 5 日後に暗室内で赤色灯下で測定を行った。測定は第 1 章 2-2-4 に準じて行った。

### 2-2-5 組織学的解析

#### 2-2-5-1 組織切片作製

組織切片の作製は、第 1 章 2-2-5-1 に準じて行った。

#### 2-2-5-2 ヘマトキシリン-エオジン染色

作製した組織切片のヘマトキシリン-エオジン染色は、第 1 章 2-2-5-2 に準じて行った。

#### 2-2-5-3 免疫染色用凍結切片作製

免疫染色用凍結切片の作製は、第 1 章 2-2-5-3 に準じて行った。

#### 2-2-5-4 TUNEL 染色

作製した凍結切片の TUNEL 染色は、第 1 章 2-2-5-4 に準じて行った。

### 2-2-6 ウェスタンブロット解析

#### 2-2-6-1 試料採取

ウェスタンブロット解析のための試料採取は、第 1 章 2-2-6-1 に準じて行った。



#### 2-2-6-2 タンパク質定量

タンパク質定量は、第 1 章 2-2-6-2 に準じて行った。

#### 2-2-6-3 電気泳動及び転写

電気泳動及び転写は、第 1 章 2-2-6-3 に従って行った。

#### 2-2-6-4 ウェスタンブロッティング

ウェスタンブロッティングは、第 1 章 2-2-6-4 に準じて行った。

一次抗体には、Mouse anti- $\alpha$ -spectrin monoclonal antibody (Millipore) (1:2000)、p35/25 rabbit monoclonal antibody (Cell Signaling Technology )(1:1000) 、 $\beta$ -actin mouse monoclonal antibody (Sigma-Aldrich) (1:4000) を用いた。二次抗体には、Goat anti rabbit HRP-conjugated (Thermo Fischer SCIENTIFIC) (1:2000) または Goat anti-mouse HRP-conjugated (Thermo Fischer SCIENTIFIC) (1:2000)を用いた。

#### 2-2-7 カスパーゼ 3/7 活性測定

マウスを 80 mg/kg のペントバルビタールの腹腔内投与によって安楽死させた。安楽死の確認後、眼球を摘出しさらに網膜を単離した。単離した網膜はすぐに液体窒素にて凍結させた。RIPA buffer に Protease inhibitor cocktail 及び Phosphatase inhibitor cocktail を添加したタンパク質抽出液を添加し、ホモジナイザーによって網膜を破碎した。網膜破碎液は 12000  $\times$ g で 20 分遠心し上清を回収し実験に使用した。タンパク質定量は 2-2-5-2 項に従って行った。

カスパーゼ-3/7 は Caspase-Glo 3/7 Assay を用いてキットのプロトコールに従って測定した。サンプルはマイクロプレートリーダー (Thermo Fischer SCIENTIFIC) を用いて発光を測定した。

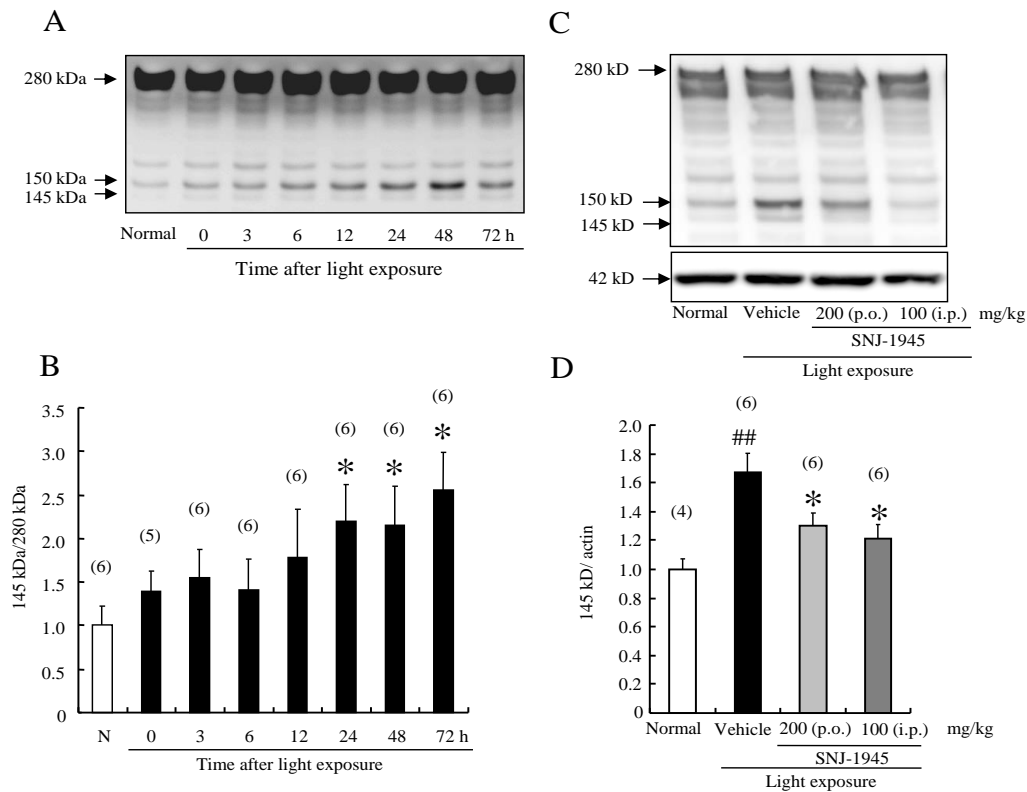
#### 2-2-8 統計学的解析

データは平均値±標準誤差で示した。統計学的な比較は、STAT VIEW (SAS Institute Japan 株式会社, Tokyo, Japan) を用いて Student's *t*-test あるいは Dunnett's test により行った。危険率 5 %未満を有意差有りとした。

### 第3節 実験成績

#### 3-1 光照射によるカルパインの活性化に対する SNJ-1945 の作用

本試験では、光照射後のマウス網膜におけるカルパインの活性化について検討した。また、そのカルパインの活性化に対するカルパイン阻害薬 SNJ-1945 の全身投与（経口または腹腔内投与）の作用について検討した。カルパインの活性化は  $\alpha$ -Spectrin の断片化を指標とした。 $\alpha$ -Spectrin は分子量 280kD のタンパク質でカルパインにより切断をうけ、カルパイン及びカスパーゼ 3 による 150kD の分解産物及びカルパイン特異的な 145kD の分解産物が生じる (Nath et al., 1996)。正常網膜と比較して光照射後の網膜中に断片化した  $\alpha$ -Spectrin が時間依存的に増加し、24 時間以降で有意な増加が認められた (Fig. 13A, B)。すなわち、光照射によってカルパインの活性化が認められた。このカルパイン活性化に対して、SNJ-1945 は経口投与 (200 mg/kg) または腹腔内投与 (100 mg/kg) することによって、光照射による  $\alpha$ -Spectrin の断片化を抑制した (Fig. 13C, D)。このことから、SNJ-1945 は全身投与することで BRB を通過して網膜に達し、光照射によるカルパインの活性化を抑制することが示唆された。



**Fig. 13 Changes in proteolysis of  $\alpha$ -spectrin after light exposure in the mouse retina and the effects of SNJ-1945.**

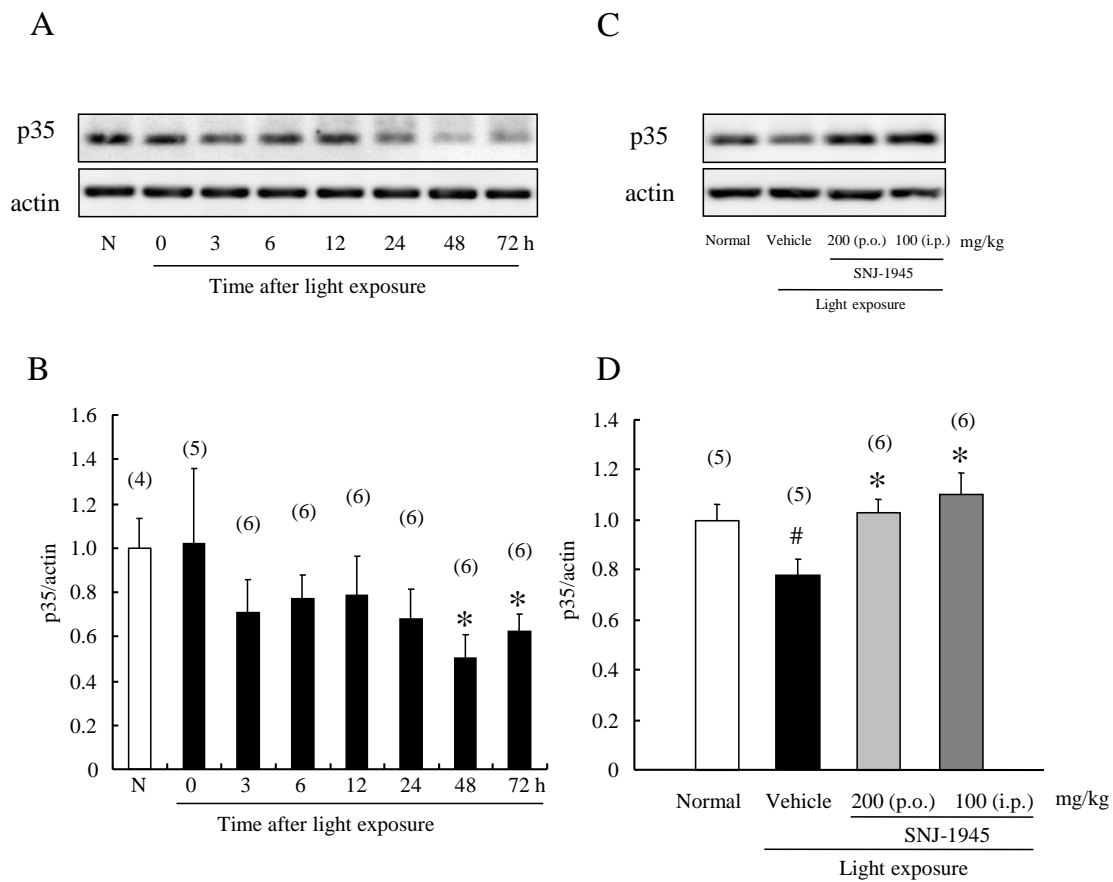
A, representative immunoblots showing proteolysis of  $\alpha$ -spectrin in retinal extracts at 0, 3, 6, 12, 24, 48, and 72 h after light exposure in mice. B, quantitative analysis of the band density of the cleaved products at 145 and 150 kDa of  $\alpha$ -spectrin (280 kDa). Data are shown as mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 5$  or 6). The number in parentheses above each column represents the number of animals. \*,  $p < 0.05$  versus nontreated group (Normal). C, representative immunoblots showing proteolysis of  $\alpha$ -spectrin in mouse retinal extracts at 24 h after light exposure with or without treatment with SNJ-1945. SNJ-1945 (at 200 mg/kg p.o. and 100 mg/kg i.p.) or an identical volume (10 ml/kg) of vehicle (0.5% sodium carboxymethyl cellulose) was administered at 30 min before and just after light exposure. D, quantitative analysis of the band density at 145/150 kDa (proteolyzed from  $\alpha$ -spectrin at 280 kDa). Data are shown as means  $\pm$  S.E.M.,  $n = 4$  to 6. The number in parentheses above each column represents the number of animals. \*,  $p < 0.05$  versus light exposure plus vehicle-treated group; ##,  $p < 0.01$  versus nontreated group (Normal).

### 3-2 光照射による p35 の分解に対する SNJ-1945 の作用

光照射によってカルパインが活性化することが示唆されたが、本試験ではさらにカルパイン活性化によって分解される p35 (Cdk5 regulator protein) を指標にして検討を行った。p35 はサイクリン依存性キナーゼ 5 (Cyclin-dependent kinase 5 ; Cdk5) の活性化サブユニットであり、カルパインによって限定分解されて p25 タンパク質を生じる (Lee et al., 2000)。光照射によって 3 時間後からマウス網膜中で p35 の分解が確認され、48 時間後のマウス網膜において有意な p35 の分解が認められた(Fig. 14A, B)。また、光照射 48 時間後に生じる p35 の分解に対して、SNJ-1945 を経口投与 (200 mg/kg) または腹腔内投与 (100 mg/kg) したところ、p35 の分解を有意に抑制した (Fig. 14C, D)。以上の結果から、光照射によってマウス網膜内でカルパインが活性化され、SNJ-1945 の投与によってカルパイン活性化を抑制できることが明らかになった。

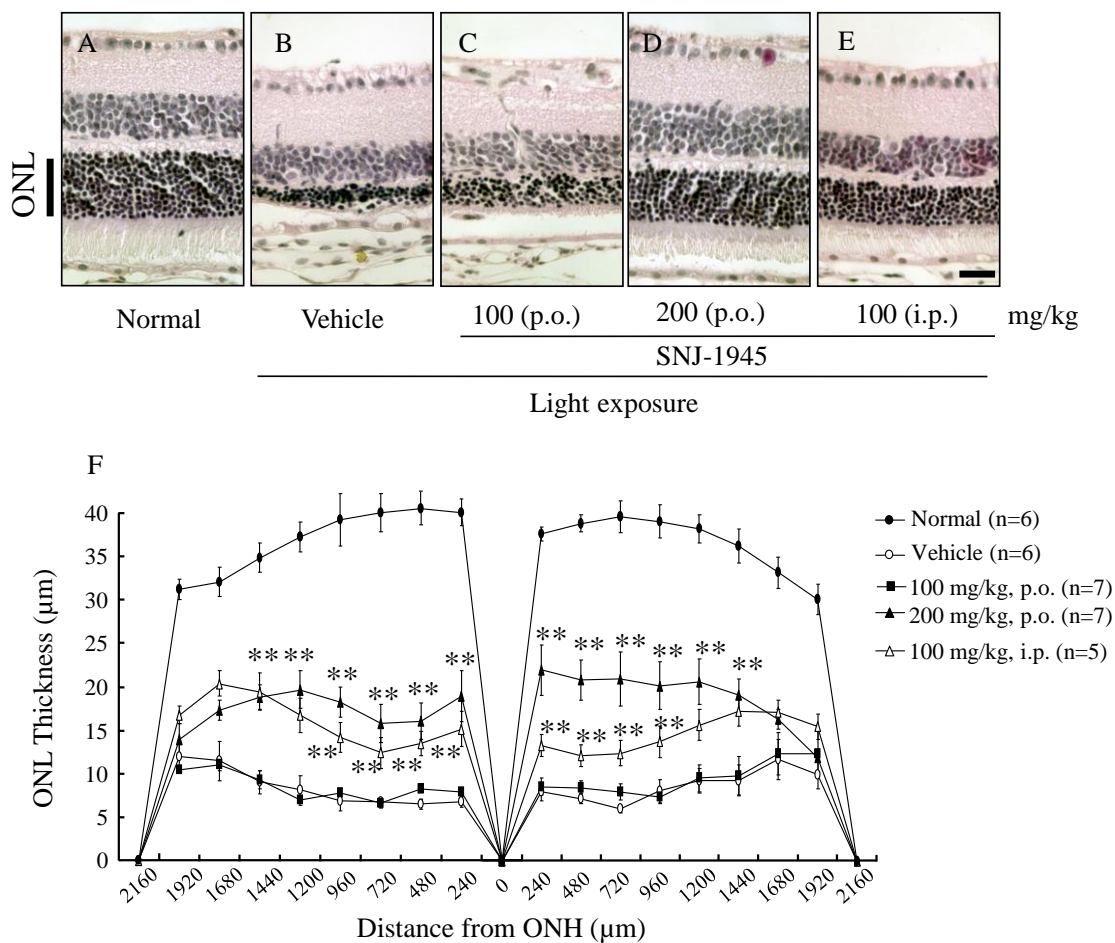
### 3-3 光誘発網膜障害に対する SNJ-1945 の作用

光照射によってマウス網膜内でカルパインが活性化され、SNJ-1945 はこのカルパインの活性化を抑制したので、本試験では光誘発網膜障害が SNJ-1945 の投与によって抑制されるかを検討し、光誘発網膜障害におけるカルパイン活性化の関与を検討した。その結果、正常網膜群と比較して、光照射群では有意に外顆粒層 (ONL) の萎縮が認められた (Fig. 15A, B, F)。この光照射群に対して、SNJ-1945 経口投与 (100 及び 200 mg/kg) 群では 200 mg/kg の用量で ONL の萎縮を抑制した (Fig. 15B, C, D, F)。また、腹腔内投与 (100 mg/kg) 群においても光照射による ONL の萎縮を有意に抑制した (Fig. 15B, E, F)。以上の結果から、光照射による視細胞変性に対して SNJ-1945 が有効であること、また、光照射による視細胞変性にはカルパインの活性化が強く関与していることが示唆された。



**Fig. 14 Changes in proteolysis of p35 after light exposure in the mouse retina and the effect of SNJ-1945.**

A, representative immunoblots showing p35 protein levels in retinal extracts at 48 h after light exposure in mice. B, quantitative analysis of the band density at 35 kDa. Data are shown as mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 5$  or  $6$ ). The number in parentheses above each column represents the number of animals. \*,  $p < 0.05$  versus nontreated group (Normal). C, representative immunoblots showing proteolysis of p35 in mouse retinal extracts at 48 h after light exposure with or without treatment with SNJ-1945. SNJ-1945 (at 200 mg/kg p.o. and 100 mg/kg i.p.) or an identical volume (10 ml/kg) of vehicle (0.5% sodium carboxymethyl cellulose) was administered at 30 min before and just after light exposure. D, quantitative analysis of the band density at p35/actin. Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 5$  or  $6$ ). The number in parentheses above each column represents the number of animals. \*,  $p < 0.05$  versus light exposure plus vehicle-treated group; #,  $p < 0.05$  versus nontreated group (Normal).



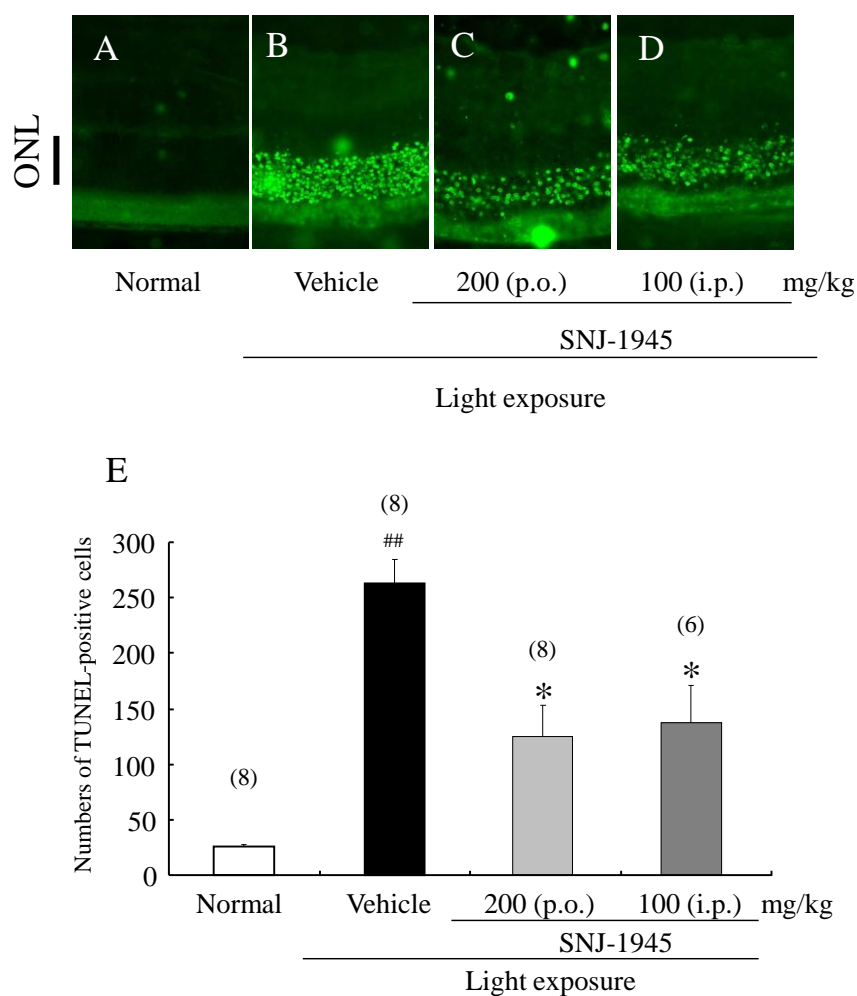
**Fig. 15** Effects of SNJ-1945 on retinal damage induced by exposure to light in mice.

A–E, nontreated (A), light exposure (8000 lux) plus vehicle-treated (B), and light exposure plus treatment with 100 mg/kg p.o. SNJ-1945 (C), 200 mg/kg p.o. SNJ-1945 (D), and 100 mg/kg i.p. SNJ-1945 (E) retinal cross-sections at 5 days after light exposure in mice. Scale bar, 25 µm. F, measurement of thickness in the ONL 5 days after light exposure. Data are shown as means ± S.E.M.,  $n = 6$  or  $8$ . \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$  versus light exposure plus the vehicle-treated group.

#### 3-4 光誘発網膜アポトーシスに対する SNJ-1945 の作用

光照射による視細胞変性に SNJ-1945 の投与が有効であることが示唆されたため、光照射による視細胞のアポトーシスに対する SNJ-1945 の作用を検討した。その結果、正常網膜群と比較して、光照射を行った溶媒投与群で外顆粒層 (ONL) に有意な TUNEL 陽性細胞数の増加を確認した (Fig. 16A, B, E)。さらに、溶媒投与群と比較して SNJ-1945 の経口投与 (200 mg/kg) 群及び腹腔内投与 (100 mg/kg) 群では光照射による ONL の TUNEL 陽性細胞数の増加を抑制した (Fig 16B-E)。以上の結果から、光照射によるアポトーシスにはカルパインの活性化が関与しており、SNJ-1945 はカルパイン誘導性のアポトーシス抑制作用を示すことが示唆された。

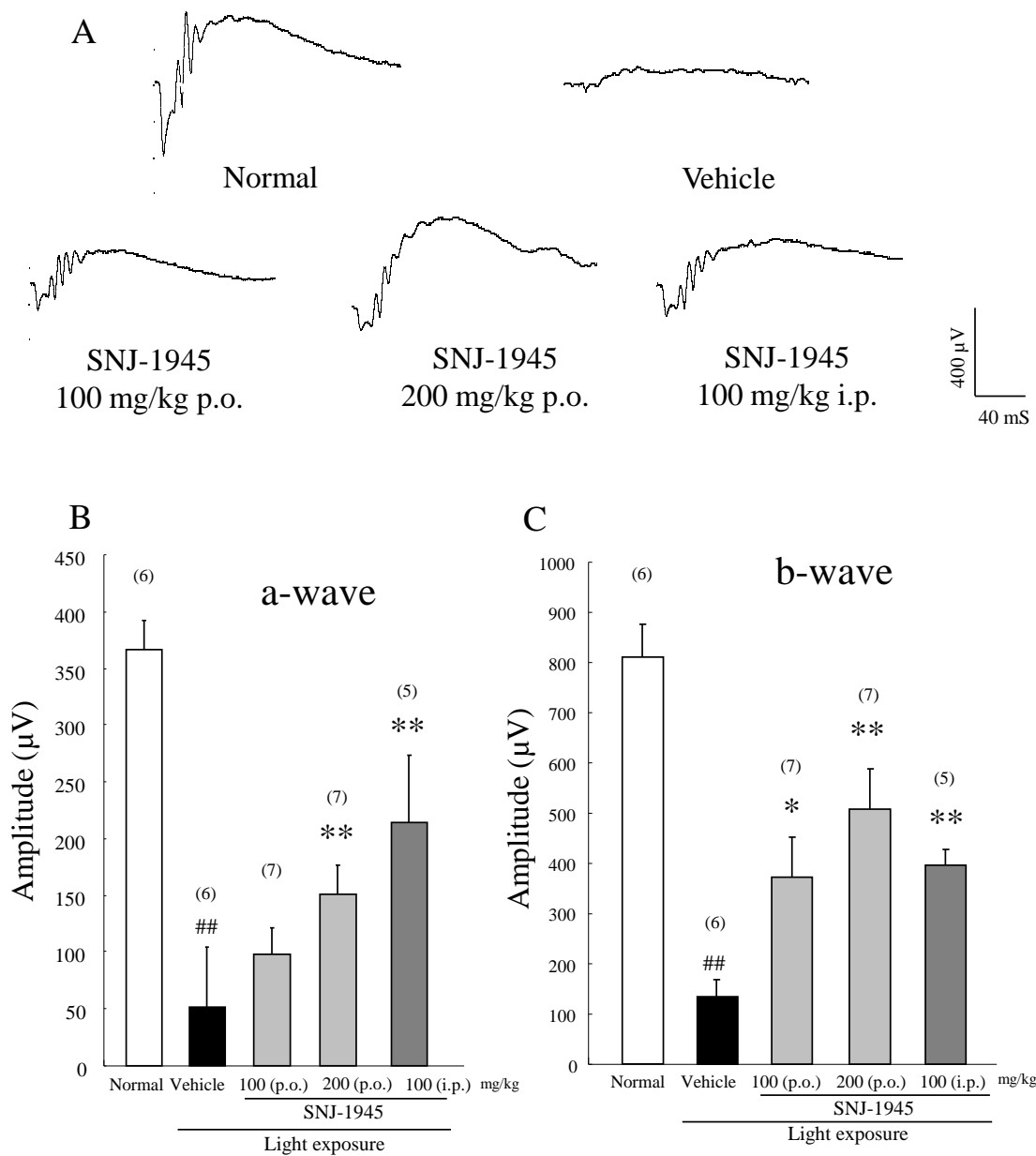




**Fig. 16 Effects of SNJ-1945 on expression of TUNEL-positive cells at 48 h after light exposure.** A–D, representative photographs of TUNEL staining showing nontreated normal retina (A), light exposure (8000 lux) plus vehicle-treated (B), light exposure plus SNJ-1945 at 200 mg/kg p.o. (C), and light exposure plus SNJ-1945 at 100 mg/kg i.p. (D). Scale bar, 25  $\mu$ m. E, quantitative analysis of intensity of TUNEL-positive cells in outer uclear layer at 48 h after light exposure. Data are shown as means  $\pm$  S.E.M.,  $n = 7$  or 8. The number in parentheses above each column represents the number of animals. \*,  $p < 0.05$  versus light exposure plus vehicle-treated group; ##,  $p < 0.01$  versus nontreated group (Normal).

### 3-5 光誘発網膜機能低下に対する SNJ-1945 の作用

SNJ-1945 の投与によって光照射による視細胞変性抑制作用を示したが、その保護作用によって網膜機能も同様に保たれているかを検討した。その結果、正常網膜群と比較して、光照射を行った溶媒投与群では a 波及び b 波の振幅が有意に低下した (Fig. 17A-C)。この溶媒投与群と比較して、SNJ-1945 の経口投与群 (100 mg/kg 及び 200 mg/kg) は、a 波及び b 波の振幅低下を用量依存的に抑制した (Fig. 17A-C)。さらに SNJ-1945 の腹腔内投与群 (100 mg/kg) に関しても a 波及び b 波の振幅低下を有意に抑制した (Fig. 17A-C)。以上の結果から、SNJ-1945 の投与によって光誘発視細胞変性から保護された視細胞は、その細胞機能も維持されていることが示唆された。

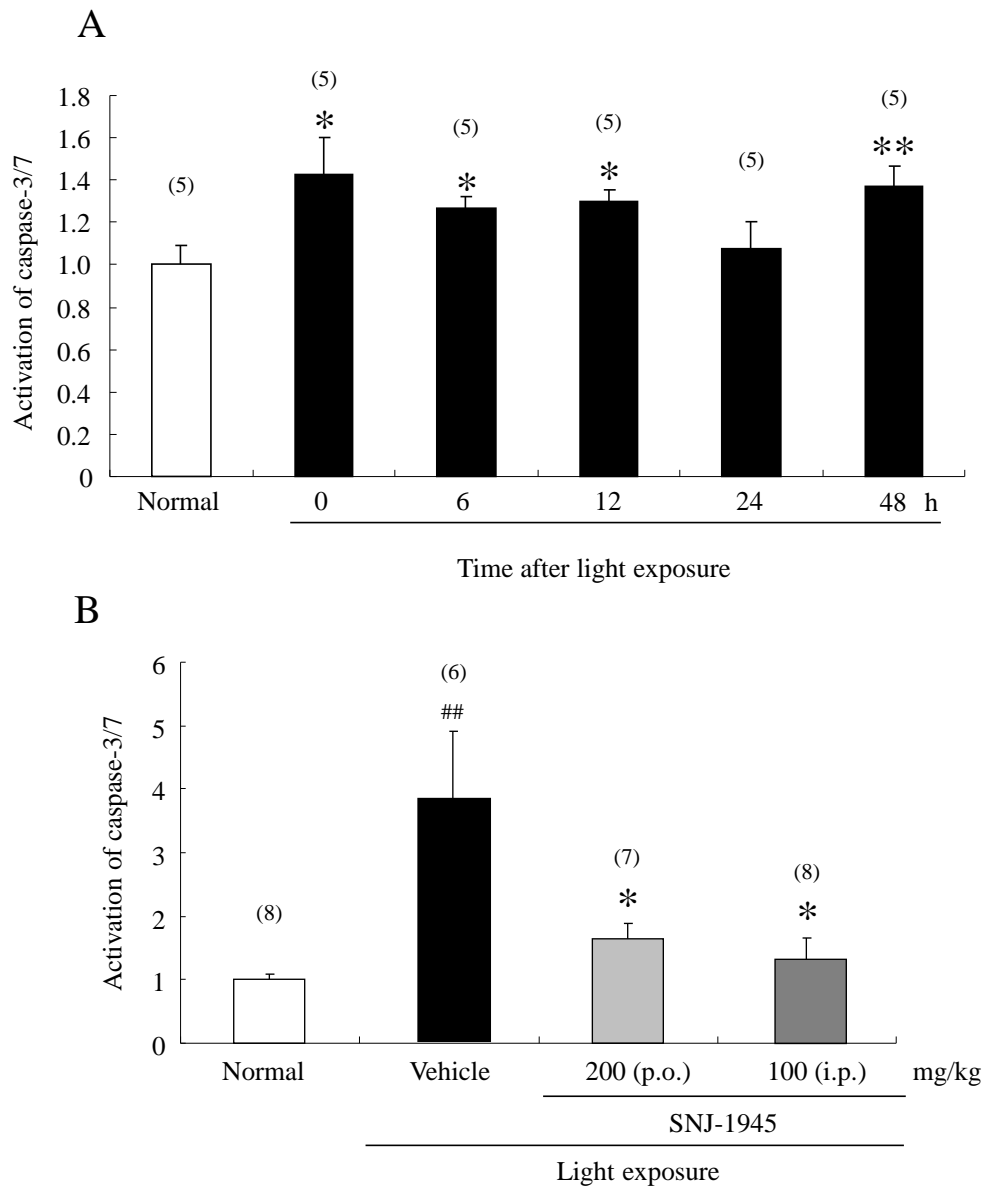


**Fig. 17 Effects of SNJ-1945 on changes in the dark-adapted ERG amplitudes after exposure to light in the mouse retina.**

A, typical traces of dark-adapted ERG responses measured 5 days after exposure to light. Stimulus flashes were used at 0.98 log cd/m<sup>2</sup>. B and C, amplitudes of a- and b-waves of group treated with light exposure (8000 lux) plus vehicle versus group treated with light exposure plus SNJ-1945 at 200 mg/kg p.o. and 100 mg/kg i.p. Data are shown as means ± S.E.M.,  $n = 6$  or 8. The number in parentheses above each column represents the number of animals. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$  versus light exposure plus vehicle treated group.

### 3-6 光誘発カスパーゼ 3/7 活性化に対する SNJ-1945 の作用

光照射によるカルパインが活性化されたことによって誘導されたアポトーシスが視細胞変性を起こし、SNJ-1945 の投与によってこれを抑制することを示した。SNJ-1945 の機序の一部を調べるためにカルパイン活性化と関連するカスパーゼ 3/7 活性に対する作用について検討した。まず、光照射によってカスパーゼ 3/7 活性がどのように変化するかを検討した。その結果、正常網膜群と比較して、光照射を行うことで光照射直後から 12 時間後までカスパーゼ 3/7 活性が有意に上昇した。さらに光照射 24 時間後にはカスパーゼ 3/7 活性は一度低下するが、48 時間後には再び有意に上昇した (Fig. 18A)。以上の結果から、光照射によってカスパーゼ 3/7 活性が上昇することが明らかとなった。そこで、光照射 48 時間後におけるカスパーゼ 3/7 活性に対する SNJ-1945 の作用を検討した。その結果、正常網膜群と比較して光照射 48 時間後の溶媒投与群では有意にカスパーゼ 3/7 活性が上昇した。この溶媒投与群のカスパーゼ 3 活性上昇と比較して、SNJ-1945 の経口投与 (200 mg/kg) 群及び腹腔内投与 (100 mg/kg) 群では有意にカスパーゼ 3/7 活性上昇を抑制した (Fig. 18B)。以上の結果から、SNJ-1945 は光照射によって上昇するカスパーゼ 3/7 活性を抑制して、視細胞変性から網膜を保護することが示唆された。



**Fig. 18 Effects of SNJ-1945 on light-induced expression of caspase-3/7 in the mouse retina.**

A, quantitative analysis of the fluorescent intensity of caspase-3/7 activation. Data are shown as mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 5$  or  $6$ ). The number in parentheses above each column represents the number of animals. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$  versus nontreated group (Normal). B, quantitative analysis of the effect of SNJ-1945 against activation of caspase-3/7 at 48 h after light exposure. SNJ-1945 (at 200 mg/kg p.o. and 100 mg/kg i.p.) or an identical volume (10 ml/kg) of vehicle (0.5% sodium carboxymethyl cellulose) was administered at 30 min before and just after light exposure. Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 5$  or  $6$ ). The number in parentheses above each column represents the number of animals. ##,  $p < 0.01$  versus nontreated group (Normal); \*,  $p < 0.05$  versus vehicle.

#### 第4節 考察

本章では、光誘発マウス網膜障害とカルパインとの関連並びに新規カルパイン阻害薬である SNJ-1945 の光誘発網膜障害に対する保護作用を検討し、カルパインが新規治療薬のターゲットとなりうる可能性について検討した。白色ラットに 3,400 ルクス of 可視光を 24 時間照射することによって網膜にアポトーシスが誘導される (Abler et al., 1996)。この光誘発網膜細胞死を誘導する原因の一つとして、細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇とカルパインの活性化が考えられる。カルシウム拮抗薬 Flunarizine は、光照射による視細胞萎縮を抑制することが報告されていることから、光照射によって細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$  流入によってカルパインが活性化され細胞死を引き起こす原因となる可能性がある (Edward et al., 1991)。さらに、遺伝性の網膜視細胞変性マウスである retinal degeneration 1 (rd1) mouse や *N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU) 投与による視細胞変性においても、視細胞におけるカルパインの活性化が明らかにされている (Paquet-Durand et al., 2006 ; Oka et al., 2007)。SNJ-1945 は半減期が 4.3 時間で、カルパイン 1 及びカルパイン 2 の 50% 阻害濃度 ( $\text{IC}_{50}$ ) は、それぞれ 0.062 及び 0.045  $\mu\text{M}$  でありカルパイン阻害作用が強い化合物である (Shirasaki et al., 2006)。また、SNJ-1945 は経口投与及び腹腔内投与で網膜まで到達し、網膜神経節細胞を保護することが知られている (Shimazawa et al., 2010)。

本研究において、光照射によってマウス網膜の  $\alpha$ -Spectrin の断片化が確認された。カルパインの基質である  $\alpha$ -Spectrin は細胞骨格タンパク質で、細胞が障害を受けるとカルパインによる不可逆的な切断を受け、細胞骨格が破壊される。 $\alpha$ -Spectrin はカルパインによる切断を受けると分子量 145 kDa の断片が生成することから、光照射によるカルパインの活性化が確認された。網膜中で  $\alpha$ -Spectrin は、網膜内層及び外層に局在することが知られており (Isayama et al., 1991)、光

誘発網膜障害モデルでは視細胞の存在する網膜外層が障害される。すなわち、このカルパインの活性化による $\alpha$ -Spectrinの断片化は、網膜視細胞に生じていると考えられる。さらに、SNJ-1945投与によって $\alpha$ -Spectrinの断片化が抑制されたことから、SNJ-1945は光照射によって視細胞に生じるカルパインの活性化を抑制したと考えられた。また、SNJ-1945は全身投与によって網膜まで到達することが示唆された。さらに光照射後の網膜におけるカルパインの活性化の指標としてp35タンパク質に着目した。神経細胞が障害を受けると細胞内へ流入した $Ca^{2+}$ によってカルパインが活性化されp35を限定分解しp25を生じる。Cdk5は、このp25と複合体を形成することで異常活性化し細胞死を引き起こす (O'Hare et al., 2005)。さらに網膜中ではp35のp25への分解と視細胞死との関連が報告されている (Oka et al., 2006; Oka et al., 2007; Shimazawa et al., 2010)。本研究において、光照射48時間後のマウス網膜においてp35の分解が確認され、SNJ-1945の投与によってp35の分解が抑制された。このことから、光照射によって網膜視細胞においてカルパインが活性化されており、SNJ-1945は網膜視細胞におけるカルパイン活性化を抑制することが確認された。光照射によって $\alpha$ -Spectrin及びp35分解は光照射直後から緩やかに進行し、その後急激に増加した。このカルパインの活性化は内在性のカルパイン阻害物質であるカルパスタチンがカルパイン1及びカルパイン2によって活性化されることと関係していると考えられた (Perche et al., 2009)。視細胞変性においてカルパイン1及びカルパイン2の活性化されるタイミングが異なり、初めにカルパイン1の活性化が起こり、その後カルパイン2が活性化されることが報告されている (Oka et al., 2007)。つまり、光照射によって初めにカルパイン1が活性化され、それに伴ってカルパスタチンが活性化されることによってカルパインの活性化を阻害した結果、光照射直後は $\alpha$ -Spectrin及びp35分解は緩やかに進行したと考えられた。しかし、カルパイ

ン1の活性化に続いてカルパイン2の活性化が起こることによって、カルパスタチンを上回るカルパインの活性化が生じたことで $\alpha$ -Spectrin及びp35分解は急激に進行したと考えられた。以上の結果から、光照射による視細胞萎縮にカルパインが関連していることが示唆された。

次に、SNJ-1945の投与によって $\alpha$ -Spectrinの断片化及びp35分解を抑制したことから、光照射による視細胞萎縮に対してSNJ-1945は視細胞保護作用を有することが示唆されたため、組織学的解析を行った。光照射によって外顆粒層(ONL)の萎縮が認められたが、SNJ-1945の経口投与(200 mg/kg)または腹腔内投与(100 mg/kg)によってONLの萎縮が抑制されたことから、光照射によってカルパインが活性化され視細胞萎縮が引き起こされることが明らかになった。また、SNJ-1945の投与によって保護された網膜視細胞の機能に関してERGを測定し電気生理学的検討を行った。その結果、光照射による視細胞機能の指標であるa波、ミュラー細胞及び双極細胞機能の指標であるb波の振幅の低下に対して、SNJ-1945の投与はa波及びb波振幅の低下を抑制した。以上のことから、光照射によるカルパインの活性化を阻害することによって視機能の低下が抑制されることが示唆された。

ヒト及び動物における網膜疾患ではアポトーシスが生じることによって細胞死に至る(Nickells and Zack, 1996; Reme et al., 2000)。光誘発網膜障害においてもアポトーシスによって視細胞が細胞死を起こすことが知られており(Wenzel et al., 2005)、第1章における検討でも確認されている。本検討において光照射によってTUNEL陽性細胞数の増加が認められONLにアポトーシスが誘導されたが、SNJ-1945投与によってTUNEL陽性細胞数の増加を抑制したことからカルパイン活性化によるアポトーシスを抑制したと考えられた。細胞が障害を受けると、小胞体からの $\text{Ca}^{2+}$ 放出によるミトコンドリアへの $\text{Ca}^{2+}$ 流入や細胞外からの



Ca<sup>2+</sup>流入が起こる。このCa<sup>2+</sup>濃度の上昇により細胞内のカルパインが活性化され、カルパインによってBidが切断される(Gil-Parrado et al., 2002)。この切断されたBidがミトコンドリアに移行し、シトクロームCが放出されることによってカスパーゼ3/7が活性化されたと考えられる。さらに、カルパインはMAPKsによって活性化されることも示唆されている (Glading et al., 2000, 2001, 2004)。また、光照射によってMAPKsが活性化されることを第1章で確認したが、このことは光照射による視細胞保護の標的としてカルパインが有用であることを示唆している。アポトーシスにおいて活性化されるシステインプロテアーゼであるカスパーゼは、アポトーシスのシグナル伝達やアポトーシスの実行に関して重要な役割を果たす。中でも、カスパーゼ3/7はアポトーシスにおいて特徴的な細胞核の断片化やDNAの分解に関与している。光照射による視細胞変性、網膜機能の低下及びカスパーゼ3の活性化をカスパーゼ3/7阻害薬が抑制することが報告されている (Perche et al., 2007)。この報告から、カスパーゼ7も光照射による視細胞変性に関与している可能性はあるが、どの程度の関与があるかは明らかにされていない。一方、カルパイン1の活性化によってカスパーゼ7が活性化されアポトーシスが誘導される (Gafni et al., 2009)。これらのことから視細胞変性にはカスパーゼ3/7の活性化が重要な役割を担っていることが示唆された。以上のことから、視細胞変性モデルにおいては活性化されたカルパインによってカスパーゼ3/7が活性化され、このカスパーゼ3/7によって内在性のカルパイン阻害物質カルパスタチンが分解されカルパインの活性がさらに増加することによってアポトーシスを増強すると考えられた (Pörn-Ares et al., 1998; Wang et al., 1998)。

そこで光誘発網膜障害とカスパーゼ3/7との関係を確認したところ、光照射直後からマウス網膜中でカスパーゼ3/7活性が上昇し48時間後においてもカスパー

ゼ3/7の活性化が認められた。また、光照射48時間後にカスパーゼ3の活性化が認められることが報告されており、本研究の結果と一致する (Costa et al., 2008)。SNJ-1945の投与によって光照射によるカスパーゼ3/7の活性化を抑制したことから、光照射によってカルパインが活性化しカスパーゼ3/7の活性化を伴って細胞死を誘導することが示唆された。SNJ-1945は、カルパイン阻害薬であるSJA-6017を基に合成されている。SJA-6017は、カルシウム非依存性のカテプシンB及びLを阻害するが、システインプロテアーゼ (Interleukin 1beta-converting enzyme)、セリンプロテアーゼ (Trypsin、Chymotrypsin、Thrombin、Factor VIIa、Factor Xa)、プロテオソームを阻害しないことが知られている (Inoue et al., 2003)。また、SNJ-1945は、 $\mu$ -カルパインの活性化部位と結合する (Azuma M, 2008)。SNJ-1945も恐らくSJA-6017と同様の性質を有し、カルパインを阻害した結果カスパーゼ3/7の活性化を抑制したと考えられる。

本章では、光誘発網膜変性に対するカルパインの関与と新規カルパイン阻害薬 SNJ-1945 が保護作用を有することを明らかにした。これらの結果は、カルパインは萎縮型加齢黄斑変性の治療標的となり、SNJ-1945 は治療薬の候補化合物となり得ることが示唆された。

### 第3章 網膜血管透過性に対するトリアムシノロンアセトニドの作用

#### 第1節 諸言

糖尿病黄斑浮腫は糖尿病網膜症における主な失明原因であると考えられている。糖尿病による全身の高血糖状態が続くことによって局所における慢性炎症を伴い、VEGF、Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、インターロイキン (Interleukin) や Intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) が血清中や眼内で検出されている (Funatsu et al., 2009; Gustavsson et al., 2013)。こうした炎症性のメディエーターが網膜血管に障害を与え、網膜血管の透過性を亢進させることで糖尿病網膜症の発症するリスクが高まる。さらに糖尿病網膜症に伴って生じる BRB の破綻や網膜血管の閉塞が糖尿病黄斑浮腫の発症とも関連している。BRB は全身循環と網膜間の物質移動、脈絡膜及び強膜と網膜間の物質移動を制御している。BRB には毛細血管内皮細胞を主体とする内側 BRB (inner BRB) と網膜色素上皮細胞を主体とする外側 BRB (outer BRB) から構成される。網膜毛細血管のペリサイトや血管内皮細胞の脱落によって inner BRB が破綻し網膜血管透過性が亢進する。また、糖尿病を惹起させたラット網膜では網膜色素上皮細胞で構成されるタイトジャンクションが破綻し、網膜の透過性が亢進する (Xu and Le, 2011)。BRB が破綻すると血漿タンパク質が網膜毛細血管から組織中へ漏出し、組織内の浸透圧が高まり浮腫を生じる。この浮腫が黄斑部で生じることによって糖尿病黄斑浮腫となり急激な視力低下の原因となる。

糖尿病黄斑浮腫の治療には、副腎皮質ステロイド薬のトリアムシノロンアセトニド (Triamcinolone acetonide: TA、マキュエイド<sup>®</sup>: わかもと製薬株式会社) の硝子体内投与またはテノン囊下投与やアイリーア<sup>®</sup>、ルセンティス<sup>®</sup>などの抗 VEGF 薬の硝子体内投与が用いられている。

VEGF は血管内皮細胞の VEGF 受容体と結合し、Src キナーゼ、ERK、JNK 及

び Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT などのタンパク質をリン酸化し、ZO-1 や Occludin をリン酸化することによってタイトジャンクションを破壊する (Pedram et al., 2002)。糖尿病黄斑浮腫患者では眼内の VEGF 濃度が上昇していることが報告されており、抗 VEGF 薬の眼内投与によって眼内で上昇した VEGF が中和され、黄斑浮腫が軽減される。さらに糖尿病黄斑浮腫の重症度と眼内 VEGF 濃度との相関もあるため、抗 VEGF 薬による治療は理に適っている。しかし、糖尿病黄斑浮腫の病態の中には抗 VEGF 薬が効果を示さないが TA によって浮腫が軽減されるような病態も存在し、TA が VEGF の発現上昇を抑制するとともに、抗炎症作用によって網膜血管透過性の亢進を防いでいると考えられる。TA のようなグルココルチコイドは糖尿病ラット網膜中の VEGF、TNF- $\alpha$  及び ICAM-1 の発現上昇を抑制し、白血球の集積や血管透過性亢進を抑制する。その結果 TA の抗炎症作用によって黄斑浮腫が軽減すると考えられている (Tamura et al., 2005 ; Kim et al., 2007)。また、TA は VEGF の産生を抑制して BRB の破綻を防ぐことが報告されているが、タイトジャンクションに対する作用に関しては不明な点も多い (Zhang et al., 2008)。

本研究ではヒト網膜血管内皮細胞を用いて網膜血管透過性に焦点をあてた研究を行い、TA と抗 VEGF 薬の作用を比較するとともに、TA の薬理作用の一つとしてタイトジャンクションに対する作用を検討した。

## 第2節 実験材料及び方法

### 2-1 実験材料

本試験に用いた薬物及び試薬は下記のとおりである。

Recombinant human VEGF<sub>165</sub> (VEGF<sub>165</sub>)、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、human VEGF monoclonal antibody は R&D systems (Minneapolis, MN, USA)、Fluorescein

isothiocyanate-dextran (molecular weight ;70 kDa)、Dexamethasone は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)、17-AAG は和光純薬工業株式会社 (Osaka, Japan)、ZO-1 antibody、occluding antibody 及び claudin-5 antibody は Invitrogen (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)、Fluorescein horse anti-mouse IgG antibody は Vector (Burlingame, CA, USA) よりそれぞれ購入した。また TA は、わかもと製薬株式会社 (Kanagawa, Japan) より入手した。

## 2-2 実験方法

### 2-2-1 細胞培養

ヒト網膜微小血管内皮細胞 (Human retinal microvascular endothelial cells ; HRMECs) は、DS ファーマバイオメディカル株式会社 (Osaka, Japan) から購入した細胞を使用した。培養には CS-C medium と culture boost を Cell Systems (Kirkland, WA, USA) より購入し、これらを混合した培地を用いた。細胞培養は 37°C、CO<sub>2</sub> 濃度 5% の条件で行った。

### 2-2-2 ヒト網膜微小血管内皮細胞 (HRMECs) 透過性試験

網膜血管透過性は Transwell-Clear (pore size of 0.4 μm; Corning Incorporated, Corning, NY, USA) を用いて評価した。HRMECs は 1 ウェル当り細胞数  $5 \times 10^4$  cells をフィブロネクチンをコーティングした Transwell のトップチャンバーに播種し、コンフルエントに達するまで 72 時間培養した。その後、トップチャンバーとボトムチャンバーの培地を VEGF, TNF- $\alpha$ , and IL- $\beta$ 、Triamcinolone acetone (1 μM)、anti-VEGF antibody (10 μM)、17-AAG (0.1 μM) を含有した CS-C medium に交換して 24 時間から 72 時間培養した。培養後、トップチャンバーの培地を分子量 70 kDa の Fluorescein isothiocyanate dextran (FD) に交換して遮光下で 2 時間培

養した。培養後、ボトムチャンバーの培地を採取しマイクロプレートリーダー (TECAN, Männedorf, Switzerland) で励起波長 490 nm、放出波長 520 nm で蛍光強度を測定した。測定した蛍光強度から検量線を作成し、ボトムチャンバー中の FD 濃度を算出した。

### 2-2-3 免疫細胞染色

HRMECs はフィブロネクチンをコートしたスライドに、1 ウェルあたり  $2 \times 10^4$  cells 播種し、コンフルエントになるまで 37°C で 72 時間培養した。培養後、20 ng/ml の VEGF<sub>165</sub>、50 ng/mL の TNF- $\alpha$ 、10 ng/mL の IL-1 $\beta$ 、1  $\mu$ M のトリアムシロンアセトニドを含有した培地に交換して 24 時間培養した。細胞は 4% の paraformaldehyde (WAKO) で 10 分間固定した。その後 PBS (Invitrogen<sup>TM</sup>, Thermo Fischer SCIENTIFIC) で洗浄し、0.2% Triton-X 100 (Sigma-Aldrich) 含有 PBS で 10 分間透過処理を行った。その後 PBS で洗浄し、3% Bovine serum albumin (Sigma-Aldrich) を用いて室温で 1 時間ブロッキングを行った。その後、anti ZO-1 mouse monoclonal antibody unconjugated (1:100) を添加して 4°C で 2 時間反応させた。PBS で洗浄後、Fluorescein horse anti-mouse IgG antibody (1:500) を用いて 4°C で 1 時間反応させた。PBS で洗浄後、VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI (Vector) を添加して核染色を行った。画像は蛍光顕微鏡 (Olympus, Tokyo, Japan) を用いて撮影した。

### 2-2-4 ウェスタンブロッティング

HRMECs は 1 ウェルあたり  $5 \times 10^5$  cells で 12 ウェルプレート (Corning) に播種し、72 時間培養した。細胞がコンフルエントに達した後、1  $\mu$ M のトリアムシロンアセトニドを処置して 37°C で 24 時間培養した。その後細胞は RIPA lysis

buffer (Thermo Fischer SCIENTIFIC) に Phosphatase inhibitor cocktail 及び Protease inhibitor を添加した細胞溶解液で回収した。細胞溶解液中のタンパク質濃度は BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。1 レーン当たり 10  $\mu$ g のタンパク質を 5-20% SDS gradient gel (Wako) にローディングし、電気泳動を行った。泳動後、ゲルは polyvinylidene fluoride membrane (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) に転写した。Membrane は 0.02% tween20 を含有した Tris-buffered saline (TBS-T) で調製した 5% Skim milk で 30 分間ブロッキング処理した。TBS-T で membrane を洗浄後、ZO-1 (1;250), Occludin (1;250), Claudin-5 (1;250) and  $\beta$ -actin (1;10,000) 抗体で反応させた。Membrane を TBS-T で洗浄後、Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (1:2,000-5,000; GE Healthcare, Tokyo, Japan) と室温で 1 時間反応させた。Membrane を洗浄後、化学発光基質である ImmunoStar LD (Thermo fisher science) と 5 分間反応させた。バンドの検出は Image Reader LAS-4000 (Bio-rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて行った。バンド強度は ImageJ を用いて算出した。

#### 2-2-5 統計学的解析

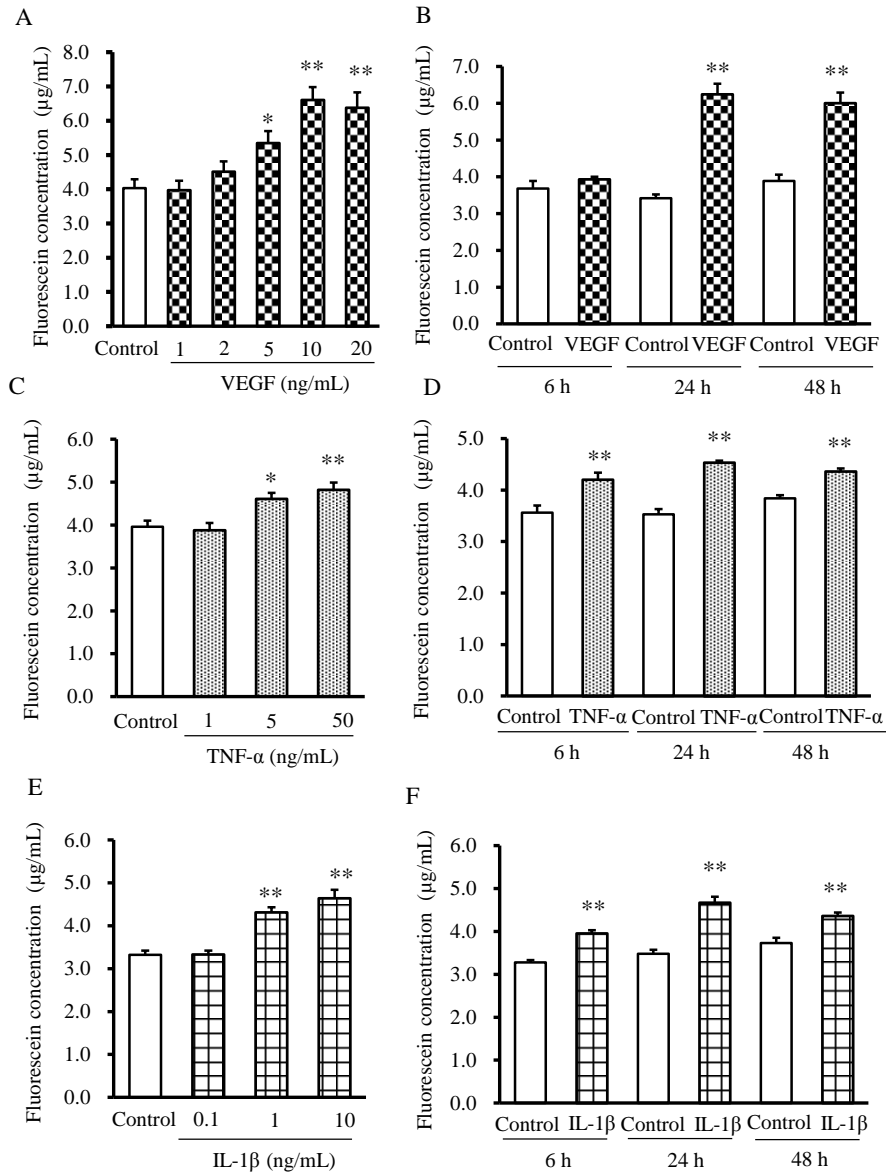
データは平均値  $\pm$  標準誤差で示した。統計解析は Student's *t*-test または Dunnett's multiple-comparison test を用いた。危険率が 5%未満である場合を統計学的に有意であると判断した。

### 第3節 実験成績

#### 3-1 VEGF, TNF- $\alpha$ 及び IL-1 $\beta$ によるヒト網膜微小血管内皮細胞 (HRMECs) 透過性亢進作用の検討

本試験では、炎症性サイトカインである VEGF, TNF- $\alpha$  及び IL-1 $\beta$  が網膜血管の透過性を亢進させるかについて検討するために、*in vitro* モデルを作製した。トランズウェルに HRMECs を播種し、VEGF<sub>165</sub>, TNF- $\alpha$  及び IL-1 $\beta$  を処置した際にトランズウェルを通過した蛍光色素の濃度を測定することにより透過性を評価した。その結果、対照群と比較して、VEGF 処置群は 1, 2, 5, 10 及び 20 ng/mL を 24 時間処置することで HRMECs の透過性を濃度依存的に亢進させ、5, 10 及び 20 ng/mL で有意であった (Fig. 19A)。さらに VEGF<sub>165</sub> (20 ng/mL) 添加 6 時間後では HRMECs の透過性に変化は認められなかったが、24 時間後には HRMECs の透過性は有意に亢進し、その作用は最大であった (Fig. 19B)。対照群と比較して、TNF- $\alpha$  処置群は 1, 5 及び 50 ng/mL を 24 時間処置することで HRMECs の透過性を濃度依存的に亢進させ、5 及び 50 ng/mL では有意であった (Fig. 16C)。また、TNF- $\alpha$  (50 ng/mL) 添加 6 時間後から有意な透過性の亢進が認められ、その作用は 24 時間で最大であった (Fig. 19D)。対照群と比較して、IL-1 $\beta$  (0.1, 1 及び 10 ng/mL) は、濃度依存的に HRMECs の透過性を亢進させ、1 及び 10 ng/mL で有意であった (Fig. 19E)。また、IL-1 $\beta$  (10 ng/mL) 添加 6 時間後から HRMECs の透過性は有意に亢進し、その作用は 24 時間後に最大であった (Fig. 19F)。以上の結果から、炎症性サイトカインである VEGF, TNF- $\alpha$  及び IL-1 $\beta$  は、いずれも HRMECs の透過性を亢進させることが示された。



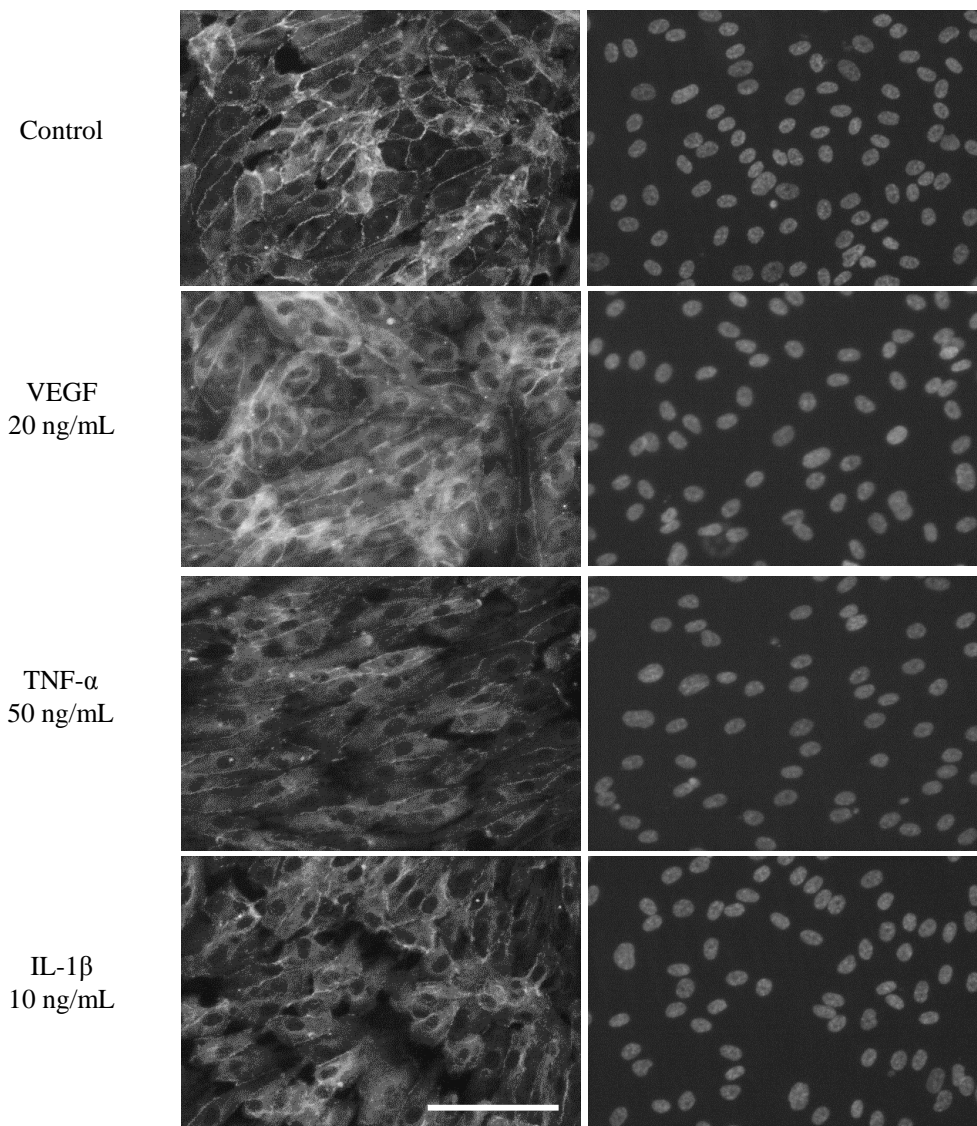


**Fig. 19 Elevation of permeability in human retinal microvascular endothelial cells by the treatments of VEGF, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ .**

To detect the cytokines which are increased to HRMECs permeability, fluorescein leakage was quantified at several cytokine concentrations and treatment times. (A) HRMECs were treated by 1, 2, 5, 10, and 20 ng/mL VEGF for 24 h. (B) HRMECs were treated by 20 ng/mL VEGF for 6, 24, and 48 h. (C) HRMECs were treated by 1, 5, and 50 ng/mL TNF- $\alpha$  for 24 h. (D) HRMECs were treated by 50 ng/mL TNF- $\alpha$  for 6, 24, and 48 h. (E) HRMECs were treated by 0.1, 1, and 10 ng/mL IL-1 $\beta$  for 24 h. (F) HRMECs were treated by 10 ng/mL IL-1 $\beta$  for 6, 24, and 48 h. Data are represented as means  $\pm$  SEM ; n = 12 wells. \*, \*\*: P<0.05, P<0.01 *versus* control with Dunnett's multiple comparison test.

### 3-2 VEGF, TNF- $\alpha$ 及び IL-1 $\beta$ による ZO-1 局在変化

3-1 の結果より、VEGF, TNF- $\alpha$  及び IL-1 $\beta$  は、HRMECs の透過性を亢進させることが示された。本試験では VEGF, TNF- $\alpha$  及び IL-1 $\beta$  の炎症性サイトカインがタイトジャンクションタンパク質である ZO-1 にどのような影響を及ぼすかについて検討した。その結果、対照群では HRMECs の細胞膜に ZO-1 の発現が認められた (Fig. 20)。しかし、最大限に透過性を亢進させる条件である VEGF (20 ng/mL)、TNF- $\alpha$  (50 ng/mL) 及び IL-1 $\beta$  (10 ng/mL) をそれぞれ 24 時間処置することで、対照群では細胞膜に局在していた ZO-1 の発現が消失した。細胞の核染色を行ったところ、対照群、VEGF 群、TNF- $\alpha$  群及び IL-1 $\beta$  群のいずれにおいても変化は認められなかったため、炎症性サイトカインによる ZO-1 の消失は細胞死に起因しないことが示された (Fig. 20)。

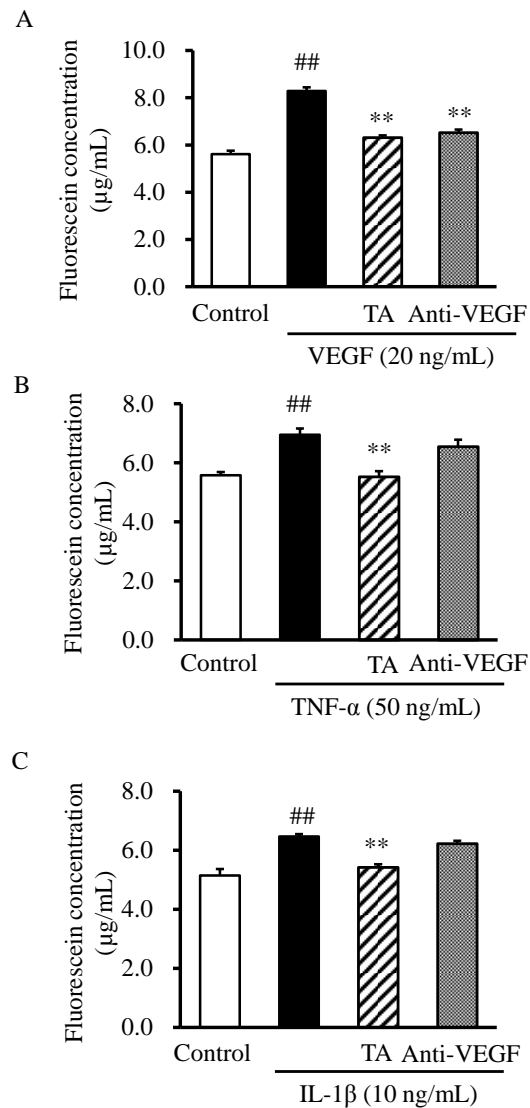


**Fig. 20 The localization of tight junction protein ZO-1 in HRMECs by the treatments of VEGF, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ .**

Images show the localization of ZO-1 protein. HRMECs were treated by 20 ng/mL VEGF, 50 ng/mL TNF- $\alpha$ , and 10 ng/mL IL-1 $\beta$  for 24 h. Then HRMECs were immunostained by ZO-1. The scale bar represents 100  $\mu$ m.

### 3-3 ヒト網膜微小血管内皮細胞 (HRMECs) 透過性亢進に対するトリアムシノロンアセトニドの作用

3-1 の結果より、炎症性サイトカインである VEGF<sub>165</sub>、TNF- $\alpha$  及び IL-1 $\beta$  を処置することによって HRMECs の透過性を亢進させることを明らかにした。本試験では、この透過性亢進に対して、糖尿病黄斑浮腫の治療薬として使用されている TA や抗 VEGF 抗体が効果を示すか検討した。その結果、対照群と比較して VEGF<sub>165</sub> (20 ng/mL) を処置することにより有意に HRMECs 透過性を亢進させた。この VEGF<sub>165</sub> による透過性亢進に対して、TA (1  $\mu$ M) または抗 VEGF 抗体 (10  $\mu$ M) は HRMECs 透過性亢進を有意に抑制した (Fig. 21A)。また、TNF- $\alpha$  (50 ng/mL) は、対照群と比較して有意な HRMECs 透過性の亢進が認められた。この TNF- $\alpha$  による HRMECs 透過性亢進に対して、TA (1  $\mu$ M) は HRMECs 透過性の亢進を有意に抑制した。しかし、抗 VEGF 抗体 (10  $\mu$ M) は、TNF- $\alpha$  による HRMECs 透過性亢進を抑制しなかった (Fig. 21B)。IL-1 $\beta$  (10 ng/mL) は、対照群と比較して有意な HRMECs 透過性の亢進が認められた。この IL-1 $\beta$  による HRMECs 透過性亢進に対して、TA (1  $\mu$ M) は HRMECs 透過性の亢進を有意に抑制したが、抗 VEGF 抗体 (10  $\mu$ M) は IL-1 $\beta$  による HRMECs 透過性亢進を抑制しなかった (Fig. 21C)。以上の結果から、TA は炎症による HRMECs 透過性亢進を抑制するが、抗 VEGF 抗体は VEGF による HRMECs 透過性亢進のみ効果を示すことが明らかになった。

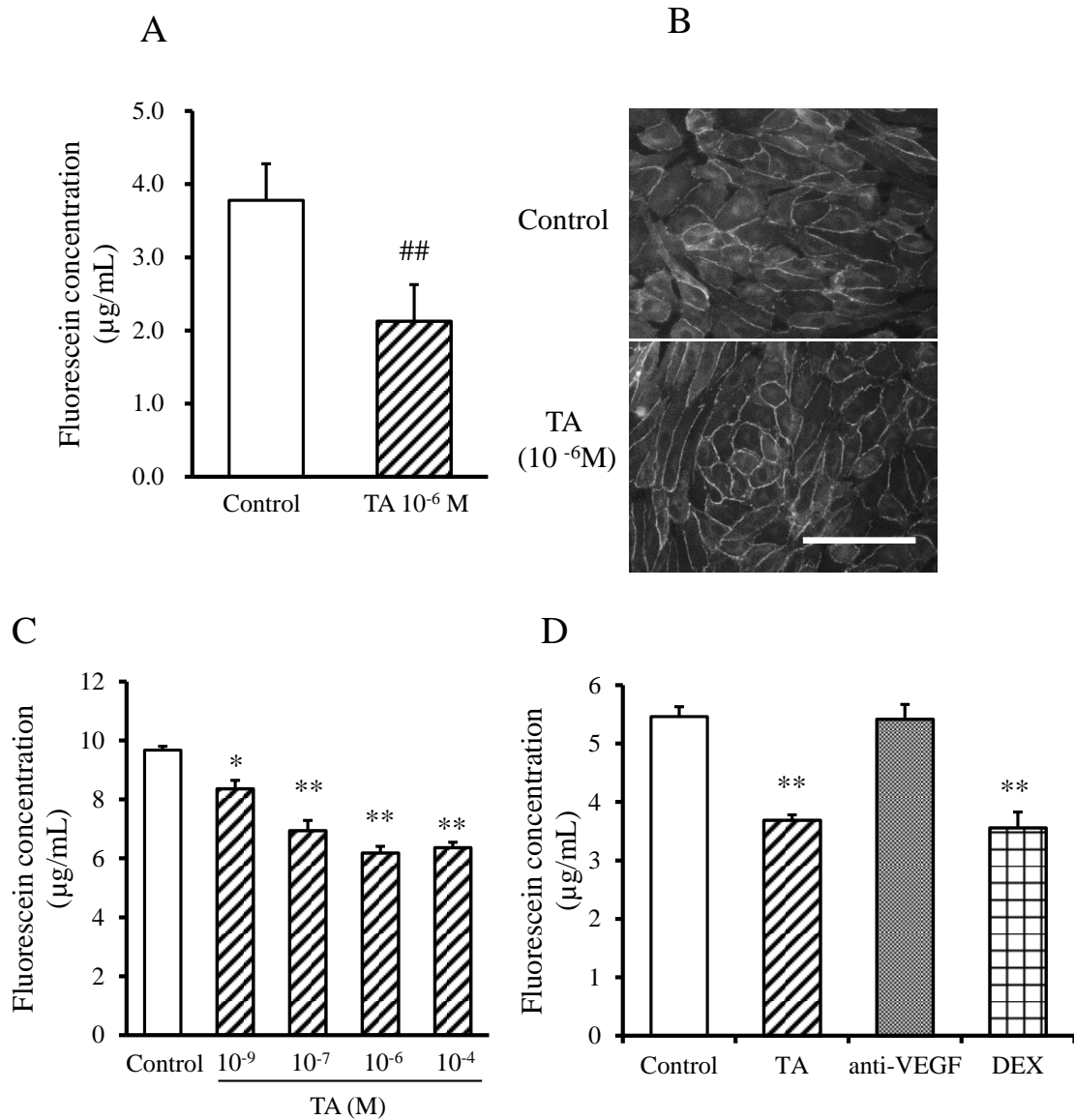


**Fig. 21 The effect of TA and anti-VEGF antibody against hyperpermeability by treatments of VEGF, TNF- $\alpha$ , and IL-1 $\beta$ .**

To compare with TA and anti-VEGF antibody, fluorescein leakage was quantified. (A) HRMECs were stimulated by 20 ng/mL VEGF for 24 h, and were simultaneously treated 1  $\mu$ M TA and 10  $\mu$ M anti-VEGF antibody. (B) HRMECs were stimulated by 50 ng/mL TNF- $\alpha$  for 24 h, and were simultaneously treated 1  $\mu$ M TA and 10  $\mu$ M anti-VEGF antibody. (C) HRMECs were stimulated by 10 ng/mL IL-1 $\beta$  for 24 h, and were simultaneously treated 1  $\mu$ M TA and 10  $\mu$ M anti-VEGF antibody. Data are represented as means  $\pm$  SEM ; n = 8 or 9 wells. <sup>##</sup>: P<0.01 *versus* control with Student *t* test. <sup>\*\*</sup>: P<0.01 *versus* VEGF, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  with Dunnett's multiple comparison test.

### 3-4 ヒト網膜微小血管内皮細胞 (HRMECs) バリア機能に対するトリアムシロンアセトニド (TA) 及び抗 VEGF 抗体の作用

3-3 の結果より、TA が炎症反応を抑制することによって HRMECs 透過性亢進を抑制することを示した。本試験では TA が直接タイトジャンクションに作用して透過性に影響を及ぼすかを検討した。TA (1  $\mu\text{M}$ ) は、対照群と比較して有意に HRMECs の透過性を低下させた (Fig. 22A)。さらにタイトジャンクションタンパク質である ZO-1 の局在を調べたところ、TA (1  $\mu\text{M}$ ) は対照群と比較して ZO-1 の細胞膜への局在が認められた (Fig. 22B)。TA の HRMECs 透過性を低下させる作用は、0.001 ~ 100  $\mu\text{M}$  の範囲で濃度依存的であった (Fig. 19C)。さらに、TA (1  $\mu\text{M}$ )、抗 VEGF 抗体 (10  $\mu\text{M}$ ) 及びデキサメタゾン (Dexamethasone; DEX, 1  $\mu\text{M}$ ) の HRMECs 透過性に対する作用を比較したところ、対照群と比較して TA 及び DEX は HRMECs 透過性を有意に低下させたが、抗 VEGF 抗体は HRMECs 透過性を低下させなかった (Fig. 22D)。以上の結果から、ステロイドはタイトジャンクションに作用して透過性に影響を及ぼすことが示唆された。



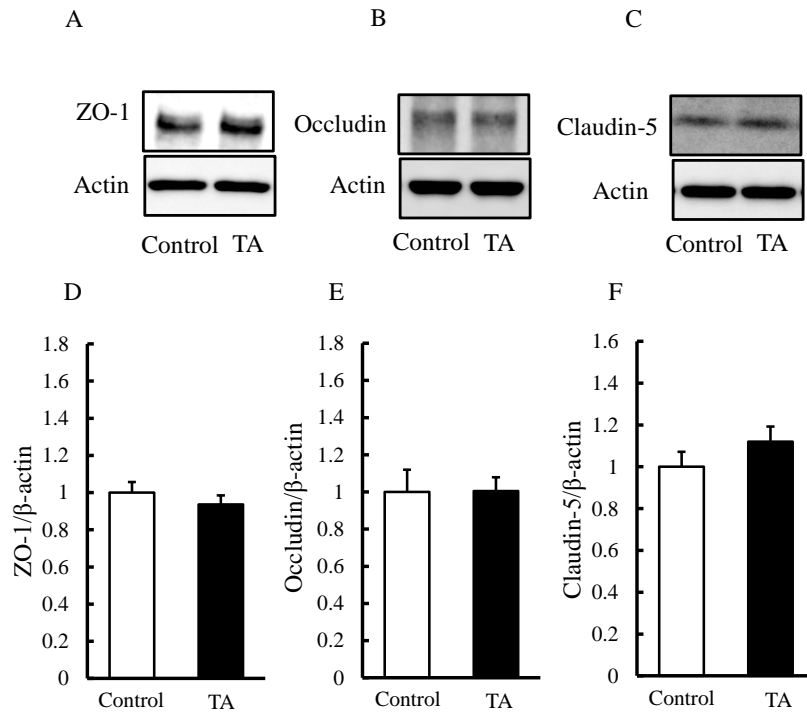
**Fig. 22 Enhancement of HRMECs barrier function by TA.**

To detect the effect of TA against HRMECs permeability, fluorescein leakage and ZO-1 protein localization were investigated. (A) HRMECs were treated with 1 µM TA for 24 h, and fluorescein leakage was quantified. (B) After 24 h treatment of 1 µM TA, ZO-1 localization in HRMECs were differentiated by immunofluorescence staining. (C) HRMECs were treated with 0.001, 0.01, 0.1, 1, 100 µM for 24 h, and fluorescein leakage was quantified. (D) HRMECs were treated by 1 µM TA, 10 µM anti-VEGF antibody, and 1 µM dexamethasone (DEX) for 24 h, and fluorescein leakage was quantified. The scale bar represents 100 µm. Data are represented as means ± SEM; n = 3 or 4 wells. <sup>##</sup>; P<0.01 *versus* control with Student's *t*-test. <sup>\*</sup>; P<0.05, <sup>\*\*</sup>; P<0.01 *versus* control with Dunnett's multiple comparison test.

### 3-5 タイトジャンクションタンパク質発現に対するトリアムシノロンアセトニドの作用

TA がタイトジャンクションタンパク質の一つである ZO-1 の局在を変化させることを示したが、本試験では ZO-1 を含めたタイトジャンクションタンパク質の発現に影響を及ぼしているかを検討した。TA (1  $\mu$ M) を 24 時間処置することによって、タイトジャンクションタンパク質である ZO-1、Occludin 及び Caludin-5 のタンパク質発現は、いずれも対照群と比較して明らかな変化は認められなかった (Fig. 23A-F)。TA はタイトジャンクションタンパク質の発現量を変化させず、局在を変化させて HRMECs の透過性に影響を及ぼすことが示唆された。



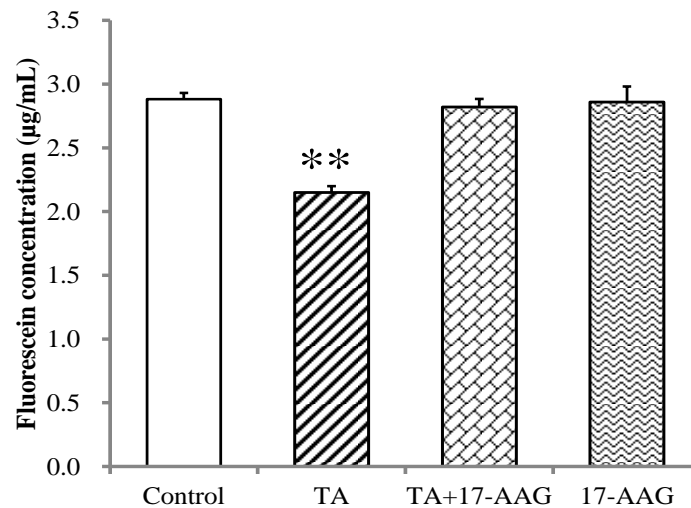


**Fig. 23 The expression level of tight junction proteins in HRMECs with treatment of TA.**

To detect the expression of tight junction proteins, ZO-1, Occludin, and Claudin-5 were quantified by western blotting. HRMECs were treated with 1  $\mu$ M TA for 24 h, and proteins were extracted by whole cell lysates. Representative images show (A) ZO-1, (B) Occludin, (C) Claudin-5, and  $\beta$ -actin as loading control. Each graphs show quantification of band intensity (D) ZO-1, (E) Occludin, (F) Claudin-5. Data are represented means  $\pm$  SEM ; n = 12 wells.

### 3-6 グルコルチコイド受容体を介したヒト網膜微小血管内皮細胞 (HREMCs) 透過性に対するトリアムシノロンアセトニドの作用

3-4 において、TA や DEX のグルコルチコイドが HRMECs 透過性に影響を及ぼすことを示したが、その作用がグルコルチコイド受容体を介したものであるか検討した。グルコルチコイド受容体の機能阻害には、グルコルチコイド受容体の核移行を阻害する 17-AAG を用いた。TA (1  $\mu$ M) を 24 時間処置することによって対照群と比較して有意に HRMECs の FD 透過量が減少した (Fig. 21)。しかし、TA 及びグルコルチコイド受容体のアンタゴニスト 17-AAG (0.1  $\mu$ M) の同時添加並びに 17-AAG (0.1  $\mu$ M) 単独添加は、HRMECs の FD 透過量に対して明らかな作用を示さなかった (Fig. 24)。以上の結果から、TA はグルコルチコイド受容体を介して HRMECs の FD 透過量を減少させることが示唆された。



**Fig. 24 The enhancement of barrier function by the treatment of TA in HRMECs via glucocorticoid receptor.**

To detect the increase of barrier function of TA via glucocorticoid receptor, fluorescein leakage was quantified by combination of TA and 17-AAG. HRMECs were treated by 1  $\mu$ M TA, 0.1  $\mu$ M 17-AAG, and combination of TA and 17-AAG for 24 h. Data are represented as means  $\pm$  SEM ; n = 6 wells. \*\*: P<0.01 versus control with Student's *t*-test.

#### 第4節 考察

本章では、網膜血管透過性亢進に対する TA 及び抗 VEGF 抗体の作用を比較し、さらに TA の作用機序を明らかにした。TA は糖尿病黄斑浮腫とも関連する炎症性サイトカインである VEGF, TNF- $\alpha$  及び IL-1 $\beta$  により亢進される網膜血管透過性の亢進をいずれのサイトカインについても抑制した。一方、抗 VEGF 抗体は VEGF によって亢進される網膜血管透過性のみ抑制した。さらにコンフルエントまで培養した HRMECs に対して TA を処置することによって、TA は HRMECs の透過性を低下させた。TA の HRMECs の透過性を低下させる作用は、TA が ZO-1, Occludin 及び Claudin-5 タンパク質の発現に変化を及ぼすことなく、ZO-1 の細胞膜への局在変化を促進した。また、TA の HRMECs 透過性低下作用は、グルココルチコイド受容体を介した作用であることが明らかになった。

これまで、高血糖状態によって産生される炎症性サイトカインと糖尿病黄斑浮腫の関連が報告されている (Doganay et al., 2002; Shin et al., 2014)。糖尿病網膜症や糖尿病黄斑浮腫では、VEGF の発現量が亢進することで白血球停滞による白血球の血管内付着や血管透過性亢進が生じることが知られている (Miyamoto et al., 2000 ; Funatsu et al., 2003)。この VEGF による血管透過性の亢進は、VEGF による Occludin 及び ZO-1 のリン酸化によって生じる (Antonetti et al., 1999; Harhaj et al., 2006)。糖尿病ラットの網膜で亢進する白血球凝集や血管透過性に対して、TNF- $\alpha$  拮抗薬である Etanercept が効果を示すことが報告されている (Jousen et al., 2002)。ヒトにおいても糖尿病網膜症患者の硝子体では TNF- $\alpha$  産生量が亢進していることから、糖尿病黄斑浮腫に対して TNF- $\alpha$  拮抗薬である Etanercept や Infliximab が治療効果を示す (Itoh M, Nagafuchi A, Moroi S, 2007; Mirshahi et al., 2012)。糖尿病ラットの網膜で IL-1 $\beta$  の発現が上昇することが報告されており、ヒトの糖尿病網膜症の硝子体中にも IL-1 $\beta$  の発現が確認されている (Liu et al.,

2012; Zhou et al., 2012)。TNF- $\alpha$  及び IL-1 $\beta$  によって亢進される血管透過性には、Nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) を介して ZO-1 の細胞膜への局在を阻害する (Ma, 2004; Al-Sadi and Ma, 2007; Kimura et al., 2009)。これらのことから、VEGF, TNF- $\alpha$  及び IL-1 $\beta$  は網膜血管透過性亢進の原因であり、糖尿病黄斑浮腫の発症に深く関連していると考えられる。

本章において、*in vitro* においても VEGF, TNF- $\alpha$  及び IL-1 $\beta$  は HRMECs の透過性亢進作用を示し、さらにその際に ZO-1 細胞膜への局在を変化させた。この VEGF, TNF- $\alpha$  及び IL-1 $\beta$  による透過性亢進に対して、TA はいずれも透過性亢進を抑制したが、抗 VEGF 抗体は VEGF による透過性亢進のみ抑制した。VEGF, TNF- $\alpha$  及び IL-1 $\beta$  は NF- $\kappa$ B を介して炎症を誘導し、タイトジャンクションを破壊させる (Kiriakidis et al., 2003; Clark et al., 2015)。また、グルココルチコイドは NF- $\kappa$ B を阻害して炎症を抑制することが知られている (Ray and Prefontaine, 1994; Scheinman et al., 1995; Barnes, 1998; Adcock and Caramori, 2001)。これらの結果から TA は VEGF, TNF- $\alpha$  及び IL-1 $\beta$  によって活性化された NF- $\kappa$ B を阻害して、TA は透過性亢進を抑制していると考えられる。

デキサメタゾンやヒドロコルチゾンなどのグルココルチコイドは、ラットやヒト脳血管内皮細胞においてその透過性を低下させること、さらにタイトジャンクションタンパク質を増加させることが知られている (Romero et al., 2003; Förster et al., 2008)。一方でヒト化抗 VEGF 抗体である Ranibizumab 及び Bevacizumab は透過性の指標の一つである網膜血管内皮細胞の電気抵抗やタイトジャンクションタンパク質の局在を変化させない (Deissler et al., 2012)。本研究の結果から、TA やデキサメタゾンは HRMECs の透過性を低下させること、抗 VEGF 抗体は透過性に影響を及ぼさないことを明らかにした。さらに、TA のこの透過性低下作用には ZO-1 の局在変化を伴うが、ZO-1、Occludin 及び

Caludin-5 のタンパク質発現量には変化を与えないことを明らかにした。このことから TA は、ZO-1 の局在を変化させて HRMECs の透過性を低下させている可能性が考えられた。ヒドロコルチゾン<sup>1</sup>は ZO-1 の局在を変化させてヒト脳血管内皮細胞のバリア機能を高めるが、この作用はグルココルチコイド受容体のアンタゴニストによって消失する (Furihata et al., 2015)。このことから、TA の HRMECs の透過性を低下させる作用に関してもグルココルチコイド受容体を介した作用であるかを検討するため、グルココルチコイド受容体アンタゴニスト 17-AAG と TA を併用したところ、TA による HRMECs の透過性低下作用は消失した。17-AAG は、Heat shock protein 90 (HSP90) の阻害剤であり、HSP90 の阻害剤は、グルココルチコイド受容体の核移行を阻害する (Prima et al., 2000)。TA の HRMECs のバリア機能を高める作用もグルココルチコイド受容体を介して発現しているものと考えられる。TA はグルココルチコイド受容体を介して ZO-1 を細胞膜へ局在変化させた結果、HRMECs の透過性に影響を及ぼした可能性が考えられた。さらに、ZO-1 は細胞骨格を形成するアクチンや細胞接着因子であるカドヘリンと結合することが報告されている (Itoh M, Nagafuchi A, Moroi S, 2007)。

以上のことから、TA はタイトジャンクションタンパク質の発現量を変化させなかったが、TA によって ZO-1 が細胞膜へと局在が変化した結果、ZO-1 とアクチンやカドヘリンなどとの結合が増加し、細胞同士の接着が強まったため、HRMECs の透過性が変化した可能性が考えられた。

本章では、HRMECs を用いてその透過性を指標として TA と抗 VEGF 抗体の比較及び TA の機序について検討した。TA は抗 VEGF 抗体と比較して、VEGF による HRMECs 透過性亢進作用だけでなく、TNF- $\alpha$  及び IL-1 $\beta$  による透過性亢進作用も抑制するとともに、HRMECs の ZO-1 局在を変化させるようなタイトジャンクションに直接作用して HRMECs のバリア機能を高めることが示された。

TAの作用機序としては、次の3つの可能性があると考えられる。一つ目は、NF- $\kappa$ Bの活性化を抑制して炎症性サイトカインの作用を発現させないこと。二つ目は既に産生されているサイトカインが NF- $\kappa$ B を介してタイトジャンクションを破壊させることを抑制すること。三つ目はタイトジャンクションに直接作用してその遺伝子発現もしくはリン酸化などに影響を与えてバリア機能を安定化させることである。あるいは、これら三つの機序が複合的に関連していることも考えられる。

TA 及び抗 VEGF 薬は、いずれも薬効は確かであるがあらゆる糖尿病黄斑浮腫を改善させるわけではなく、糖尿病黄斑浮腫の病態によって効果が異なる。Shimura らの報告によれば、光干渉断層計 (optical coherence tomography ; OCT) による糖尿病黄斑浮腫の形態分類で TA の浮腫抑制効果を検討した結果、スポンジ状浮腫や嚢胞様浮腫には有効性が高かったが、漿液性剥離に対する効果は低かった (Shimura et al., 2011)。抗 VEGF 薬 Bevacizumab に関しても前向き研究がおこなわれており、Bevacizumab が最も効果を示したのはスポンジ状浮腫であることが報告されている (Shimura et al., 2013)。このように糖尿病黄斑浮腫の形態によっても炎症の程度や VEGF の関与も異なることが予想されるため、現在の治療における第一選択は抗 VEGF 薬であるが病態に応じた治療薬の使い分けが必要である。

本章では、TA がサイトカインによる HRMECs の血管透過性亢進作用を抑制することを明らかにした。さらに TA はグルココルチド受容体を介して ZO-1 の局在を変化させ、HRMECs に直接作用を及ぼしてタイトジャンクションを強化することが示唆された。

## 総括及び結論

中途失明原因の上位を占め、高齢化に伴い今後増加が予想される疾患である加齢黄斑変性や糖尿病黄斑変性症には効果的な治療法が十分に確立されていない。そこで、新たな治療薬を開発するための治療標的の探索を目的として、萎縮型加齢黄斑変性モデルであるマウス網膜光障害モデルを用いた研究を行った。また治療薬の作用機序解明を目的として、ヒト網膜微小血管内皮細胞 (HRMECs) を用いて糖尿病黄斑浮腫治療薬であるトリアムシノロンアセトニド (TA) を用いた研究を行った。初めに、フリーラジカルスカベンジャーであるエダラボンを用いてマウス網膜光障害モデルにおける視細胞変性に対する酸化ストレスの関与を検討した。続いてカルパイン阻害薬 SNJ-1945 を用いて、マウス網膜光障害モデルにおける視細胞変性に対するカルパインの関与を検討した。最後に HRMECs を用いて TA の HRMECs 透過性に対する作用を検討した。

第 1 章では光誘発マウス網膜障害モデル及びエダラボンを用いて萎縮型加齢黄斑変性において、酸化ストレスが薬物治療の標的となり得るかを検討した。

- 1) エダラボンは、光照射によるマウス網膜視細胞のアポトーシス誘導を抑制し、網膜視細胞萎縮を抑制した。
- 2) エダラボンは、光照射によるマウス網膜視細胞への酸化ストレスの発生を抑制した。
- 3) エダラボンは、光照射によるマウス網膜機能の低下を抑制した。
- 4) エダラボンは、光照射による MAPK の活性化を抑制した。

第 2 章では光誘発マウス網膜障害モデル及びカルパイン阻害薬 SNJ-1945 を用いて萎縮型加齢黄斑変性において、カルパインが薬物治療の標的となり得るか

を検討した。

- 1) 光照射によってマウス網膜中にカルパインの活性化が認められ、SNJ-1945は光照射によるカルパインの活性化を抑制した。
- 2) SNJ-1945は、光照射によるマウス網膜視細胞のアポトーシス誘導を抑制し、網膜視細胞萎縮を抑制した。
- 3) SNJ-1945は、光照射によるマウス網膜機能の低下を抑制した。
- 4) SNJ-1945は、光照射によるカスパーゼ 3/7 の活性化を抑制した。

第3章では HRMECs を用いて、TA の作用機序の検討を行った。

- 1) TA は、VEGF、TNF- $\alpha$  及び IL-1 $\beta$  による HRMECs 透過性亢進作用を抑制した。
- 2) TA は、HRMECs 透過性を濃度依存的に低下させ、HRMECs 中の ZO-1 局在を変化させた。
- 3) TA は、ZO-1、Occludin 及び Claudin-5 のタンパク質発現を変化させなかった。
- 4) TA は、グルココルチコイド受容体を介して HRMECs 透過性を低下させた。

本研究の結果より、萎縮型加齢黄斑変性の病態に酸化ストレス及びカルパインが深く関わっており治療標的となり得ること、またエダラボン及び SNJ-1945 は新規治療薬候補となり得ることが示唆された。TA は糖尿病黄斑浮腫に対して、抗炎症作用によって炎症性サイトカインによる透過性亢進を抑制するだけでなく、網膜のタイトジャンクションの機能を高めて疾患による透過性亢進を抑制していることが示唆された。



## 謝 辞

本稿を終えるにあたり、本研究の機会を賜り、また終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました岐阜薬科大学学生体機能解析学大講座薬効解析学研究室教授の原英彰先生に深甚なる感謝の意を表します。

本研究に際し、終始御指導と御鞭撻を賜りました岐阜薬科大学学生体機能解析学大講座薬効解析学研究室准教授の鳴澤雅光先生に深謝致します。

本論文の審査にあたり、有益なる御助言を賜りました岐阜薬科大学生命薬学大講座生化学研究室教授 五十里 彰先生、医療薬剤学大講座臨床薬剤学研究室教授 足立 哲夫先生並びに医療薬剤学大講座薬物治療学研究室准教授 位田 雅俊先生に深謝致します。

本研究の遂行にあたり、実験材料の御提供、御助言並びに御協力を賜りました千寿製薬株式会社 玉田義之博士、わかもと製薬株式会社 相模研究所所長 内藤聡博士並びに薬物評価研究室諸氏に心から感謝の意を表します。

## 引用文献

- Abler, A.S., Chang, C.J., Ful, J., Tso, M.O., Lam, T.T., 1996. Photic injury triggers apoptosis of photoreceptor cells. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 92, 177–89.
- Adcock, I.M., Caramori, G., 2001. Cross-talk between pro-inflammatory transcription factors and glucocorticoids. *Immunol. Cell Biol.* 79, 376–384.
- Al-Sadi, R.M., Ma, T.Y., 2007. IL-1beta causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *J. Immunol.* 178, 4641–4649.
- Ambati, J., Fowler, B., 2012. Mechanisms of age-related macular degeneration. *Neuron* 75, 26–39.
- Antonetti, D.A., Barber, A.J., Hollinger, L.A., Wolpert, E.B., Gardner, T.W., 1999. Vascular Endothelial Growth Factor Induces Rapid Phosphorylation of Tight Junction Proteins Occludin and Zonula Occluden 1: A POTENTIAL MECHANISM FOR VASCULAR PERMEABILITY IN DIABETIC RETINOPATHY AND TUMORS. *J. Biol. Chem.* 274, 23463–23467.
- Artal-Sanz, M., Tavernarakis, N., 2005. Proteolytic mechanisms in necrotic cell death and neurodegeneration. *FEBS Lett.* 579, 3287–3296.
- Azuma M, S.T., 2008. The Role of Calcium Activated Protease Calpain in Experimental Retinal Pathology. *Surv. Ophthalmol.* 53, 150–163.
- Barnes, P.J., 1998. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin. Sci.* 572, 557–572.
- Beatty, S., Koh, H.-H., Phil, M., Henson, D., Boulton, M., 2000. The Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Age-Related Macular Degeneration. *Surv. Ophthalmol.* 45, 115–134.
- Beer, P.M., Bakri, S.J., Singh, R.J., Liu, W., Peters, G.B., Miller, M., 2003. Intraocular concentration and pharmacokinetics of triamcinolone acetonide after a single intravitreal injection. *Ophthalmology* 110, 681–686.

- Bowes Rickman, C., Farsiu, S., Toth, C.A., Klingeborn, M., 2013. Dry age-related macular degeneration: Mechanisms, therapeutic targets, and imaging. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 54, ORSF68-ORSF80.
- Campbell, J.P., Zhang, M., Hwang, T.S., Bailey, S.T., Wilson, D.J., Jia, Y., Huang, D., 2017. Detailed Vascular Anatomy of the Human Retina by Projection-Resolved Optical Coherence Tomography Angiography. *Sci. Rep.* 7, 1–11.
- Clark, P.R., Kim, R.K., Pober, J.S., Kluger, M.S., 2015. Tumor Necrosis Factor Disrupts Claudin-5 Endothelial Tight Junction Barriers in Two Distinct NF- $\kappa$ B-Dependent Phases. *PLoS One* 10, 1–21.
- Close, J.L., Liu, J., Gumuscu, B., Reh, T.A., 2006. Epidermal growth factor receptor expression regulates proliferation in the postnatal rat retina. *Glia* 54, 94–104.
- Costa, B.L. da S.A. da, Fawcett, R., Li, G.Y., Safa, R., Osborne, N.N., 2008. Orally administered epigallocatechin gallate attenuates light-induced photoreceptor damage. *Brain Res. Bull.* 76, 412–423.
- Cruickshanks, K.J., Klein, R., Klein, B.E., 1993. Sunlight and age-related macular degeneration. The Beaver Dam Eye Study. *Arch Ophthalmol* 111, 514–518.
- Curcio, C.A., Allen, K.A., 1990. Topography of ganglion cells in human retina. *J. Comp. Neurol.* 300, 5–25.
- Dacey, D.M., 1993. The mosaic of midget ganglion cells in the human retina. *J. Neurosci.* 13, 5334–5355.
- Deissler, H.L., Deissler, H., Lang, G.E., 2012. Actions of bevacizumab and ranibizumab on microvascular retinal endothelial cells: similarities and differences. *Br. J. Ophthalmol.* 96, 1023–1028.
- Demontis, G.C., Longoni, B., Marchiafava, P.L., 2002. Molecular steps involved in light-induced oxidative damage to retinal rods. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43, 2421–2427.

Doganay, S., Evereklioglu, C., Er, H., Türköz, Y., Sevinç, a, Mehmet, N., Savli, H., 2002. Comparison of serum NO, TNF-alpha, IL-1beta, sIL-2R, IL-6 and IL-8 levels with grades of retinopathy in patients with diabetes mellitus. *Eye (Lond)*. 16, 163–170.

Dong, A., Shen, J., Krause, M., Akiyama, H., Hackett, S.F., Lai, H., Campochiaro, P.A., 2006. Superoxide dismutase 1 protects retinal cells from oxidative damage. *J. Cell. Physiol.* 208, 516–526.

Edward, D.P., Lam, T.T., Shahinfar, S., Li, J., Tso, M.O., 1991. Amelioration of light-induced retinal degeneration by a calcium overload blocker. Flunarizine. *Arch. Ophthalmol.* 109, 554–562.

Eghøj, M.S., Sørensen, T.L., 2012. Tachyphylaxis during treatment of exudative age-related macular degeneration with ranibizumab. *Br. J. Ophthalmol.* 96, 21–23.

Evans, J.S., Turner, M.D., 2007. Emerging functions of the calpain superfamily of cysteine proteases in neuroendocrine secretory pathways. *J. Neurochem.* 103, 849–859.

Förster, C., Burek, M., Romero, I. a, Weksler, B., Couraud, P.-O., Drenckhahn, D., 2008. Differential effects of hydrocortisone and TNFalpha on tight junction proteins in an in vitro model of the human blood-brain barrier. *J. Physiol.* 586, 1937–1949.

Funatsu, H., Noma, H., Mimura, T., Eguchi, S., Hori, S., 2009. Association of Vitreous Inflammatory Factors with Diabetic Macular Edema. *Ophthalmology* 116, 73–79.

Funatsu, H., Yamashita, H., Ikeda, T., Mimura, T., Eguchi, S., Hori, S., 2003. Vitreous levels of interleukin-6 and vascular endothelial growth factor are related to diabetic macular edema. *Ophthalmology* 110, 1690–1696.

Furihata, T., Kawamatsu, S., Ito, R., Saito, K., Suzuki, S., Kishida, S., Saito, Y., Kamiichi, A., Chiba, K., 2015. Hydrocortisone enhances the barrier properties of HBMEC/ciβ, a brain microvascular endothelial cell line, through mesenchymal-to-endothelial transition-like effects. *Fluids Barriers CNS* 12, 1–15.

Gafni, J., Cong, X., Chen, S.F., Gibson, B.W., Ellerby, L.M., 2009. Calpain-1 cleaves and activates caspase-7. *J. Biol. Chem.* 284, 25441–25449.

Gaudreault, J., Fei, D., Rusit, J., Suboc, P., Shiu, V., 2005. Preclinical pharmacokinetics of ranibizumab (rhuFabV2) after a single intravitreal administration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46, 726–733.

Gil-Parrado, S., Fernández-Montalván, A., Assfalg-Machleidt, I., Popp, O., Bestvater, F., Holloschi, A., Knoch, T.A., Auerswald, E.A., Welsh, K., Reed, J.C., Fritz, H., Fuentes-Prior, P., Spiess, E., Salvesen, G.S., Machleidt, W., 2002. Ionomycin-activated calpain triggers apoptosis. A probable role for Bcl-2 family members. *J. Biol. Chem.* 277, 27217–27226.

Glading, A., Bodnar, R.J., Reynolds, I.J., Shiraha, H., Potter, D.A., Blair, H.C., Wells, A., Satish, L., 2004. Epidermal Growth Factor Activates m-Calpain ( Calpain II ), at Least in Part , by Epidermal Growth Factor Activates m-Calpain ( Calpain II ), at Least in Part , by Extracellular Signal-Regulated Kinase-Mediated Phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 24, 2499–2512.

Glading, A., Chang, P., Lauffenburger, D. a, Wells, A., 2000. Epidermal Growth Factor Receptor Activation of Calpain Is Required for Fibroblast Motility and Occurs via an ERK / MAP Kinase Signaling Pathway \*. *Biochemistry* 275, 2390–2398.

Glading, A., Überall, F., Keyse, S.M., Lauffenburger, D.A., Wells, A., 2001. Membrane Proximal ERK Signaling Is Required for M-calpain Activation Downstream of Epidermal Growth Factor Receptor Signaling. *J. Biol. Chem.* 276, 23341–23348.

Goll, D., Thompson, V., Li, H., 2003. The calpain system. *Physiol. Rev.* 1990, 731–801.

Grimm, C., Wenzel, a, Hafezi, F., Remé, C.E., 2000. Gene expression in the mouse retina: the effect of damaging light. *Mol. Vis.* 6, 252–60.

Gustavsson, C., Agardh, C.-D., Agardh, E., 2013. Profile of intraocular tumour necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-6 in diabetic subjects with different degrees of diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmol.* 91, 445–452.

Harhaj, N.S., Felinski, E.A., Wolpert, E.B., Sundstrom, J.M., Gardner, T.W., Antonetti, D.A., 2006. VEGF activation of protein kinase C stimulates occludin phosphorylation

and contributes to endothelial permeability. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 5106–5115.

Hashizume, K., Hirasawa, M., Imamura, Y., Noda, S., Shimizu, T., Shinoda, K., Kurihara, T., Noda, K., Ozawa, Y., Ishida, S., Miyake, Y., Shirasawa, T., Tsubota, K., 2008. Retinal dysfunction and progressive retinal cell death in SOD1-deficient mice. *Am. J. Pathol.* 172, 1325–31.

Inokuchi, Y., Imai, S., Nakajima, Y., Shimazawa, M., Aihara, M., Araie, M., Hara, H., 2009. Edaravone, a Free Radical Scavenger, Protects against Retinal Damage in Vitro and in Vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 329, 687–698.

Inoue, J., Nakamura, M., Cui, Y.S., Sakai, Y., Sakai, O., Hill, J.R., Wang, K.K.W., Yuen, P.W., 2003. Structure-activity relationship study and drug profile of N-(4-fluorophenylsulfonyl)-L-valyl-L-leucinal (SJA6017) as a potent calpain inhibitor. *J. Med. Chem.* 46, 868–871.

Isayama, T., Goodman, S.R., Zagon, I.S., 1991. Spectrin Isoforms in the Mammalian. *J. Neurosci.* 11, 3531–3538.

Itoh M, Nagafuchi A, Moroi S, T.S., 2007. Involvement of ZO-1 in Cadherin-based Cell Adhesion through Its Direct Binding to  $\alpha$  Catenin and Actin Filaments. *Semin. Ophthalmol.* 22, 75–79.

Joussen, A.M., Poulaki, V., Mitsiades, N., Kirchhof, B., Koizumi, K., Döhmen, S., Adamis, A.P., 2002. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs prevent early diabetic retinopathy via TNF- $\alpha$  suppression. *FASEB J.* 16, 438–440.

Kanan, Y., Moiseyev, G., Agarwal, N., Ma, J.X., Al-Ubaidi, M.R., 2007. Light induces programmed cell death by activating multiple independent proteases in a cone photoreceptor cell line. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 40–51.

Kennedy, C.J., Rakoczy, P.E., Constable, I.J., 1995. Lipofuscin of the retinal pigment epithelium: A review. *Eye* 9, 763–771.

Kim, J.H., Chang, Y.S., Lee, D.W., Kim, C.G., Kim, J.W., 2017. Incidence and Timing

of the First Recurrence in Neovascular Age-Related Macular Degeneration: Comparison Between Ranibizumab and Aflibercept. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 33, 445–451.

Kim, Y.H., Choi, M.Y., Kim, Y.S., Park, C.H., Lee, J.H., Chung, I.Y., Yoo, J.M., Choi, W.S., Cho, G.J., Kang, S.S., 2007. Triamcinolone acetonide protects the rat retina from STZ-induced acute inflammation and early vascular leakage. *Life Sci.* 81, 1167–1173.

Kimura, K., Teranishi, S., Nishida, T., 2009. Interleukin-1beta-induced disruption of barrier function in cultured human corneal epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50, 597–603.

Kiriakidis, S., Andreakos, E., Monaco, C., Foxwell, B., Feldmann, M., Paleolog, E., 2003. VEGF expression in human macrophages is NF- $\kappa$ B-dependent: studies using adenoviruses expressing the endogenous NF- $\kappa$ B inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$  and a kinase-defective form of the I $\kappa$ B kinase 2. *J. Cell Sci.* 116, 665–674.

Kuro, M., Yoshizawa, K., Uehara, N., Miki, H., Takahashi, K., Tsubura, A., 2011. Calpain inhibition restores basal autophagy and suppresses MNU-induced photoreceptor cell death in mice. *In Vivo (Brooklyn)*. 25, 617–623.

Kuroda, Y., Yamashiro, K., Miyake, M., Yoshikawa, M., Nakanishi, H., Oishi, A., Tamura, H., Ooto, S., Tsujikawa, A., Yoshimura, N., 2015. Factors Associated with Recurrence of Age-Related Macular Degeneration after Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Treatment: A Retrospective Cohort Study. *Ophthalmology* 122, 2303–2310.

Lee, M.S., Kwon, Y.T., Li, M., Peng, J., Friedlander, R.M., Tsai, L.H., 2000. Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature* 405, 360–364.

Liu, Y., Costa, M., Gerhardinger, C., 2012. IL-1 $\beta$  is upregulated in the diabetic retina and retinal vessels: cell-specific effect of high glucose and IL-1 $\beta$  autostimulation. *PLoS One* 7, 1–8.

Lornejad-Schäfer, M.R., Schäfer, C., Schöffl, H., Frank, J., 2009. Cytoprotective role of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in light-damaged human retinal pigment epithelial cells. *Photochem. Photobiol.* 85, 834–842.

- Ma, T.Y., 2004. TNF- $\alpha$ -induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF- $\kappa$ B activation. *Gastrointest. Liver Physiol.* 286, 367G–376.
- Marc, R.E., Jones, B.W., Watt, C.B., Vazquez-Chona, F., Vaughan, D.K., Organisciak, D.T., 2008. Extreme retinal remodeling triggered by light damage: implications for age related macular degeneration. *Mol. Vis.* 14, 782–806.
- Matsuyama, M., Hayama, T., Funao, K., Tsuchida, K., Takemoto, Y., Sugimura, K., Kawahito, Y., Sano, H., Nakatani, T., Yoshimura, R., 2006. Treatment With Edaravone Improves the Survival Rate in Renal Warm Ischemia-Reperfusion Injury Using Rat Model. *Transplant. Proc.* 38, 2199–2200.
- Meng, D., Shi, X., Jiang, B.-H., Fang, J., 2007. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) induces epidermal growth factor receptor transactivation and cell proliferation through reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* 42, 1651–60.
- Miloso, M., Scuteri, a, Foudah, D., Tredici, G., 2008. MAPKs as mediators of cell fate determination: an approach to neurodegenerative diseases. *Curr. Med. Chem.* 15, 538–548.
- Mirshahi, A., Hoehn, R., Lorenz, K., Kramann, C., Baatz, H., 2012. Anti-tumor necrosis factor alpha for retinal diseases: current knowledge and future concepts. *J. Ophthalmic Vis. Res.* 7, 39–44.
- Mittag, T.W., Bayer, A.U., La VAIL, M.M., 1999. Light-induced retinal damage in mice carrying a mutated SOD I gene. *Exp. Eye Res.* 69, 677–83.
- Miyamoto, K., Khosrof, S., Bursell, S.E., Moromizato, Y., Aiello, L.P., Ogura, Y., Adamis, A.P., 2000. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced retinal vascular permeability is mediated by intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). *Am. J. Pathol.* 156, 1733–1739.
- Munemasa, Y., Ohtani-Kaneko, R., Kitaoka, Y., Kuribayashi, K., Isenoumi, K., Kogo, J., Yamashita, K., Kumai, T., Kobayashi, S., Hirata, K., 2005. Contribution of mitogen-activated protein kinases to NMDA-induced neurotoxicity in the rat retina.



Brain Res. 1044, 227–240.

Nath, R., Raser, K.J., Stafford, D., Hajimohammadreza, I., Posner, A., Allen, H., Talanian, R. V, Yuen, P.-W., Gilbertsen, R.B., Wang, K.K.W., 1996. Non-erythroid  $\alpha$ -spectrin breakdown by calpain and interleukin 1 $\beta$ -converting-enzyme-like protease(s) in apoptotic cells : contributory roles of both protease families in neuronal apoptosis. *Biochem. J.* 319, 683–690.

Nickells, R.W., Zack, D.J., 1996. Apoptosis in ocular disease: a molecular overview. *Ophthalmic Genet.* 17, 145–165.

Noell, W.K., Walker, V.S., Kang, B.S., Berman, S., 1966. Retinal damage by light in rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 5, 450–473.

Nowak, J.Z., 2006. Age-related macular degeneration (AMD): pathogenesis and therapy. *Pharmacol. Rep.* 58, 353–63.

O'Hare, M.J., Kushwaha, N., Zhang, Y., Aleyasin, H., Callaghan, S.M., Slack, R.S., Albert, P.R., Vincent, I., Park, D.S., 2005. Differential Roles of Nuclear and Cytoplasmic Cyclin-Dependent Kinase 5 in Apoptotic and Excitotoxic Neuronal Death. *J. Neurosci.* 25, 8954–8966.

Oka, T., Nakajima, T., Tamada, Y., Shearer, T.R., Azuma, M., 2007. Contribution of calpains to photoreceptor cell death in N-methyl-N-nitrosourea-treated rats. *Exp. Neurol.* 204, 39–48.

Oka, T., Tamada, Y., Nakajima, E., Shearer, T.R., Azuma, M., 2006. Presence of calpain-induced proteolysis in retinal degeneration and dysfunction in a rat model of acute ocular hypertension. *J. Neurosci. Res.* 83, 1342–1351.

Oka, T., Walkup, R.D., Tamada, Y., Nakajima, E., Tochigi, A., Shearer, T.R., Azuma, M., 2006. Amelioration of retinal degeneration and proteolysis in acute ocular hypertensive rats by calpain inhibitor ((1S)-1-(((1S)-1-benzyl-3-cyclopropylamino-2,3-di-oxopropyl)amino)carbonyl)-3-methylbutyl)carbamic acid 5-methoxy-3-oxapentyl ester. *Neuroscience* 141, 2139–2145.

Organisciak, D.T., Darrow, R.M., Jiang, Y.L., Marak, G.E., Blanks, J.C., 1992. Protection by dimethylthiourea against retinal light damage in rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 33, 1599–1609.

Oshima, Y., 2001. Prevalence of age related maculopathy in a representative Japanese population: the Hisayama study. *Br. J. Ophthalmol.* 85, 1153–1157.

Pappuru, R.R., Ouyang, Y., Nittala, M.G., Hemmati, H.D., Keane, P.A., Walsh, A.C., Sadda, S.R., 2011. Relationship between outer retinal thickness substructures and visual acuity in eyes with dry age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 6743–6748.

Paquet-Durand, F., Azadi, S., Hauck, S.M., Ueffing, M., Van Veen, T., Ekström, P., 2006. Calpain is activated in degenerating photoreceptors in the rd1 mouse. *J. Neurochem.* 96, 802–814.

Paquet-Durand, F., Johnson, L., Ekström, P., 2007. Calpain activity in retinal degeneration. *J. Neurosci. Res.*

Paquet-Durand, F., Sanges, D., McCall, J., Silva, J., Van Veen, T., Marigo, V., Ekström, P., 2010. Photoreceptor rescue and toxicity induced by different calpain inhibitors. *J. Neurochem.* 115, 930–940.

Pedram, A., Razandi, M., Levin, E.R., 2002. Deciphering vascular endothelial cell growth factor/vascular permeability factor signaling to vascular permeability inhibition by atrial natriuretic peptide. *J. Biol. Chem.* 277, 44385–44398.

Perche, O., Doly, M., Ranchon-Cole, I., 2009. Calpains are activated by light but their inhibition has no neuroprotective effect against light-damage. *Exp. Eye Res.* 89, 989–994.

Perche, O., Doly, M., Ranchon-Cole, I., 2007. Caspase-dependent apoptosis in light-induced retinal degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 2753–2759.

Persson, H., Kawashima, S., Karlsson, J.O., 1993. Immunohistochemical localization of

calpains and calpastatin in the rabbit eye. *Brain Res.* 611, 272–278.

Pettmann, B., Henderson, C.E., 1998. Neuronal cell death. *Neuron.*

Pörn-Ares, M.I., Samali, a, Orrenius, S., 1998. Cleavage of the calpain inhibitor, calpastatin, during apoptosis. *Cell Death Differ.* 5, 1028–1033.

Prima, V., Depoix, C., Masselot, B., Formstecher, P., Lefebvre, P., 2000. Alteration of the glucocorticoid receptor subcellular localization by non steroidal compounds. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 72, 1–12.

Ranchon, I., Chen, S., Alvarez, K., Anderson, R.E., 2001. Systemic Administration of Phenyl- N - tert -Butylnitronone Protects the Retina from Light Damage. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1375–1379.

Ray, A., Prefontaine, K.E., 1994. Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 752–756.

Reme, C.E., Grimm, C., Hafezi, F., Wenzel, A., Williams, T.P., 2000. Apoptosis in the Retina: The Silent Death of Vision. *News Physiol. Sci.* 15, 120–124.

Romero, I.A., Radewicz, K., Jubin, E., Michel, C.C., Greenwood, J., Couraud, P.O., Adamson, P., 2003. Changes in cytoskeletal and tight junctional proteins correlate with decreased permeability induced by dexamethasone in cultured rat brain endothelial cells. *Neurosci. Lett.*

Saido, T.C., Shibata, M., Takenawa, T., Murofushi, H., Suzuki, K., 1992. Positive regulation of mu-calpain action by polyphosphoinositides. *J. Biol. Chem.* 267, 24585–90.

Scheinman, R.I., Gualberto, A., Jewell, C.M., Cidlowski, J.A., Baldwin, A.S., 1995. Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors. *Mol. Cell. Biol.* 15, 943–53.

Shahinfar, S., Edward, D.P., Tso, M.O., 1991. A pathologic study of photoreceptor cell

death in retinal photic injury. *Curr. Eye Res.* 10, 47–59.

Shimazaki, H., Hironaka, K., Fujisawa, T., Tsuruma, K., Tozuka, Y., Shimazawa, M., Takeuchi, H., Hara, H., 2011. Edaravone-loaded liposome eyedrops protect against light-induced retinal damage in mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 7289–7297.

Shimazawa, M., Suemori, S., Inokuchi, Y., Matsunaga, N., Nakajima, Y., Oka, T., Yamamoto, T., Hara, H., 2010. A Novel Calpain Inhibitor, ((1S)-1-(((1S)-1-1-Benzyl-3-methylbutyl) carbamic Acid 5-Methoxy-3-oxapentyl Ester (SNJ-1945)), Reduces Murine Retinal Cell Death In Vitro and In Vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 332, 380–387.

Shimura, M., Yasuda, K., Nakazawa, T., Hirano, Y., Sakamoto, T., Ogura, Y., Shiono, T., 2011. Visual outcome after intravitreal triamcinolone acetonide depends on optical coherence tomographic patterns in patients with diffuse diabetic macular edema. *Retina* 31, 748–754.

Shimura, M., Yasuda, K., Yasuda, M., Nakazawa, T., 2013. Visual outcome after intravitreal bevacizumab depends on the optical coherence tomographic patterns of patients with diffuse diabetic macular edema. *Retina* 33, 740–747.

Shin, E.S., Sorenson, C.M., Sheibani, N., 2014. Diabetes and retinal vascular dysfunction. *J. Ophthalmic Vis. Res.* 9, 362–373.

Son, Y., Kim, S., Chung, H.-T., Pae, H.-O., 2013. Reactive oxygen species in the activation of MAP kinases., *Methods in enzymology.*

Suzuki, M., Nagai, N., Izumi-Nagai, K., Shinoda, H., Koto, T., Uchida, A., Mochimaru, H., Yuki, K., Sasaki, M., Tsubota, K., Ozawa, Y., 2014. Predictive factors for non-response to intravitreal ranibizumab treatment in age-related macular degeneration. *Br. J. Ophthalmol.* 98, 1186–1191.

Suzuki, R., Gopalrao, R.K., Maeda, H., Rao, P., Yamamoto, M., Xing, Y., Mizobuchi, S., Sasaguri, S., 2005. MCI-186 inhibits tumor growth through suppression of EGFR phosphorylation and cell cycle arrest. *Anticancer Res.* 25, 1131–1138.

- Takamatsu, Y., Yuki, S., Watanabe, T., 1997. Studies on the concentrations of 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one (MCI-186) in dog plasma and cerebral spinal fluid. *Jpn Pharmacol Ther* 25, S1785–S1791.
- Tamada, Y., Walkup, R.D., Shearer, T.R., Azuma, M., 2007. Contribution of Calpain to Cellular Damage in Human Retinal Pigment Epithelial Cells Cultured with Zinc Chelator. *Curr. Eye Res.* 32, 565–573.
- Tamura, H., Miyamoto, K., Kiryu, J., Miyahara, S., Katsuta, H., Hirose, F., Musashi, K., Yoshimura, N., 2005. Intravitreal injection of corticosteroid attenuates leukostasis and vascular leakage in experimental diabetic retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46, 1440–1444.
- Taniguchi, M., Uchinami, M., Doi, K., Yoshida, M., Sasaki, H., Tamagawa, K., Horiuchi, T., Tanaka, K., 2007. Edaravone Reduces Ischemia-Reperfusion Injury Mediators in Rat Liver. *J. Surg. Res.* 137, 69–74.
- Tanito, M., Elliott, M.H., Kotake, Y., Anderson, R.E., 2005. Protein modifications by 4-hydroxynonenal and 4-hydroxyhexenal in light-exposed rat retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46, 3859–3868.
- Tanito, M., Li, F., Elliott, M.H., Dittmar, M., Anderson, R.E., 2007. Protective effect of TEMPOL derivatives against light-induced retinal damage in rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 1900–1905.
- Tanito, M., Masutani, H., Nakamura, H., Ohira, A., Yodoi, J., 2002. Cytoprotective effect of thioredoxin against retinal photic injury in mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43, 1162–1167.
- Tsujimoto, I., Hikoso, S., Yamaguchi, O., Kashiwase, K., Nakai, A., Takeda, T., Watanabe, T., Taniike, M., Matsumura, Y., Nishida, K., Hori, M., Kogo, M., Otsu, K., 2005. The antioxidant edaravone attenuates pressure overload-induced left ventricular hypertrophy. *Hypertension* 45, 921–926.
- Valavanidis, A., Vlachogianni, T., Fiotakis, C., 2009. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J. Environ. Sci.*

Heal. - Part C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev. 27, 120–139.

Wako, R., Yasukawa, T., Kato, A., Omori, T., Ishida, S., Ishibashi, T., Ogura, Y., 2014. [Causes and prevalence of visual impairment in Japan]. *Nihon. Ganka Gakkai Zasshi* 118, 495–501.

Wang, K.K., Posmantur, R., Nadimpalli, R., Nath, R., Mohan, P., Nixon, R. a, Talanian, R. V, Keegan, M., Herzog, L., Allen, H., 1998. Caspase-mediated fragmentation of calpain inhibitor protein calpastatin during apoptosis. *Arch. Biochem. Biophys.* 356, 187–196.

Warner, W.A., Sanchez, R., Dawoodian, A., Li, E., Momand, J., 2013. The susceptibility of the retina to photochemical damage from visible light. 80, 631–637.

Wenzel, A., Grimm, C., Samardzija, M., Remé, C.E., 2005. Molecular mechanisms of light-induced photoreceptor apoptosis and neuroprotection for retinal degeneration. *Prog. Retin. Eye Res.* 24, 275–306.

Xu, H.Z., Le, Y.Z., 2011. Significance of outer blood-retina barrier breakdown in diabetes and ischemia. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 2160–2164.

Yamamoto, M., Lidia, K., Gong, H., Onitsuka, S., Kotani, T., Ohira, A., 1999. Changes in manganese superoxide dismutase expression after exposure of the retina to intense light. *Histochem. J.* 31, 81–87.

Yamashita, H., Horie, K., Yamamoto, T., Nagano, T., Hirano, T., 1992. Light-induced retinal damage in mice. Hydrogen peroxide production and superoxide dismutase activity in retina. *Retina* 12, 59–66.

Yang, J.H., Basinger, S.F., Gross, R.L., Wu, S.M., 2003. Blue light-induced generation of reactive oxygen species in photoreceptor ellipsoids requires mitochondrial electron transport. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 1312–1319.

Yang, L.P., Zhu, X.A., Tso, M.O.M., 2007. Role of NF- $\kappa$ B and MAPKs in light-induced photoreceptor apoptosis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 4766–4776.

Yasuda, M., Kiyohara, Y., Hata, Y., Arakawa, S., Yonemoto, K., Doi, Y., Iida, M., Ishibashi, T., 2009. Nine-Year Incidence and Risk Factors for Age-Related Macular Degeneration in a Defined Japanese Population. The Hisayama Study. *Ophthalmology* 116, 2135–2140.

Yoshida, H., Yanai, H., Namiki, Y., Fukatsu-Sasaki, K., Furutani, N., Tada, N., 2006. Neuroprotective effects of edaravone: A novel free radical scavenger in cerebrovascular injury. *CNS Drug Rev.* 12, 9–20.

Zhang, X., Bao, S., Lai, D., Rapkins, R.W., Gillies, M.C., 2008. Intravitreal triamcinolone acetonide inhibits breakdown of the blood-retinal barrier through differential regulation of VEGF-A and its receptors in early diabetic rat retinas. *Diabetes* 57, 1026–1033.

Zheng, Y., He, M., Congdon, N., 2012. The worldwide epidemic of diabetic retinopathy. *Indian J. Ophthalmol.* 60, 428–431.

Zhou, J., Wang, S., Xia, X., 2012. Role of Intravitreal Inflammatory Cytokines and Angiogenic Factors in Proliferative Diabetic Retinopathy. *Curr. Eye Res.* 37, 416–420.

## 略語一覽表

ASK1	:	Apoptosis signal-regulating kinase 1
BRB	:	blood-retinal barrier
Ca	:	Calcium
DEX	:	dexamethasone
DNA	:	deoxyribonucleic acid
EBM	:	Evidence-based medicine
EGFR	:	epidermal growth factor receptor
ERG	:	Electroretinogram
ERK1/2	:	extracellular signal regulated protein kinases 1/2
FD	:	fluorescein isothiocyanate dextran
HHE	:	hydroxy hexenal
HNE	:	hydroxy nonenal
HRMECs	:	Human retinal microvascular endothelial cells
i.p.	:	intraperitoneal injection
i.v.	:	intravenous injection
ICAM-1	:	intracellular adhesion molecule-1
IL-1 $\beta$	:	interleukin-1 $\beta$
JNK	:	c-Jun N-terminal kinase
MAPKs	:	Mitogen-activated Protein Kinases
MPK	:	MAPK phosphatase
NF- $\kappa$ B	:	nuclear factor-kappa B
NMDA	:	N-methyl-D-aspartate
NO	:	Nitric oxide
OCT	:	optical coherence tomography
8-OHdG	:	8-hydroxy-2'-deoxyguanosine
ONL	:	outer nuclear layer
PBS	:	phosphate buffered saline
QOL	:	quality of life
SEM	:	standard error mean
SOD	:	superoxide dismutase
TA	:	triamcinolone acetonide
TNF- $\alpha$	:	tumor necrosis factor- $\alpha$
TUNEL	:	TdT-mediated dUTP nickend labeling