

網膜疾患における
神経及び血管保護に関する研究

夫馬 慎一郎

目次

| | |
|----------------------------------|------|
| 序論 | 2 頁 |
| 第 1 章 緑内障治療薬配合点眼薬の網膜神経保護作用に関する検討 | 7 頁 |
| 第 1 節 緒言 | |
| 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 網膜静脈閉塞症マウスモデルの構築 | 23 頁 |
| 第 1 節 緒言 | |
| 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 網膜静脈閉塞症モデルにおける緑内障治療薬の薬効検討 | 55 頁 |
| 第 1 節 緒言 | |
| 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 | 74 頁 |
| 謝辞 | 77 頁 |
| 引用文献 | 78 頁 |
| 略語一覧 | 92 頁 |

序論

ヒトの眼は角膜、強膜、脈絡膜、虹彩、毛様体、網膜などから形成されており、外界からの光刺激を網膜が受け取ると、情報は電気信号として視神経を介して脳に送り込まれ、脳で色や形を認識する (Fig. 1)。

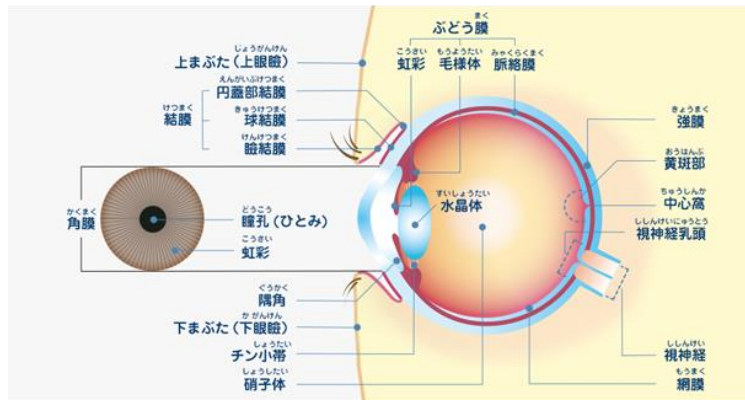


Fig. 1 Structure of eye

<https://www.alcon.co.jp/eye-health/eye-care-mechanism>

さらに網膜は10層で構成されており、内側から内境界膜、神経線維層、神経節細胞層、内網状層、内顆粒層、外網状層、外顆粒層、外境界膜、視細胞層、網膜色素上皮層に分けられる (Fig. 2)。

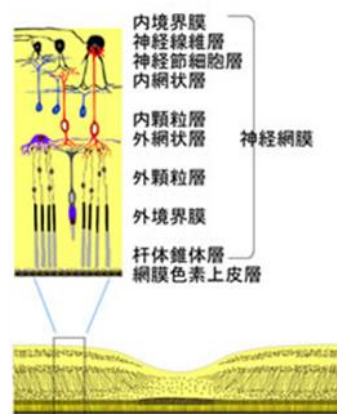


Fig. 2 Structure of retinal layer

<https://osaka.hosp.go.jp/department/ophthal/senmon/mou/index.html> より改変引用

眼疾患の代表として白内障、緑内障、加齢黄斑変性症、網膜色素変性症、糖尿病網膜症、そして網膜静脈閉塞症 (retinal vein occlusion : RVO) などがある。なかでも視神経と視野に特徴的な変化を有する緑内障は、世界中で6千万人以上が罹患し、2040年には1億1千万人以上が罹患すると予測されている眼疾患である (1)。眼圧の亢進や加齢による脆弱性の亢進により、脳へ視覚情報を伝える網膜神経節細胞 (retinal ganglion cell : RGC) が障害を受けることで視力の低下が引き起こされると考えられている (2, 3)。緑内障は、眼圧の上昇をきたしうる原因をほかの疾患に求めることができない原発開放隅角緑内障、眼圧が正常範囲にとどまる正常眼圧緑内障、他疾患や薬物使用による眼圧上昇が原因の続発緑内障などに分類され (Fig. 3)、日本では7割以上の患者が正常眼圧緑内障であることが日本緑内障学会による多治見スタディで明らかとなっている (4)。

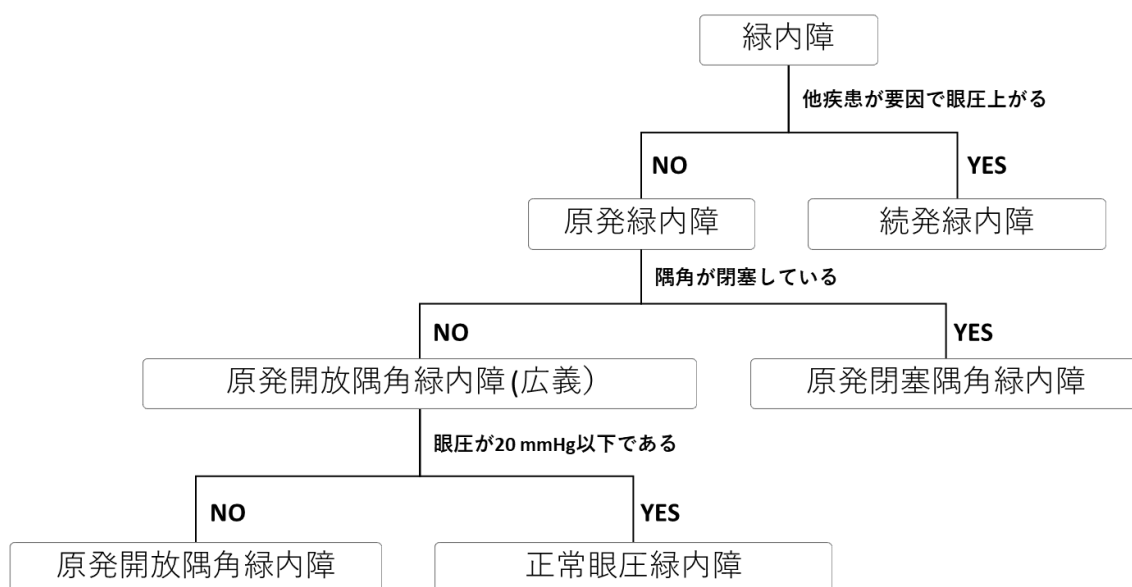


Fig. 3 Classification of glaucoma

緑内障診療ガイドライン (第5版, 2022) 改変引用

正常眼圧緑内障を含めたいずれのタイプの緑内障に対しても、治療薬には眼圧降下作用のあるプロスタグランジンアナログのラタノプロスト点眼薬や β 遮断薬のチモロールマレイン酸点眼薬などが用いられる (5, 6)。環境要因や遺伝要因などにより、視神経のストレス耐性が低くなっていると正常の眼圧でも視神経に負荷がかかっていると想定される。そのため正常眼圧であっても眼圧を低下させることで視神経に対する負荷を軽減できると考えられる。これらの点眼薬に対する治療抵抗性が高い患者に対しては配合点眼薬や併用薬が用いられるが、多くの場合単剤よりも配合点眼薬のほうが、眼圧降下作用がより高いことが知られている (20)。緑内障患者に対しては上記のような眼圧降下作用のある点眼薬の処置が治療の主軸となるが、最近では神経保護作用をはじめとする眼圧降下作用以外のメカニズムを介した緑内障治療薬の開発も進められている。これまで複数の臨床試験で神経保護作用をもつ化合物の治験が実施されてきており (7-9)、例えば、神経栄養因子の一つである nerve growth factor (NGF) を緑内障患者に点眼処置すると視機能の低下が抑制されるという報告がある (7)。一部の正常眼圧緑内障では、様々なストレスによって RGC が直接的に障害されている可能性があるが、眼圧降下作用非依存的に神経保護作用を発揮する薬剤は、神経保護作用を介して病態の改善に寄与している可能性がある。実際に、神経保護作用が期待されるイチョウ葉抽出物を正常眼圧緑内障患者に対して投与すると眼圧は変化がなかったが、視機能が改善することが報告されている (8)。このように緑内障治療標的として神経保護作用が注目されているが、眼圧降下作用を主作用とした既存の緑内障点眼薬の一部においても神経保護作用があることが報告されている (10)。単剤の緑内障点眼薬については神経保護作用に関する研究が進んでいる一方で、点眼配合薬による神経保護作用は

これまで検討されていない。各単剤の神経保護作用メカニズムは多様であり、併用によってより高い神経保護作用を発揮する可能性も考えられる。

また上述したラタノプロスト点眼薬やチモロールマレイン酸点眼薬は簡便で、安全性が高く、また治療コストも低い薬剤であることから緑内障の治療薬として汎用されているが、その薬理メカニズムを考えると緑内障以外の眼疾患に対しても有効である可能性がある。例えば、チモロールは β 受容体を阻害することで RVO や糖尿病網膜症の最も重要な病態形成因子の一つである血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor : VEGF) の発現を抑制することが知られており (11)、これらの網膜虚血疾患に対しても有効である可能性がある。またラタノプロストについても低酸素ストレス時のペリサイトに対する障害を抑制することから虚血による浮腫に対して有効な可能性がある。そこでラタノプロストやチモロールの RVO へのドラッグリポジショニングの可能性を明らかにするために、非臨床 RVO モデルを構築し、薬効評価を実施したいと考えた。

RVO は網膜血管疾患の中で罹患率が 2 番目に高い疾患であり、高血圧や動脈硬化などが要因で静脈が動脈に圧迫されることで、静脈が狭窄もしくは閉塞する疾患である (Fig. 4)。静脈の閉塞による虚血状態が続くと、VEGF などが増加することで血管透過性が亢進し、浮腫などの病態を形成する。治療法としては、ラニビズマブをはじめとした抗 VEGF 抗体薬の硝子体内投与が汎用されるが、侵襲性の高さ、頻回投与による白内障の発症といった課題がある。新たな治療薬の開発が望まれているが、臨床を反映した RVO モデルが存在しないため、研究開発が進まないのが現状である。

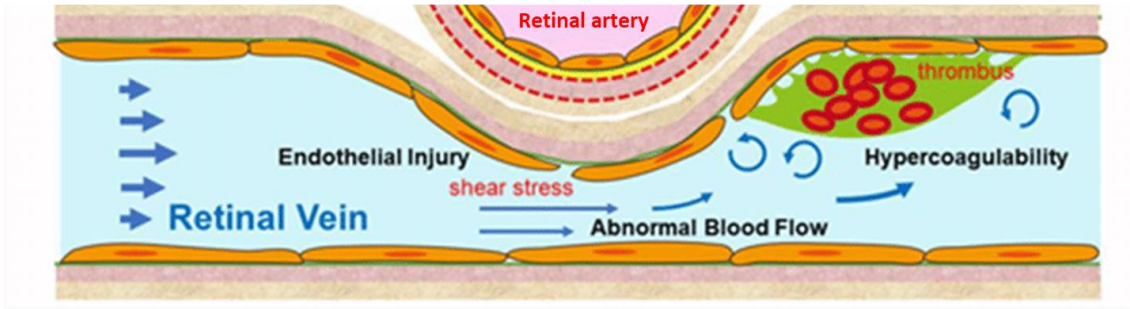


Fig. 4 Mechanism of RVO (10)より改変引用

本研究では、まず第1章として緑内障治療薬であるチモロールとラタノプロスト単剤及び配合点眼薬の神経保護作用について *in vitro* で検討した。第2章では、RVOモデルの構築について検討を行った。最後に第3章では、構築したRVOモデルを用いて緑内障治療薬であるラタノプロストとチモロールの点眼薬がRVOモデルにおける病態を改善するか検討した。

第1章 緑内障治療薬配合点眼薬の網膜神経保護作用に関する検討

第1節 緒言

緑内障は、世界中で6千万人以上が罹患し、2040年には1億1千万人以上が罹患すると予測されている進行性の神経変性疾患である(1)。また日本では緑内障は不可逆的失明の要因第一位の疾患でもある。眼圧亢進が疾患進行の最も重要な危険因子の一つであることから、緑内障の治療には眼圧を下げることに重点が置かれている(Table 1)。

Table 1 The list of anti-glaucoma drug

| 薬剤クラス | 代表薬剤 | 作用機序 |
|---------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| 第一選択薬 FP受容体作動薬 | ラタプロスト ビマトプロスト | ぶどう膜強膜流出経路流出促進 |
| EP2受容体作動薬 | オミデネバグ・イソプロピル | ぶどう膜強膜流出経路流出促進 線維柱体路流出促進 |
| β 遮断薬 | チモロール カルテオロール | 房水産生抑制 |
| 第二選択薬 $\alpha 1\beta$ 遮断薬 | ニブラジロール | 房水産生抑制 ぶどう膜強膜流出経路流出促進 |
| $\alpha 1$ 遮断薬 | ブナゾシン | ぶどう膜強膜流出経路流出促進 |
| $\alpha 2$ 作動薬 | プリモニジン | 房水産生抑制 ぶどう膜強膜流出経路流出促進 |
| 炭酸脱水酵素阻害薬 | ドルゾラミド プリンゾラミド | 房水産生抑制 |
| ROCK阻害薬 | リパスジル | 線維柱体路流出促進 |

緑内障診療ガイドライン(第5版, 2022)より改変引用

眼圧が上昇すると、視覚情報を脳に伝達する役割を持つ RGC が障害されることで視力の低下を引き起こすと考えられている。一方で眼圧が正常にもかかわらず、RGC が障害される正常眼圧緑内障も存在する。正常眼圧緑内障では何らかのストレスが RGC 障害を引き起こすことで発症する可能性がある(2, 3)。例えば活性酸素(reactive oxygen species; ROS)による酸化ストレス、小胞体において異常なタンパク質が蓄積することで生じる小胞体(endoplasmic reticulum: ER)ストレス、虚血によって栄養素や酸素が十分に細胞へ到達しないことで生じる虚血ストレスなどによって RGC が障害されることが報告されており、これらのストレスが組み合わさることで、眼圧が正常にもかかわらず、RGC 障害による

視力低下が引き起こされると考えられる(Fig. 5) (13, 14)。以上のことから、緑内障治療においては、眼圧を下げるだけでなく、RGC を保護することが重要である。現在では直接的に RGC を保護する方法はなく、眼圧を低下させることで RGC 障害を遅延させることしかできない。

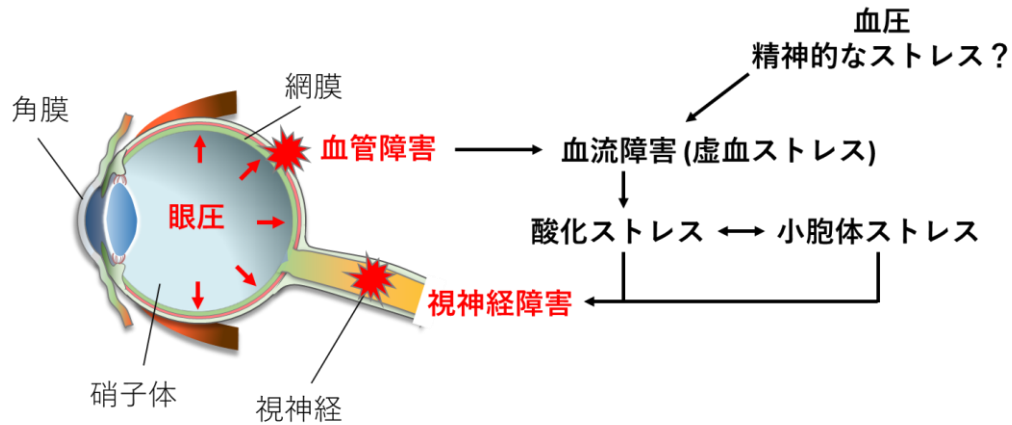


Fig. 5 Glaucoma and neural stress

緑内障の標準治療薬であるラタノプロストはプロスタグランジン F2 α アナログであり、房水の排出を促すことで眼圧を低下させる (15)。さらにラタノプロストは、グルタチオンの増加を介して活性酸素を減少させることにより、眼圧下降とは無関係に RGC 障害を抑制することが報告されている (16, 17)。また別の緑内障の治療薬であるチモロールなどの β 遮断薬も房水産生の減少を介して眼圧を低下させるだけでなく、細胞レベルで RGC を直接的に保護することが報告されている (18)。単剤に対して治療抵抗性を示す患者に対しては、緑内障治療薬はいくつかの組み合わせの配合点眼薬が使用されることがある (Table 2)。

Table 2 The combination drug for glaucoma

| | チモロール | ラタノプロスト | トラボプロスト | タフルプロスト | カルテオロール | ドルゾラミド | プリモニジン |
|---------|-------|---------|---------|---------|---------|--------|--------|
| チモロール | | ○ | ○ | ○ | | ○ | ○ |
| ラタノプロスト | ○ | | | | | ○ | |
| トラボプロスト | ○ | | | | | | |
| タフルプロスト | ○ | | | | | | |
| カルテオロール | | ○ | | | | | |
| ドルゾラミド | ○ | | | | | | |
| プリモニジン | ○ | | | | | | |

緑内障診療ガイドライン (第5版, 2022) より改変引用

チモロールとラタノプロストは最も汎用される組み合わせの配合点眼薬のひとつであり、無作為化二重盲検試験において緑内障患者の眼圧を大きく低下させることが報告されている (19)。また両者の配合点眼薬はラタノプロストまたはチモロールの単剤療法よりも眼圧下降効果が高いことが知られている (20)。上述のようにラタノプロストとチモロールの単剤が神経細胞保護作用を有すること、及び眼圧下降作用において単剤より配合点眼薬のほうが有効性が高いことが知られている一方で、配合点眼薬の神経保護作用については検討されていない。

そこで本研究では、ラタノプロストとチモロール単剤及び併用による網膜神経細胞障害に対する保護効果を *in vitro* で検討した。

第2節 実験材料及び方法

2-1 実験材料

Hoechst 33342 及び propidium iodide (PI)は Invitrogen Co. (Eugene, OR, USA), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl chroman-2-carboxylic acid (trolox) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)、過酸化水素、ツニカマイシン、buthionine sulfoximine (BSO)、glutamate、リン酸二水素カリウム (potassium dihydrogenphosphate: KH_2PO_4)、塩化ナトリウム (sodium chloride: NaCl) はキシダ化学株式会社 (Osaka, Japan)、リン酸水素二ナトリウム十二水和物 (disodium hydrogenphosphate·12-water: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)、リン酸二水素ナトリウム二水和物 (sodium dihydrogenphosphate dihydrate·2-water: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)は Nakalai Tesque (Kyoto, Japan)、latanoprost は Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA)、timolol は LKT Laboratories (St. Paul, MN, USA)、PI3 kinase inhibitor 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one, LY294002 は Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)、ペニシリン及びストレプトマイシンは meiji seika (Tokyo, Japan) よりそれぞれ購入した。Phosphate-buffered saline (PBS) は、蒸留水にそれぞれ 136.9 mM NaCl 、2.68 mM KCl 、8.10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、1.47 mM KH_2PO_4 となるよう調製した。

2-2 実験方法

2-2-1 細胞培養

網膜神経細胞のセルラインである RGC-5 は、Dr. Neeraj Agarwal (UNT Health Science Center, Fort Worth, TX, USA) より譲与された。RGC-5 は 10% FBS, ペニシリン (100 U/mL) 及びストレプトマイシン (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を含んだ DMEM を用いて、37°C, 5% CO_2 条件下で培養した。細胞は 3~4 日おきにトリプシン

処理により継代した。

2-2-2 試料調製

チモロール、ラタノプロストは PBS で 1-1000 nM になるように調製した。併用群では 0.1、1 nM のラタノプロストと 1-1000 nM のチモロールもしくは 0.1、1 nM のチモロールと 1-1000 nM のラタノプロストを事前に混合して調製した。Trolox は 0.3 mM となるように調製した。

2-2-3 ツニカマイシンによる細胞死評価

RGC-5 を 1×10^3 cells/well ずつ 96-well プレートに播種し、37°C, 5% CO₂ 条件下で 24 時間培養した。その後 1% FBS を含む DMEM に置換し、各試料を添加して 1 時間培養後、ツニカマイシン (2.0 µg/mL) 条件下で 27 時間培養した。その後核染色を実施し、死細胞数を測定した。

2-2-4 過酸化水素水による細胞死評価

RGC-5 を 1×10^3 cells/well ずつ 96-well プレートに播種し、37°C, 5% CO₂ 条件下で 24 時間培養した。その後 1% FBS を含む DMEM に置換し、各試料を添加して 1 時間培養後、過酸化水素 (0.3 mM) 条件下で 27 時間培養した。その後核染色を実施し、死細胞数を測定した。

2-2-5 血清除去による細胞死評価

RGC-5 を 1×10^3 cells/well ずつ 96-well プレートに播種し、37°C, 5% CO₂ 条件下で 24 時間培養した。その後血清不含の DMEM に置換し、各試料を添加し、48 時間培養した。その後核染色を実施し、死細胞数を測定した。

2-2-6 buthionine sulfoximine/glutamate による細胞死評価

RGC-5 を 1×10^3 cells/well ずつ 96-well プレートに播種し、 37°C , 5% CO_2 条件下で 24 時間培養した。その後 1% FBS を含む DMEM 培地に置換し、各試料を添加して 1 時間培養後、BSO (0.05 mM)/glutamate (1 mM) 条件下で 24 時間培養した。その後核染色を実施し、死細胞数を測定した。

2-2-7 核染色

Hoechst 33342 と PI をそれぞれ 8.1、1.5 M になるように調製し、培地に添加した。15 分後に Olympus IX70 inverted epifluorescence microscope (Olympus, Tokyo, Japan) を用いて撮影し、Hoechst 33342 及び PI 陽性細胞数をそれぞれカウントした (Fig. 6)。

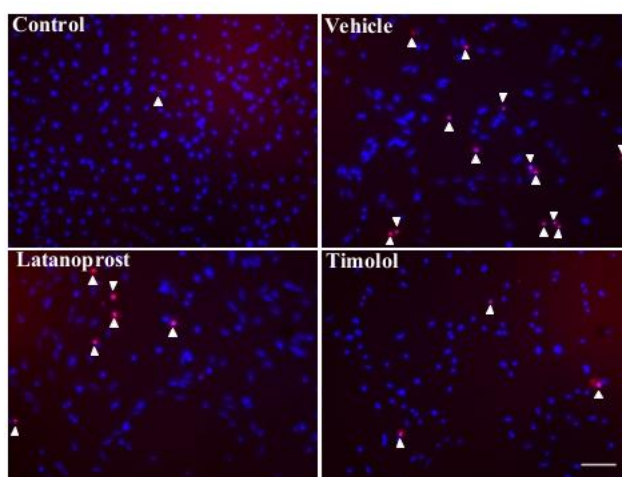


Fig. 6 Representative images of nuclear staining

White arrow heads indicate dead cells. Hydrogen peroxide (0.3 mM) increased the number of PI-positive cells while timolol and latanoprost reduced the number of PI-positive cells. The scale bar represents 100 μm .

2-2-8 統計学的解析

実験成績は平均値±標準誤差 (standard error of the mean: SEM) で示した。統計学的な比較は、JSTAT for windows (株式会社ベクター、Tokyo、Japan) または Statistical Package for the Social Science 15.0 J for Windows software (エス・ピーエス・エス株式会社、Tokyo、Japan) を用いて行った。2 群間の比較では F 検定後に Student's t-test を行った。多群間の比較では、one-way analysis of variance (ANOVA) 後に Dunnett's test を行った。危険率が 5%未満を有意差有りとした。

第3節 実験成績

3-1 酸化ストレスによる細胞死に対するラタノプロスト及びチモロール併用による保護効果

過酸化水素による酸化ストレス誘発神経細胞障害に対するラタノプロスト、チモロール、ラタノプロスト及びチモロール併用剤の細胞保護効果を検討した。チモロールもしくはラタノプロストの単剤は濃度依存的に酸化ストレスによって増加したPI陽性細胞を減少させた (Fig. 7)。

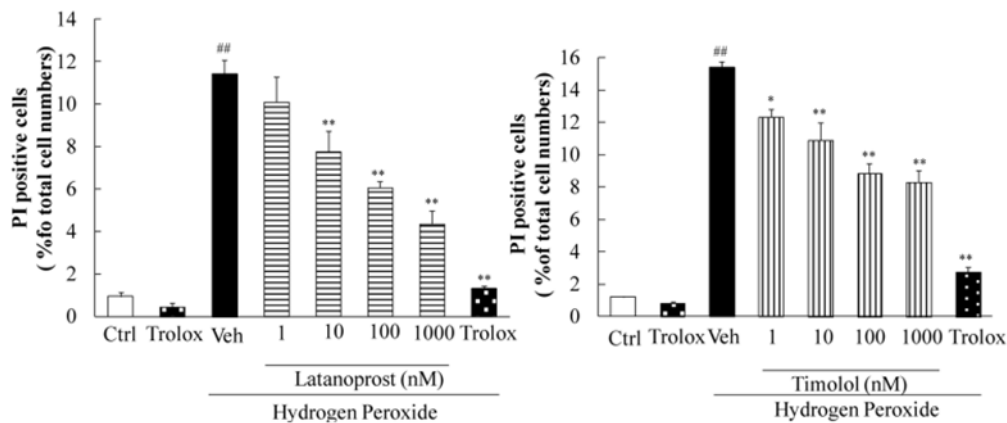


Fig. 7 Latanoprost/timolol in monotherapy exerts a protective effect on oxidative stress

Monotherapy with latanoprost or timolol reduced cell death induced by H₂O₂ in a concentration-dependent manner at concentrations above 10 nM. The data are expressed as the mean±S.E.M. (n=6).
^{##} $p < 0.01$ vs. Control alone; ^{*} $p < 0.05$, ^{**} $p < 0.01$ vs. Vehicle.

また 1 nM のラタノプロストは神経保護効果を示さなかったが、10-1000 nM のチモロールを併用することで、濃度依存的に PI 陽性細胞数を抑制することが明らかとなった。同様に、1 nM のチモロールと 1-1000 nM のラタノプロストを併用した場合も PI 陽性細胞数を抑制した (Fig. 8)。

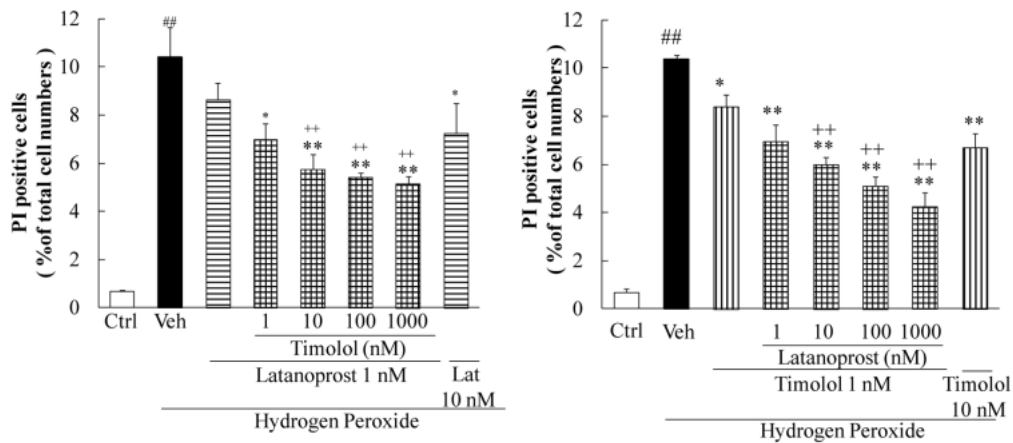


Fig. 8 Latanoprost/timolol in combination exerts a protective effect on oxidative stress

Latanoprost (1 nM) and timolol (1, 10, 100, and 1000 nM) in combination reduced cell death and the latanoprost/timolol combinations showed a stronger protective effect than monotherapy with latanoprost. Moreover, timolol (1 nM) and latanoprost (1, 10, 100, and 1000 nM) in combination also reduced cell death. The timolol/latanoprost combinations showed stronger protective effects than did monotherapy with timolol. The data are expressed as the mean±S.E.M. (n=6). ^{##} $p < 0.01$ vs. Control alone; ^{*} $p < 0.05$, ^{**} $p < 0.01$ vs. Vehicle; ⁺⁺ $p < 0.01$ vs. exposed to hydrogen peroxide and treated with 1 nM latanoprost or timolol.

3-2 ER ストレスによる細胞死に対するラタノプロスト及びチモロール併用による保護効果

ツニカマイシンによる ER ストレス誘発細胞障害に対するラタノプロスト、チモロール、ラタノプロスト/チモロール併用剤による細胞保護効果を検討した。チモロールもしくはラタノプロストは濃度依存的に ER ストレスによって増加した PI 陽性細胞を減少させた (Fig. 9)。

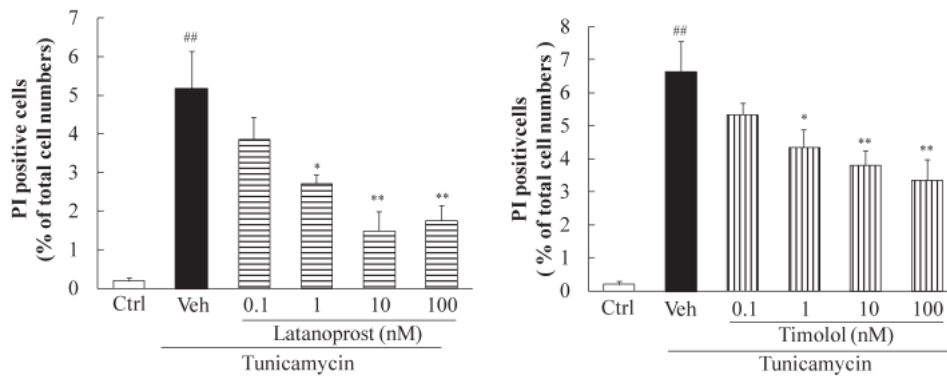


Fig. 9 Latanoprost/timolol in monotherapy exerts a protective effect on ER stress

Monotherapy with latanoprost at concentrations above 1.0 nM reduced the number of dead cells. Moreover, monotherapy with timolol at concentrations above 1.0 nM also reduced cell death. The data are expressed as the mean±S.E.M. (n=6). ^{##} $p < 0.01$ vs. Control alone; ^{*} $p < 0.05$, ^{**} $p < 0.01$ vs. Vehicle.

さらに 0.1 nM のラタノプロスト及びチモロールはともに単剤では有意な神経保護効果を示さなかったが、両者の併用により PI 陽性細胞数を抑制することが明らかとなった (Fig. 10)。

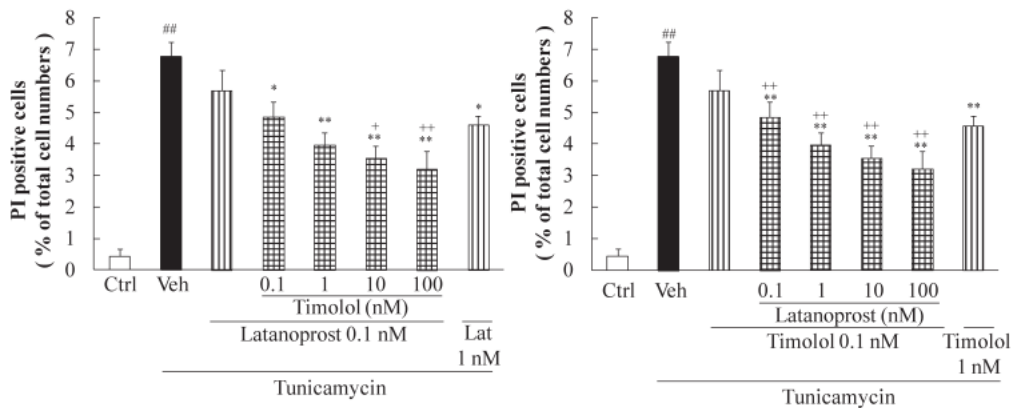


Fig. 10 Latanoprost/timolol in combination exerts a protective effect on ER stress

Latanoprost (1 nM) and timolol (1, 10, 100, and 1000 nM) in combination reduced cell death and the latanoprost/timolol combinations showed a stronger protective effect than monotherapy with latanoprost. Moreover, timolol (1 nM) and latanoprost (1, 10, 100, and 1000 nM) in combination also reduced cell death. The timolol/latanoprost combinations showed stronger protective effects than did monotherapy with timolol. The data are expressed as the mean±S.E.M. (n=6). ^{##} $p < 0.01$ vs. Control alone; ^{*} $p < 0.05$, ^{**} $p < 0.01$ vs. Vehicle; ⁺⁺ $p < 0.01$ vs. exposed to hydrogen peroxide and treated with 1 nM latanoprost or timolol.

3-3 血清除去ストレスによる細胞死に対するラタノプロスト及びチモロール併用による保護効果

血清除去による細胞障害に対するラタノプロスト、チモロール、ラタノプロスト及びチモロール併用による細胞保護効果を検討した。チモロールは濃度依存的に血清除去によって増加した PI 陽性細胞を減少させた一方で、ラタノプロスト単剤は神経保護効果を示さなかった (Fig. 11)。

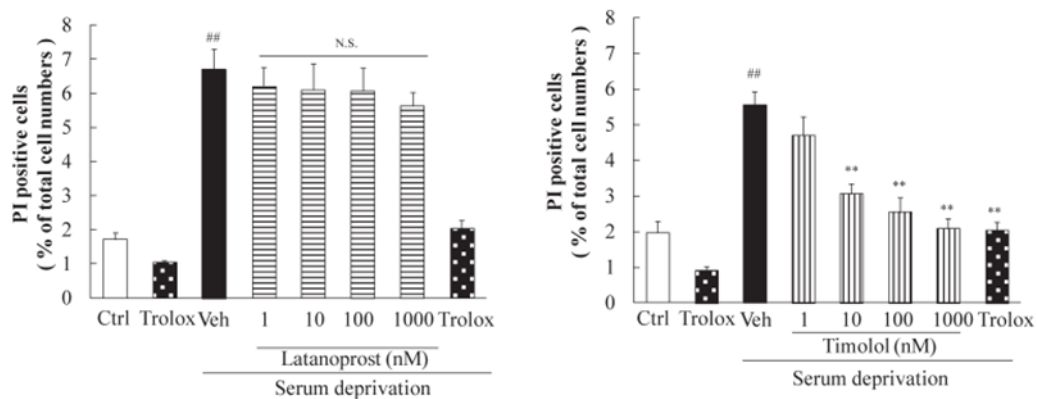


Fig. 11 Timolol but not latanoprost in monotherapy exerts a protective effect on serum deprivation

Monotherapy with latanoprost had no protective effect on cells exposed to serum deprivation. Moreover, monotherapy with timolol at concentrations above 1.0 nM reduced cell death. The data are expressed as the mean±S.E.M. (n=6). ## $p<0.01$ vs. Control alone; ** $p<0.01$ vs. Vehicle.

また 1 nM のチモロールも単剤では有意な神経保護効果を示さなかったが、1nM のチモロールと 1-1000 nM のラタノプロストを併用すると、ラタノプロストの濃度依存的に PI 陽性細胞数を抑制することが明らかとなった (Fig. 12)。

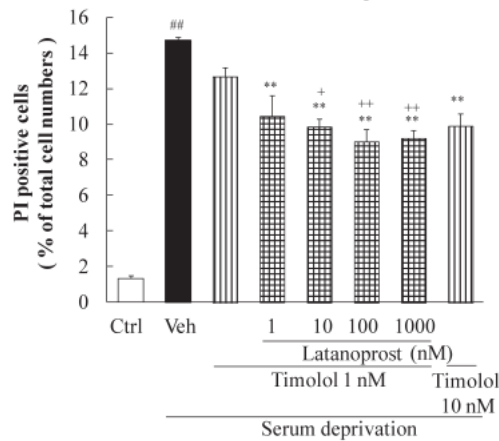


Fig. 12 Latanoprost/timolol in combination exerts a protective effect on ER stress

Timolol (1 nM) and latanoprost (1, 10, 100, and 1000 nM) in combination also reduced cell death and timolol (1 nM)/latanoprost (10, 100, and 1000 nM) showed a stronger protective effect than monotherapy with timolol. The data are expressed as the mean±S.E.M. (n=6). ## $p<0.01$ vs. Control alone; * $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs. Vehicle; ++ $p<0.01$ vs. exposed to hydrogen peroxide and treated with 1 nM latanoprost or timolol.

3-4 ラタノプロスト及びチモロール併用による神経保護作用に対する Akt 阻害剤の効果

ラタノプロスト及びチモロールの併用による血清除去ストレスに対する細胞保護効果は、protein kinase B (Akt) inhibitor である LY294002 の前処置により阻害された。BSO と glutamate を共処置すると抗酸化物質であるグルタチオンを枯渇させ、酸化ストレスを誘発することが知られているが、この BSO と glutamate の共処置による細胞障害に対しても、ラタノプロストとチモロールの併用処置が細胞保護効果を発揮した。またこの細胞保護効果は LY294002 の前処置によって阻害された (Fig. 13)。

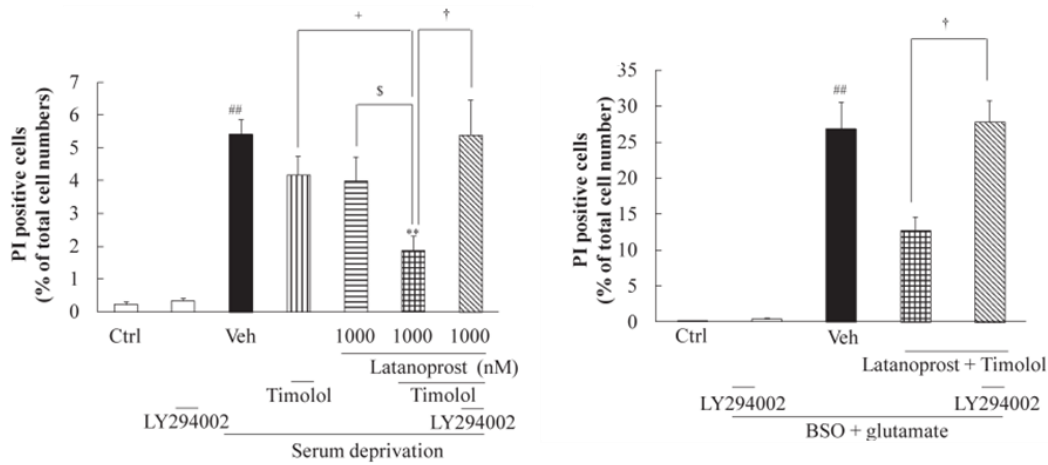


Fig. 13 LY294002 inhibited the protective effects of the latanoprost/timolol combination after serum deprivation or BSO plus glutamate

Latanoprost/timolol in combination reduced cell death and LY294002 inhibited the protective effect of the combination on serum deprivation. Moreover, latanoprost/timolol in combination reduced cell death and LY294002 inhibited the protective effect of the combination on BSO plus glutamate. The data are expressed as the mean±S.E.M. (n=6). ## $p < 0.01$ vs. Control alone, ** $p < 0.01$ vs. Vehicle; + $p < 0.05$ vs. serum deprived and treated by 1.0 nM timolol, § $p < 0.05$ vs. serum deprived and treated by 1000 nM latanoprost, † $p < 0.05$ vs. serum deprived and treated by 1 nM timolol and 1000 nM latanoprost combination or BSO plus glutamate and treated by 1.0 nM timolol and 1 nM latanoprost combination.

第4節 考察

本研究では、ラタノプロストとチモロール単剤及びそれらの併用が複数のストレスによる網膜神経細胞障害に対して保護作用を示すこと、また ER ストレスや血清除去ストレスに対しては単剤よりも高い神経保護作用を有することが示された (Table 3)。

Table 3 Summary of results

| | 酸化ストレス障害 | 小胞体ストレス障害 | 血清除去ストレス障害 |
|---------|----------|-----------|------------|
| ラタノプロスト | 保護作用あり | 保護作用あり | 保護作用なし |
| チモロール | 保護作用あり | 保護作用あり | 保護作用あり |
| 共処置 | 保護作用あり | 保護作用あり | 保護作用あり |

緑内障においては、酸化ストレス、ER ストレス、虚血ストレスなどのストレス負荷により RGC 障害が誘導されるが (13, 14, 21)、チモロールやラタノプロストは眼圧低下効果非依存的に、これらのストレスによる神経障害を抑制することが知られている (10)。本研究においても、酸化ストレス及び ER ストレスに対してはチモロール及びラタノプロストが、血清除去ストレスに対してはチモロールが保護作用を示すことが明らかとなった。酸化ストレスや ER ストレスによる細胞障害メカニズムの一つに Na^+ や Ca^{2+} の流入が関与していることが知られている (22, 23)。 β 遮断薬であるチモロールは Na^+ や Ca^{2+} の流入を阻害することが報告されており、イオンチャネルの阻害を介して神経細胞死を抑制していると考えられる (24)。またカルテロールやチモロールは視細胞株である 661W において BSO/glutamate 誘発の ROS 産生を抑制することも知られており、様々な経路を介して神経保護作用を発揮していると考えられる (25)。

ラタノプロストはプロスタグランジン $\text{F2}\alpha$ アナログであり、cyclooxygenase-2 の抑制や Akt 経路の活性化を介して神経保護作用を示すことが知られている (10, 26)。血清除去ストレスによる細胞死を、チモロールは有意に抑制した一方

で、ラタノプロストは保護効果を示さなかった。過去の論文では血清除去と同様に虚血状態を模した *in vitro* モデルである低酸素誘発細胞死をラタノプロストが抑制したことが報告されている (17)。この報告では血清を除いた培地に交換したのちに、酸素濃度を 5%まで下げることで細胞死を誘発している。血清除去ストレスに低酸素ストレスを加えた条件では、酸化ストレスや ER ストレスを含めた様々な経路を介して細胞死を誘導していることが想定され、ラタノプロストはそのうちのいくつかの経路を抑制することで低酸素障害を抑制していると考えられる。

血清除去ストレスに対してはラタノプロスト (1-1000 nM) またはチモロール (1 nM) の単独処置は保護効果を示さなかったが、チモロール (1 nM) とラタノプロスト (1-1000 nM) の併用処置は有意に血清除去ストレスによる細胞死を抑制した。また ER ストレスによる細胞障害に対しても、チモロール (0.1 nM) とラタノプロスト (0.1-100 nM) は単剤では保護効果を示さなかった一方で、両者の併用では細胞保護効果が認められた。これらの結果から、チモロールやラタノプロスト単剤と比べて配合点眼薬のほうが、血清除去ストレスや ER ストレスに対する網膜神経細胞障害に対してより高い保護効果を発揮することが示唆された。

先行研究において、PI3K/Akt 経路が緑内障モデルにおける RGC の生存に関与していることが報告されている (27,28)。また、ラタノプロストと同様のプロスタグランジン F_{2α} アナログであるビマトプロストは Akt の活性化を介して、網膜神経細胞死を抑制することが知られていることから (26)、チモロール及びラタノプロストの併用による細胞保護効果に対して Akt 経路が関与しているかを明らかにするための検討を実施した。PI3K の阻害剤である LY294002 をチモロール及びラタノプロストと共処置すると、チモロール及びラタノプロストによ

る網膜神経細胞保護効果が阻害されることが明らかとなった。これはラタノプロストによる Akt 経路活性化の抑制によるものであることが示唆された。

ラタノプロストは 10 nM から各種ストレスによる細胞死を有意に抑制しているが、ヒト硝子体液中の Cmax が 30-90 nM 程度であることから、ヒトにおいても細胞死の抑制が期待できる濃度のラタノプロストが曝露されていると考えられる (29)。またチモロールの硝子体液中の Cmax は rabbit で 8 μM、ブリモニジンとチモロールを併用投与した際のヒト硝子体液中の Cmax は 3 μM 程度である。チモロールについても 10 nM から各種ストレスに対する細胞障害を抑制することから、ヒトでの点眼でも細胞死抑制が期待できる濃度のチモロールが暴露されていると考えられる (30, 31)。

以上のことから、チモロールとラタノプロストは酸化ストレス及び ER ストレスに対する神経保護作用を有すること、またチモロールに関しては血清除去ストレスに対しても保護作用を有することを明らかにした。さらにチモロールとラタノプロストの併用は Akt/PI3K 経路の活性化を介して各種細胞ストレスに対する保護効果を示すだけでなく、とくに ER ストレスや血清除去ストレスに対しては単剤と比べて高い網膜神経細胞保護効果を示すことを明らかにした。正常眼圧緑内障などの眼圧の上昇を伴わない緑内障においては、何らかの要因で神経細胞障害が引き起こされていると想定され、このような患者に対してもチモロールとラタノプロストの配合点眼薬は有効性を発揮する可能性が期待された。

第2章 網膜静脈閉塞症マウスモデルの構築

第1節 緒言

RVO は、先進国では糖尿病網膜症に次いで罹患率の高い網膜血管障害による疾患であり、出血や浮腫を伴う視力低下を引き起こす (32)。網膜のいずれかの静脈が閉塞する網膜静脈分枝閉塞症 (branch retinal vein occlusion : BRVO) と視神経内の静脈が閉塞する網膜中心静脈閉塞症 (central retinal vein occlusion : CRVO) に分類される (Fig. 14)。

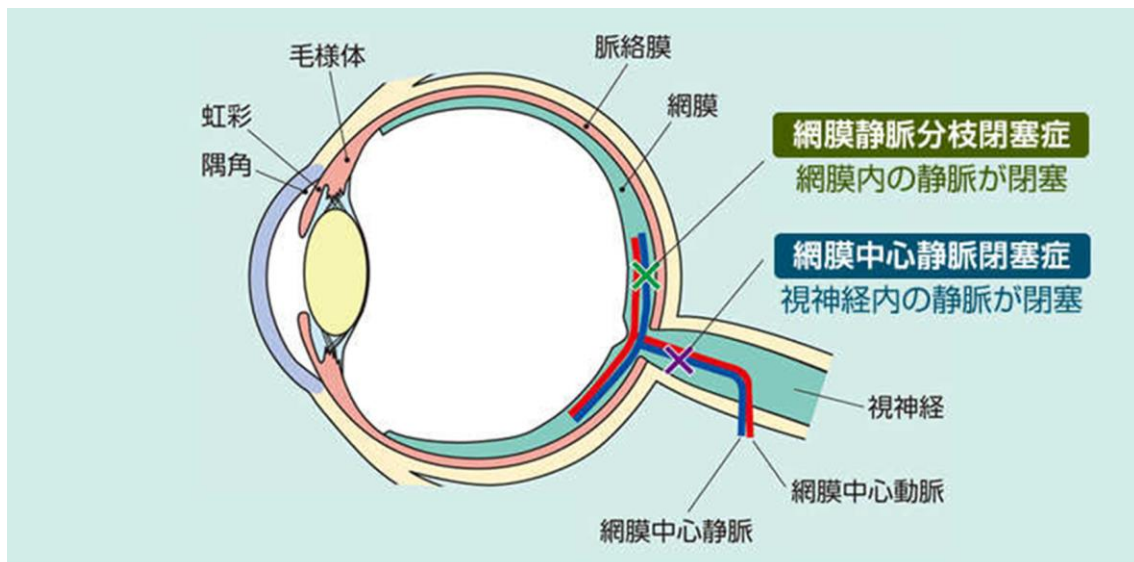


Fig. 14 Central and branch retinal vein occlusion

<https://www.healthcare.novartis.co.jp/moumaku/rvo-eye/disease/condition> より改変引用

BRVO は CRVO の約 5 倍の頻度で発生し、通常、動脈と静脈が交差する部位に発生する (33)。もともとはベバシズマブやラニビズマブなどの抗 VEGF 抗体が RVO 患者に対する適応外治療として使用されてきたが、アメリカ食品医薬品局 (FDA) は無作為化臨床試験のエビデンスに基づき、ラニビズマブの RVO に対する使用を承認した。しかし抗 VEGF 抗体による治療にはいくつかの課題がある。例えば、ベバシズマブやラニビズマブにかかる費用は高額であるにもかかわらず (34, 35)、治療効果が認められない、もしくは再発を経験する患者も存在

する。また抗 VEGF 抗体の投与は、RVO における重要な病態の一つである網膜無灌流領域 (nonperfusion area : NPA) の縮小 (36, 37) と拡大 (38, 39) の両方をもたらすという矛盾した報告があり、眼科医の間に混乱が生じている。そのため抗 VEGF 抗体の作用機序の解明や、VEGF 経路以外を標的とした新規治療法の探索が急務となっている。しかしながら RVO 患者に対する抗 VEGF 抗体の以外の新規治療薬の開発や、抗 VEGF 療法の作用機序の解明は進んでいない。この理由の一つは嚢胞性浮腫や NPA の形成といったの臨床症状に類似した特徴を示す RVO の動物モデルが存在していないことである。以下の 3 人の患者の光干渉断層計 (optical coherence tomography : OCT) 像において、網膜層に空洞様の構造が形成されている (Fig.13 B, D and F)。これは嚢胞状浮腫と呼ばれる所見であり、糖尿病網膜症、眼内炎症、RVO などの患者において、血液網膜関門が破壊されることで、内顆粒層 (inner nuclear layer : INL) に多く見られる浮腫の一種である (40, 41) (Fig. 15)。

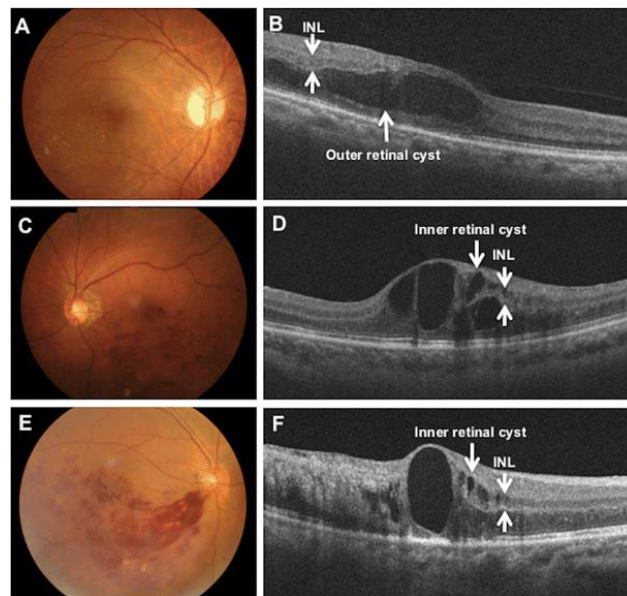


Fig. 15 Cystoid edema in retinal vein occlusion

Ocular images (A, C and D) and OCT images (B, D and F) of 3 BRVO patients. Long white arrow indicated cystoid edema. INL: inner nuclear layer. (42)より引用

また、NPA は網膜の毛細血管が閉塞することで血流が十分に行き渡っていない領域のことで、その大きさによって RVO は虚血性と非虚血性の 2 種類に分類される (43) 以下の BRVO 患者の蛍光眼底撮影像で示されるように、多くの RVO 患者では NPA だけでなく、血管新生、毛細血管拡張、微細動脈瘤といった血管の異常が認められる (Fig. 16)。

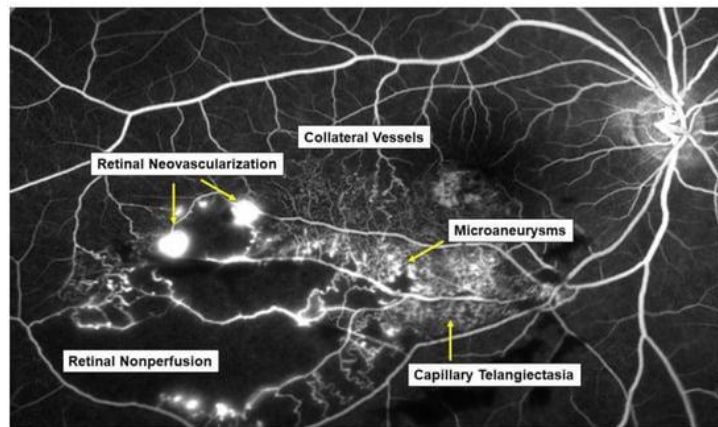


Fig. 16 Retinal nonperfusion area in retinal vein occlusion

Microvascular abnormalities such as retinal nonperfusion, reovascularization, collateral vessels, capillary telangiectasia and microaneurysms in a BRVO patient. (12)より引用

これまで RVO の動物モデルについてはいくつかの研究が報告されている (44, 45)。しかしこれらの動物モデルには重大な欠点がある。まず RVO の最も重要な症状の一つであり、視覚障害と強く関連する嚢胞性浮腫を示さないことである。重度の嚢胞性浮腫や慢性的な嚢胞性浮腫 (8 ヶ月以上) を有する患者は、タイトジャンクションの破壊に起因する不可逆的な視力低下を示し (46)、血管新生緑内障を伴う重度の病態を示す可能性が高くなる (47-49)。これまでの RVO の実験モデルで嚢胞性浮腫が形成されていないことは重要な課題である。従来の RVO モデルの二つ目の課題は、閉塞させた血管が自然に再疎通してしまい、治療的介入がなくとも網膜機能が改善したとの報告もある (50, 51)。RVO は慢性疾患であるにもかかわらず、急性の病態に対する影響しか検証することができ

ない従来のモデルは、新規治療薬候補を評価するのに適していない。3つ目の課題は動物の血管を閉塞させる際に使用するレーザーが血管閉塞非依存的に炎症を引き起こし、網膜浮腫を誘発する可能性ある点である。従来の RVO モデルではレーザー照射領域において網膜外層の破壊と視細胞への障害が見られる。このように、これまでの RVO 実験モデルには多くの制約があり、RVO の発症メカニズムの解明や新規治療法の発見には至っていない。

本研究の目的は、臨床症状を模倣した RVO マウスモデルを確立し、RVO の発症メカニズムを明らかにするとともに、抗 VEGF 抗体が浮腫と NPA に及ぼす影響を評価することである。

第2節 実験材料及び方法

2-1 実験材料

生理食塩液は大塚製薬株式会社 (Tokushima, Japan)、protease inhibitor cocktail、phosphatase inhibitor cocktail 2、phosphatase inhibitor cocktail 3、mouse monoclonal anti- β -actin antibody (Catalog # A2228)、fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated dextran (分子量: 2×10^6) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)、タンパク質定量キット (BCA Protein Assay Kit)、牛血清アルブミン (bovine serum albumin: BSA)、hoechst 33342 は Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)、sample buffer solution (2-メルカプトエタノール含有) (x4)、2-メルカプトエタノール、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル [sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel]、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、デオキシコール酸ナトリウム、イムノスター[®]LD、パラホルムアルデヒド (paraformaldehyde: PFA)、メタノール、塩化カリウム (potassium chloride: KCl)、ローズベンガル、グリシン、6-アミノヘキサ酸、塩酸は富士フィルム和光純薬株式会社 (Osaka, Japan)、 KH_2PO_4 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、Blocking One-P はナカライテスク株式会社 (Kyoto, Japan)、NaCl はキシダ化学株式会社 (Osaka, Japan)、ケタミンは第一三共株式会社 (Tokyo, Japan)、キシラジンはバイエル薬品株式会社 (Osaka, Japan)、フルオロマウントは Diagnostic Bio Systems (Pleasanton, CA, USA)、goat polyclonal anti-mouse VEGF₁₆₄ antibody (Catalog # AF-493-NA) は R&D systems (Minneapolis, MN, USA)、ミドリン[®]P 点眼液 (0.5% トロピカミド及び 0.5% フェニレフリン塩酸塩)、ヒアレイン[®]点眼液 0.1% (精製ヒアルロン酸ナトリウム)、クラビット[®]点眼液 0.5% (レボフロキサシン水和物) は参天製薬株式会社 (Osaka, Japan)、can get signal solution 1、can get signal solution 2 は東洋紡株式会社 (Osaka, Japan)、Triton X-100、Tween 20 Solution、トリスは Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)、トリス

緩衝生理用食塩水 (Tris-buffered saline: TBS) はタカラバイオ株式会社 (Shiga, Japan)、スコピゾルは千寿製薬株式会社 (Osaka, Japan)よりそれぞれ購入した。PBS は、蒸留水にそれぞれ 136.9 mM NaCl、2.68 mM KCl、8.10 mM Na₂HPO₄ · 12H₂O、1.47 mM KH₂PO₄ となるよう調製した。Phosphate buffer (PB) は、蒸留水に 0.2 M NaH₂PO₄ · 2H₂O、0.2 M Na₂HPO₄ · 12H₂O となるよう調製した。

2-2 実験方法

2-2-1 実験動物

ddY マウス (8 週齢、雄) は日本エスエルシー株式会社 (Hamamatsu, Japan) より購入した。マウスはプラスチック製ケージ (縦 24.5 × 横 17.5 × 高さ 12.5 cm) において、自由給水下で固形飼料 (CE-2; 日本クレア株式会社、Tokyo, Japan) により飼育した。またマウスは設定温度: 24 ± 2°C、設定湿度: 55 ± 15%、明暗各 12 時間 (照明: 午前 8 時~午後 8 時) に維持された岐阜薬科大学 6 階動物飼育室で飼育した。実験動物の取り扱いは Association for Research in Vision and Ophthalmology で決められたガイドラインを遵守して実施し、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 マウス網膜静脈閉塞症モデルの作製

マウスにケタミン (120 mg/kg) とキシラジン (6 mg/kg) を混合し、その後、生理食塩液で 10 倍希釈した混合液を大腿筋肉内へ投与 (10 mL/kg) することで麻酔を施した。ローズベンガル (20 mg/kg) を尾静脈内に投与し、ミドリン®点眼液 5 µL で散瞳させたマウス右眼の静脈に対してレーザーを照射することで網膜静脈を閉塞させた。ローズベンガルは、光感受性色素であり、特定波長の光照射に

よって産生された活性酸素種が血管内皮を障害、血小板主体の血栓を引き起こす。レーザー照射は眼底撮影装置である Micron IV (Phoenix Research labs、Pleasanton、CA、USA) にレーザー照射装置 (MERIDIANAG、Bierigutstrasse、Switzerland) を実施した。マウス右眼の静脈に対して、視神経乳頭から 3 乳頭径離れた位置に、1 静脈当たり 10-15 回レーザーを照射した (波長; 532 nm、レーザー出力; 50 mW、照射時間; 5 s、スポットサイズ; 50 μm)。静脈は 1 眼につき 3 本閉塞させた。(Fig. 17A)。

2-2-3 網膜断層撮影

OCT は Micron IV に設置可能な 830 nm 網膜断層撮影装置 (Phoenix Research labs) を用いた。2-2-2 の手順に従ってマウス網膜静脈閉塞症モデルを作製し、血管閉塞から 1、3、7、14、30、90 そして 180 日後に、1 眼につき 20 ヶ所網膜層断層像を撮影した。撮影した OCT 画像は専用定量ソフト「In Sight」(Phoenix Research labs) を用いて、自動に網膜層を検出しその厚さを定量した。この定量ソフトで撮影した 20 枚の網膜層の厚さを定量し、20 枚の厚さの平均をその個体の網膜層厚とした。

2-2-4 網膜電図 (Electroretinogram : ERG)

網膜電図は血管閉塞から 1、3、7、14、30 日後に測定を行った。測定 24 時間前からマウスを完全な暗室で暗順応させたのちに、ケタミン 120 mg/kg 及びキシラジン 6 mg/kg の混合麻酔液を腹腔内投与した。同時にミドリン[®]P 点眼液を 5 μL 点眼し散瞳させ、不関電極 (Nihon Kohden, Tokyo, Japan) を口腔に、接地電極 (Nihon Kohden) を臀部に設置し、角膜に関電極として白色 LED 電極 (Mayo, Aichi, Japan) を接触させてフラッシュ ERG を測定した。測定は各個体、以下の

条件で行った。

1. $-2.91 \log \text{cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ の刺激光で測定
2. 30 秒間の暗順応の後に $-1.92 \log \text{cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ で測定
3. 1 分間の暗順応の後に $-1.02 \log \text{cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ で測定
4. 1 分間の暗順応の後に $-0.02 \log \text{cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ で測定
5. 2 分間の暗順応の後に $0.98 \log \text{cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ で測定

また ERG 測定中は、マウスの体温を 37°C に保温した。得られた ERG 波形から a 波及び b 波の振幅を測定した。振幅はそれぞれ、a 波では基線から a 波の頂点までを、b 波では a 波の頂点から b 波の頂点までを測定した。

2-2-5 組織評価

2-2-5-1 網膜層の組織切片作製

血管閉塞から 1,3 及び 7 日後に、マウス眼球を摘出した。摘出した眼球に $2 \mu\text{L}$ の 4% PFA 含有 0.1 M PB ($\text{pH } 7.4$) を硝子体内に投与し、同液にて 48 時間 4°C で固定した。次に以下の順番で各溶液に眼球を浸透させた。

1. 70% エタノール 2 時間
2. 90% エタノール 1 時間
3. 無水エタノール 1 時間×5 回
4. キシレン 1 時間×3 回
5. 融解パラフィン 4.5 時間

パラフィンで包埋した眼球はマイクロトーム (株式会社ライカ) を用いて薄切化した (厚さ $5 \mu\text{m}$)。切片はカバーガラス (松波硝子工業株式会社) にのせ 37°C で 1 日乾燥し、その後は室温にて保存した。

2-2-5-2 ヘマトキシリン・エオジン染色を用いた組織障害評価

2-2-5-1 で作成したパラフィン切片は、キシレンでパラフィンを洗浄したのちに、アルコール及び蒸留水に浸透させた。次にヘマトキシリン液、Define MX 溶液、Blue Buffer 8 溶液、エオジン液で浸透させ、最後にキシレンで透徹しオイキットを用いて封入した。染色した切片は HS オールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-9000: 株式会社キーエンス、Osaka、Japan) を使用して撮影した。

2-2-5-3 網膜組織障害評価

網膜障害の評価は 2-2-5-2 で作成した標本を用いた。各個体につき 3 切片をランダムに抽出し、視神経乳頭中心から 240 μm 間隔で INL あるいは網膜外顆粒層 (outer nuclear layer : ONL) の厚みを Image J (NIH、Bethesda、MD、USA; <http://rsbweb.nih.gov/ij/>) を使用して測定した。

2-2-6 レーザースペckルを用いた血流測定法

レーザースペckル血流計 (LSFG-ANM; ソフトケア有限会社、Fukuoka、Japan) を用いて、視神経乳頭付近における眼内の血流を測定した。移動速度を表す mean blur rate (MBR) の値を指標に血流を測定した。本装置は 1 秒間につき 30 枚の画像を撮影でき、今回は 4 秒間撮影を行った平均値をその個体の血流とした。血管閉塞させたマウスの右眼をミドリン®P 点眼液で散瞳させたのちに、眼内血流量を測定した。撮影した画像はソフトウェア (Laser speckle imaging system、Omegazone; オメガウェーブ株式会社、Tokyo、Japan) を用いて自動定量した。血管部の血流量を示す血管血流値は MBR of the vascular area (MV) で、組織部の血流量を示す組織血流値は MBR of the tissue area (MT) で、網膜全領域の血流量を示す全血流値は MBR of the total area (MA) として数値化された。

2-2-7 定量的 RT-PCR (qRT-PCR) 法による解析

2-2-7-1 RNA 抽出

マウスの眼球を摘出し、網膜を単離した。単離した網膜は 1.5 mL チューブの中に入れ、液体窒素により急速凍結した。サンプルは RNA 抽出まで -80 °C 条件下で保管した。RNA の抽出には、NucleoSpin® RNA (タカラバイオ株式会社) を用いた。サンプルは氷上で 350 μ L の Buffer RA1 を加え、ホモジナイズした。その後、タンパク質除去用のシリカメンブランカラムに移し、11,000 $\times g$ で 1 分間遠心した。ろ液に 350 μ L の 70% エタノールを加えた後に、RNA 吸着用のシリカメンブランカラムに移し、11,000 $\times g$ で 30 秒間遠心分離した。新しいチューブに RNA を吸着させたカラムを移し、350 μ L の脱塩用溶液 MDB buffer を加え、11,000 $\times g$ で 1 分間遠心分離した。次に 90 μ L の Reaction buffer for rDNase と 10 μ L rDNase の希釈溶液の混合液を加え、室温でインキュベートした。15 分後に 200 μ L の Buffer RAW2 を加え、11,000 $\times g$ で 30 秒間遠心分離した。新しいチューブに交換し、700 μ L の Buffer RAW3 を加え、11,000 $\times g$ で 30 秒間遠心分離した。さらに、再度回収用チューブを交換し、250 μ L の Buffer RAW3 を加え、11,000 $\times g$ で 2 分間遠心した。最後に、回収用の新しいチューブにカラムをセットし、60 μ L の RNase-free H₂O を加え、11,000 $\times g$ で 1 分間遠心分離し、RNA 抽出液を回収した。

2-2-7-2 RNA 逆転写

抽出した RNA 濃度は 260 nm 波長の分光測定から求めた。測定は Nano Vue Plus (GE Healthcare Bio-Sciences AB、Uppsala、Sweden) を用いた。測定結果に基づいて、各サンプルの RNA 濃度が等しくなるよう RNase-free H₂O で調製した。

次に Prime Script RT reagent Kit (タカラバイオ株式会社) を用いて RNA 逆転写を行った。抽出した 6.5 μ L の RNA に 2 μ L の 5 \times Prime Script Buffer、0.5 μ L の Prime Script RT Enzyme Mix I、0.5 μ L の Oligo dT Primer (50 μ M)、0.5 μ L の Random 6 mers (100 μ M) を加え、混合した。次に混合液を Takara PCR Thermal Cycler Dice[®] Gradient (タカラバイオ株式会社) で、37 $^{\circ}$ C で 15 分間の逆転写反応、続いて 85 $^{\circ}$ C で 5 秒間の逆転写酵素失活反応を行い、cDNA を作製した

2-2-7-3 定量的 RT-PCR (qRT-PCR) 法

qRT-PCR 法には、SYBR[®] Premix EX TaqII (Ti RNaseH Plus) (タカラバイオ株式会社) を用いた。メーカーのマニュアルに則り、SYBR[®] Premix EX TaqII (Tli RNaseH Plus)、各プライマー、RNase-free H₂O 及び cDNA 溶液を加え、全量を 20 μ L に調製した。その後、Thermal Cycler Dice Real Time System (タカラバイオ株式会社) を用いて PCR 反応を行った。2 ステップ (95 $^{\circ}$ C で 5 分間、60 $^{\circ}$ C で 30 秒間) を 40 サイクルの PCR 反応によりそれぞれ検出した。使用したプライマーの配列を以下に示す。

Vegfa

Forward, 5'-ACATTGGCTCACTTCCAGAAACAC-3'

Reverse, 5'-GGTTGGAACCGGCATCTTTATC-3'

Il6

Forward, 5'- TCTGCAAGAGACTTCCATCCAGT -3'

Reverse, 5'-TCTGCAACTGCATCATCGTTGT-3'

Mcp-1

Forward, 5'-CTGAAGCCAGCTCTCTTCCT-3'

Reverse, 5'-CAGGCCCAAGAAGCATGACA-3'

Icam1

Forward, 5'-CGCTGTGCTTTGAGAACTGTG-3'

Reverse, 5'-ATACACGGTGATGGTAGCGGA-3'

Pdgfa

Forward, 5'-GTCCAGGTGAGGTTAGAGG-3'

Reverse, 5'-CACGGAGGAGAACAAAGAC-3'

Aqp4

Forward, 5'-GAGTATGTCTTCTGTCCTG-3'

Reverse, 5'-ACGGTCAATGTCAATCAC-3'

Gapdh

Forward, 5' -TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3'

Reverse, 5' -TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-3'

すべての反応は *Gapdh* による内部補正を行った後、その平均値を用いた。

2-2-8 網膜伸展標本の免疫染色

血管を閉塞させたマウスの尾静脈に PBS で溶解した 20 mg/mL FITC-dextran 溶液 (分子量: 2×10^6) を 1 mL 投与した。投与から 5 分後、マウスの眼球を摘出した。摘出した眼球は 4% PFA 含有 0.1M PB (pH 7.4) 液中で 7 時間固定したのちに、角膜及び水晶体を切除し、4% PFA 含有 0.1 M PB (pH 7.4) で 1 時間固定した。その後、網膜を単離し、単離した網膜を四分円に切った。

その後、フルオロマウントとカバーガラスを用いて封入した後、Metamorph (Universal Imaging Corp., Downingtown, PA, USA) にて撮影を行った。無灌流領域の面積は ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて測定し

た。

2-2-9 VEGF 抗体の投与

硝子体内投与には、34 G のナノパスニードル (テルモ株式会社、Tokyo、Japan) を微細チューブの先に装着し、そのチューブ内に抗マウス VEGF₁₆₄ ポリクローナル抗体 (AF-493-NA, 200 µg/mL; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を充填した。逆側のチューブにはハミルトンシリンジを装着した投与針を装着した。マウスにケタミン (120 mg/kg) とキシラジン (6 mg/kg) を混合し、その後、生理食塩液で 10 倍希釈した混合液を大腿筋肉内へ投与 (10 mL/kg) することで麻酔を施した。その後、角膜輪部から後眼部側に針を刺し、200 µg/mL 抗マウス VEGF 抗体を 2 µL 投与した。焼死体内投与後は炎症の予防のために、クラビット®点眼液 0.5% を 5 µL 点眼した。vehicle 群へは PBS を硝子体内に投与した。硝子体内投与は、血管閉塞直後もしくは 7 日後に実施した。

2-2-10 統計学的解析

実験成績は平均値±SEM で示した。統計学的な比較は、JSTAT for windows (株式会社ベクター、Tokyo、Japan) または Statistical Package for the Social Science 15.0 J for Windows software (エス・ピーエス・エス株式会社、Tokyo、Japan) を用いて行った。2 群間の比較では F 検定後に Student's t-test を行った。多群間の比較では、one-way ANOVA 後に Dunnett's test もしくは Tukey's test を行った。危険率が 5%未満を有意差有りとした。

第3節 実験成績

3-1 マウス網膜静脈閉塞症モデルにおける網膜浮腫と網膜出血

網膜血管系と網膜層の経時変化を MicronIV と OCT で観察した。マウスの網膜静脈にレーザーを照射することで、血管が閉塞されることを確認した (Fig. 17A)。この血管閉塞により網膜浮腫と出血が引き起こされ、それぞれの発生率はそれぞれ 65.8% 及び 60.9% であった (Fig. 17B,C)。閉塞 1 日後には網膜の肥厚化を認め、網膜神経線維層 (retinal nerve fiber layer : RNFL) には嚢胞様の浮腫を認めた (Fig. 17D)。網膜の肥厚化と嚢胞様浮腫は 3 日目まで観察された。次に網膜の厚さの時間変化を調べるため、網膜の厚さを定量化した。網膜の厚さは閉塞後 1 日で劇的に増加し、時間の経過とともに徐々に回復した。7 日目には網膜の厚さは血管閉塞前に観察された厚さに戻った (Fig. 17E)。血管を閉塞させた網膜の大部分 (90%) で白い斑点や反射性の点が観察され、これらは閉塞 30 日後に主に外網状層 (outer plexiform layer : OPL) に存在し、3 日目に浮腫が観察された部分と同じであった (Fig. 17G)。さらに、多糖類や脂質の染色に多用される過ヨウ素産シッフ (periodic acid Schiff; PAS) 染色を実施したところ、PAS 染色陽性の沈着物が INL と OPL に確認された (Fig. 17H)。

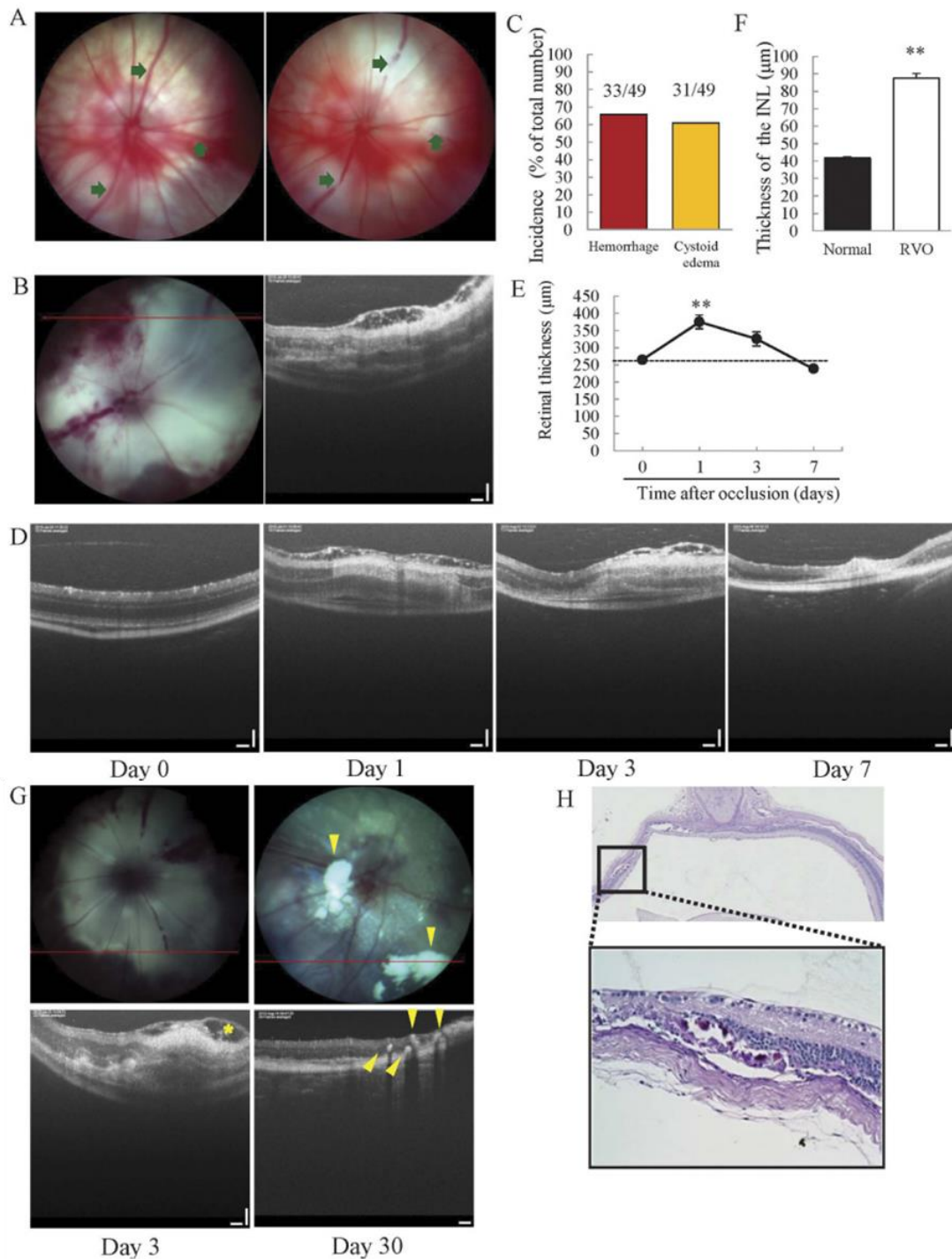


Fig. 17 Both retinal haemorrhage and cystoid edema were observed in the experimental mouse model of RVO.

(A) Images of a non-laser irradiated retina (left) and a retina after laser irradiation (right). The arrows indicate occluded sites. (B) Fundus photography image (left) and OCT image (right), taken 3 days after photocoagulation. Haemorrhage and cystoid edema were observed (n=49). (C) The incidences of haemorrhage and cystoid edema were 65.8% and 60.9%, respectively. (D) OCT images taken 0, 1,

3, and 7 days after photocoagulation. Cystoid edema was observed on days 1 and 3. (E) The plot below illustrates quantitative retinal thickness data. Retinal thickness was significantly increased on day 1 compared to day 0 and gradually recovered over the course of the experiment. Data are expressed as means±S.E.M (n=4–7). ^{##}*P*<0.01 vs. day 0 (Dunnett's test). (F) Quantitative analysis of INL thickness 1 day after occlusion. INL thickness was significantly increased 1 day after occlusion. Data are expressed as means±S.E.M (n=4–7). ^{##}*P*<0.01 vs. day 0 (Student's t-test). (G) RVO mice have white flecks (fundus photography) and hyper-reflective dots (OCT) in the INL and OPL. Hyper-reflective dots were present in the same areas where severe edema developed. Arrow head indicates hard exudates. (H) PAS-positive deposits were located in the INL and OPL. Scale bar represents 50µm.

3-2 網膜浮腫の局在

網膜浮腫の網膜層における局在を明らかにするために、H&E 染色した ONL と INL の厚さを定量化した。血管閉塞された網膜では、INL の厚さが閉塞 1 日後に著しく増加し、3 日目には改善した (Fig. 18A、B)。7 日目には、INL の厚さは無処置のマウスに比べ減少していた。一方、ONL は 1 日目と 3 日目は厚さに変化はなく、7 日目に厚さが減少した (Fig. 18C)。さらに、1 日目には RNFL、INL、OPL に嚢胞様浮腫が観察されたが、3 日目と 7 日目には見られなかった (Fig. 16A、アスタリスク)。さらに、網膜剥離は閉塞 1 日後に約 90%の動物で観察された (Fig. 18A 矢印、Fig. 18D)。

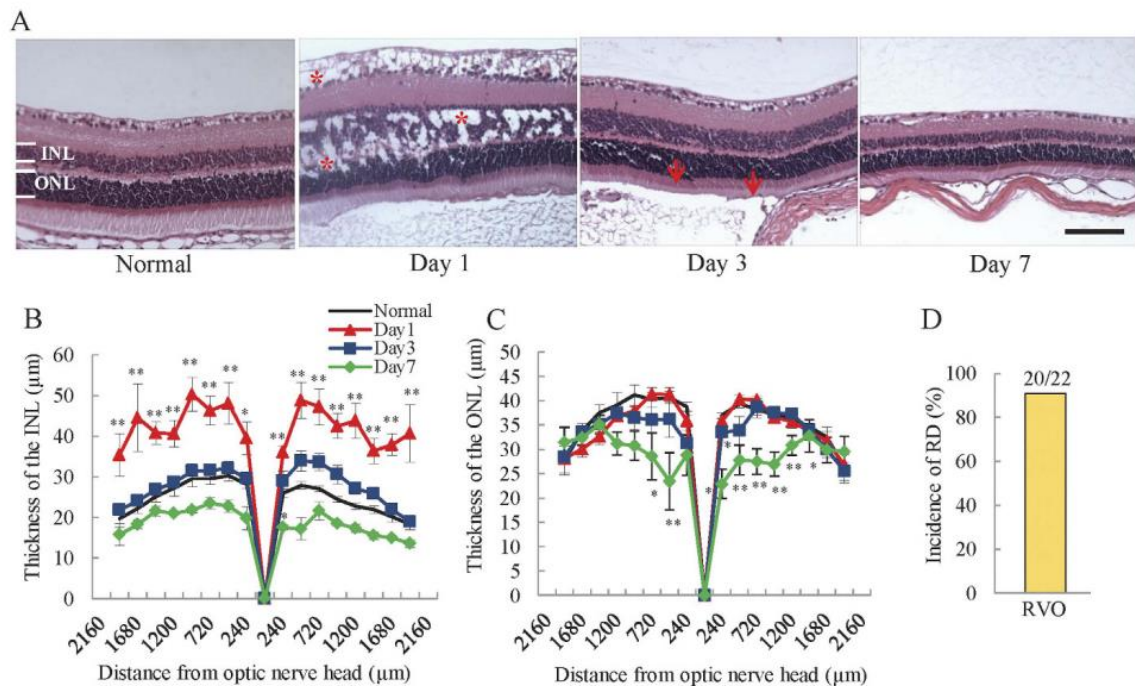


Fig. 18 Edema was located mainly in the inner layer of the retina.

Representative images of H&E stained retinas. Asterisk (*) indicates cystoid edema. Scale bar=50μm. Cystoid edema was observed 1day after photocoagulation in the INL and ONL. Plots below illustrate quantitative INL (B) and ONL (C) thickness data. The thickness of the INL was dramatically increased 1day after occlusion, gradually recovering in a time dependent manner. ONL thickness was significantly decreased on day 7, and there was no change on days 1 and 3. The data are expressed as means±S.E.M. (n=3–7). $###P < 0.01$, $#P < 0.05$ vs. untreated control (Dunnett's test). INL; inner nuclear layer; ONL; outer nuclear layer. (D) The incidence of retinal detachment (arrow) was approximately 90.9% (20/22).

3-3 視機能評価

RVO モデルにおける視機能を調べるために、ERG を血管閉塞から 1、3、7、14、30 日目に実施した。各時点で a 波、b 波ともに無処置マウスに比べ著しく振幅が減少したが、7 日目以降は徐々に回復した (Fig. 18A)。特に、a 波は 7 日目と比較して 14 日目と 30 日目に統計的に有意な増加を示し、b 波は 1、3、7 日目と比較して 30 日目に有意な増加を示した (Fig. 18B)。網膜内層 (b 波) と外層 (a 波) の機能を比較するために、網膜内層機能障害の指標である b/a 波の振幅比

を算出したところ、無処置マウスと比較して 1 日目と 3 日目に有意に減少し (Fig.19C) 30 日目までには徐々に正常範囲に戻った。

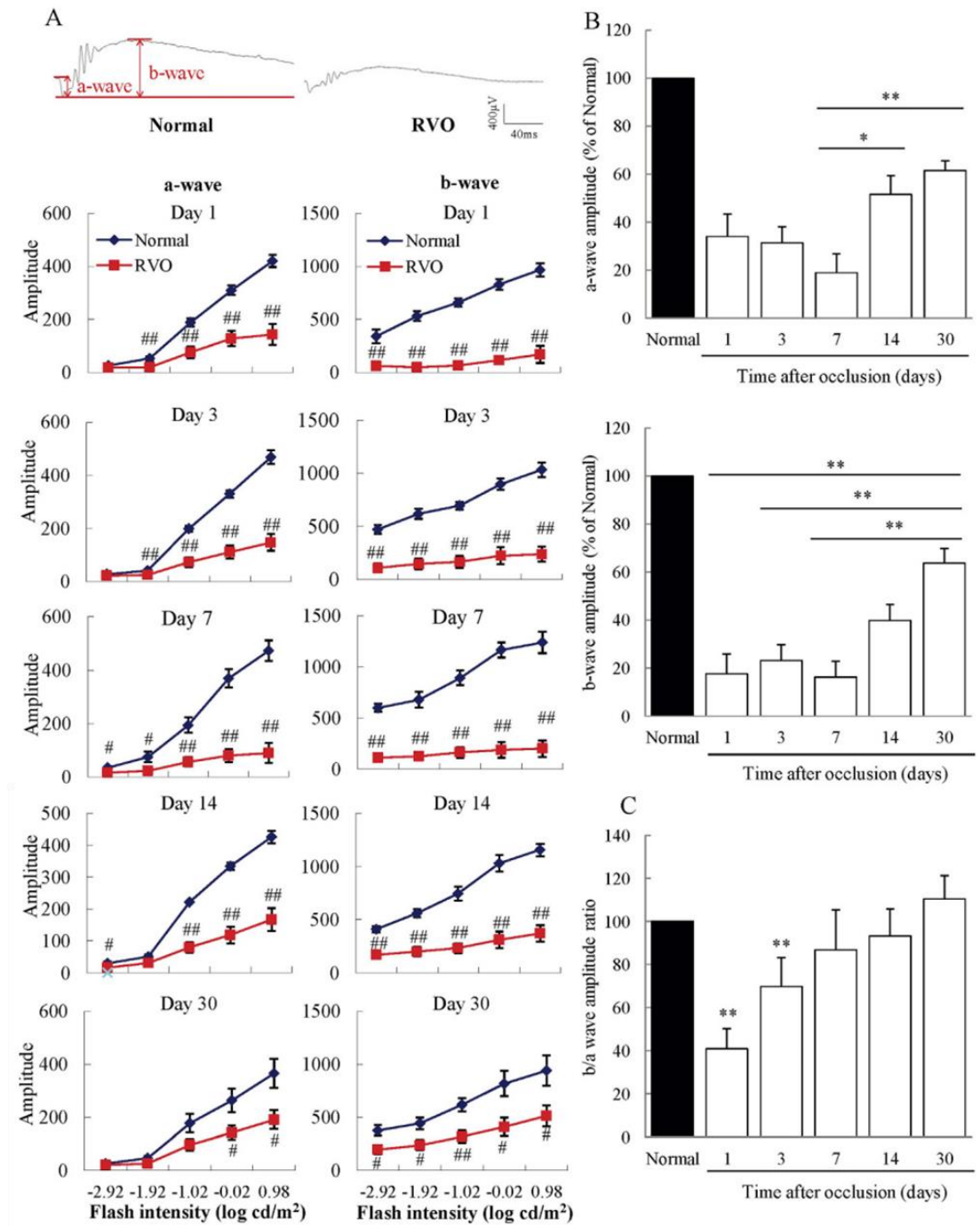


Fig. 19 Significantly decreased b/a wave amplitude ratios in the RVO model.

(A) From days 1 to 30, both the a- and b-waves were dramatically decreased in RVO mice compared to untreated controls. Data are expressed as means±S.E.M. (n=3–7). ## P <0.01, # P <0.05 vs. untreated

controls (Student's t-test). (B) The decreased a-wave amplitude recovered significantly on days 14 and 30, compared to those on day 7. Moreover, the reduced b-wave amplitude recovered on day 30 compared to days 1, 3, and 7. Data are expressed as means±S.E.M. ** $P<0.01$, * $P<0.05$ (one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc comparison test). (C) The b/a wave amplitude ratio was significantly decreased on days 1 and 3 compared to untreated controls. The decreased b/a wave ratio recovered gradually and returned to a normal level by day 30. Data are expressed as means±S.E.M. ** $P<0.01$, * $P<0.05$ vs. untreated controls (Student's t-test).

3-4 無灌流領域の評価

RVO の病態の一つである NPA が形成されることを確認するために、RVO マウスの網膜のフラットマウントを作成し、NPA を可視化及び定量化した。無処置のマウスでは NPA は観察されなかったが、RVO マウスの網膜では 1、3、7、30 日目に NPA が観察された (Fig. 20A)。ImageJ ソフトウェアを用いて網膜全体に占める NPA の大きさを定量化したところ、1 日目は網膜の 20.8%を占め、3 日目には 16.3%に徐々に減少した。7 日目、30 日目それぞれ 8.9%、9.4%であり、1 日目と比較して有意に減少した (Fig. 20B)。

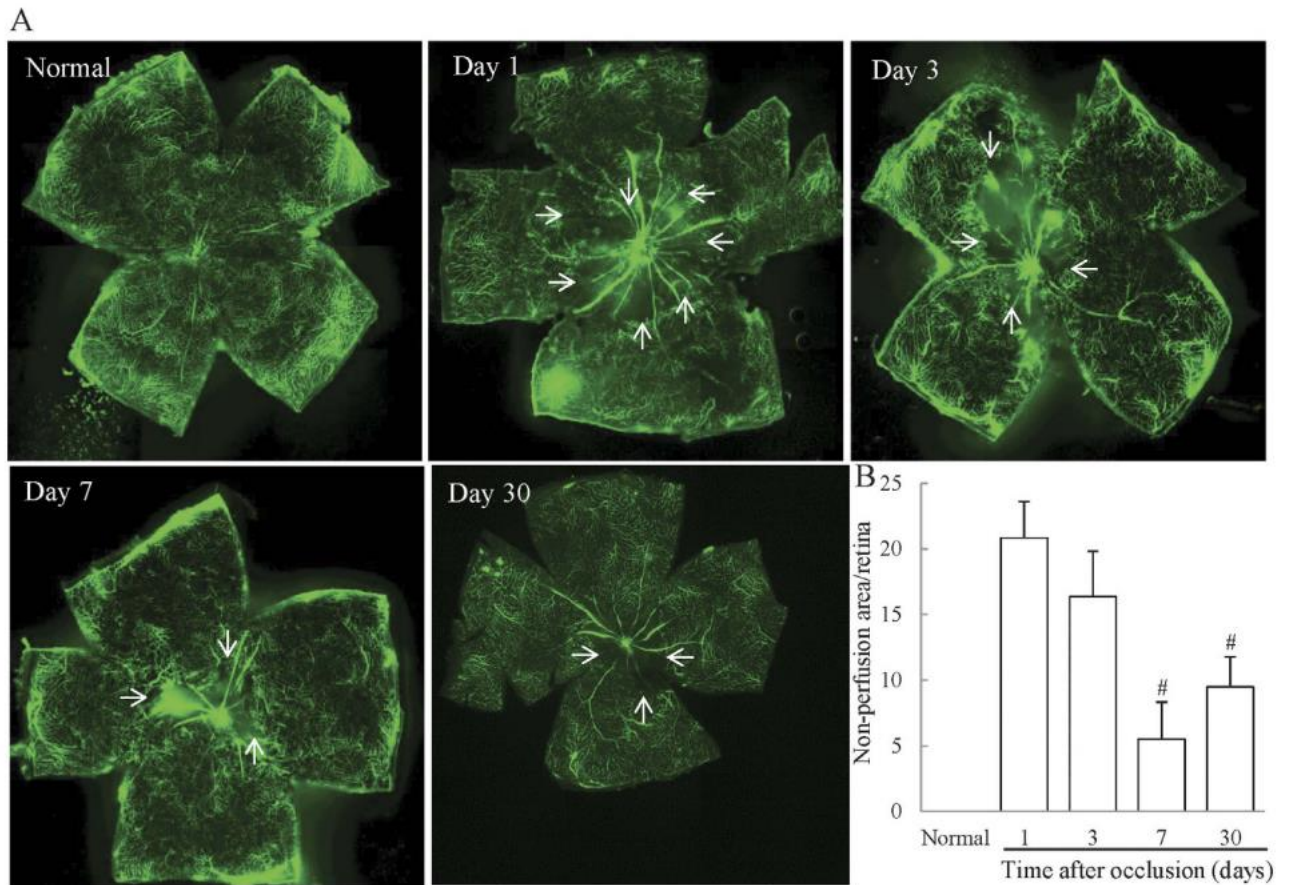


Fig. 20 Retinal nonperfusion in the RVO model mouse.

Representative images of flat-mounted retinas in untreated and RVO mice on days 1, 3, 7, and 30. Arrows=boundary of non-perfused area (B) Evaluation of the area of retinal nonperfusion using ImageJ software, demonstrating the development of retinal nonperfusion on days 1, 3, 7, and 30 after occlusion. The nonperfused areas on days 7 and 30 were significantly reduced compared to those on day1. Data are expressed as means±S.E.M. (n=4–6). * $P < 0.05$ vs RVO mice on day1 (one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc comparison test).

3-4 網膜血流の評価

RVO モデルにおける網膜血流量が変化しているか明らかにするために、レーザー-speckleを用いた血流評価を実施した。閉塞直後の血流は軽微な減少であったが、血管閉塞から1、3、7、14、30日目の網膜血流は血管閉塞前と比べて有意に減少した (Fig. 21)。

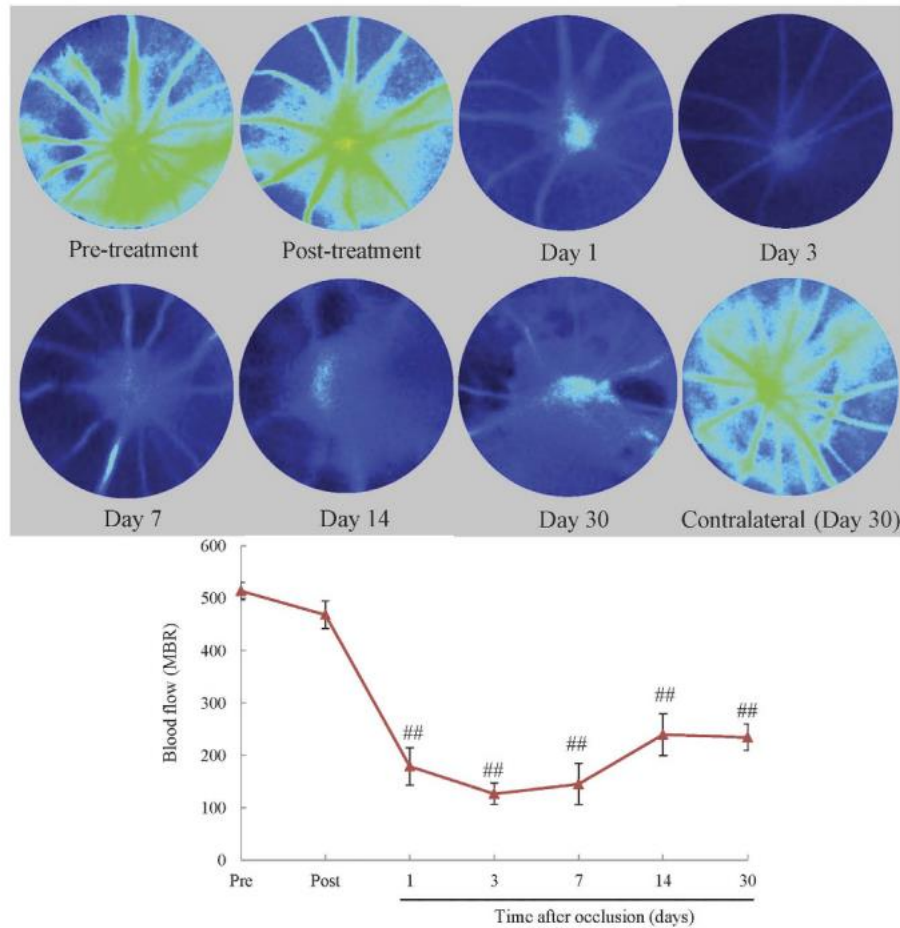


Fig. 21 The reduction of blood flow persisted until day 30.

Blood flow was measured by LSFG before and immediately after occlusion, and on days 1, 3, 7, 14, and 30 to verify the duration of the reduction of blood flow. Blood flow was significantly reduced compared to the pre-treatment group 1, 3, 7, 14, and 30 days after occlusion. The data are expressed as means±S.E.M. (n=5-8). ^{##}*P*<0.01 vs pre-treatment group (Dunnett's test).

3-5 遺伝子発現変化

血管閉塞されたマウス網膜において、RVO患者で変化が認められている VEGFA や aquaporin 4 (aqp4)、炎症性マーカーである interleukin-6 (IL-6)、intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), monocyte chemotactic protein 1(MCP-1), platelet derived growth factor subunit A (PDGFA)といった遺伝子の発現が変化していることを確認するために、RT-PCRを実施した。*Vegfa* 及び *Il6* の発現は血管閉塞から 12 時間後に無処置マウスと比較して増加したが、3 日目及び 7 日目では

統計的に有意な増加は認められなかった (Fig. 22A, B)。 *Icam1* の発現は、血管閉塞から 1、3、7 日目に顕著に増加した (Fig. 22C)。 *Mcp-1* の発現は、12 時間後と 1 日後に無処置のマウスと比較して増加したが、12 時間後では統計的に有意な差はなかった (Fig. 22D)。 *Pdgfa* の発現は血管閉塞の 3 日後に無処置の対照と比較して増加した (Fig. 22E)。 *Aqp4* の発現は閉塞 1 日後に有意に減少したが、7 日後には未処置のコントロールと比較して発現が増加した (Fig. 22F)。

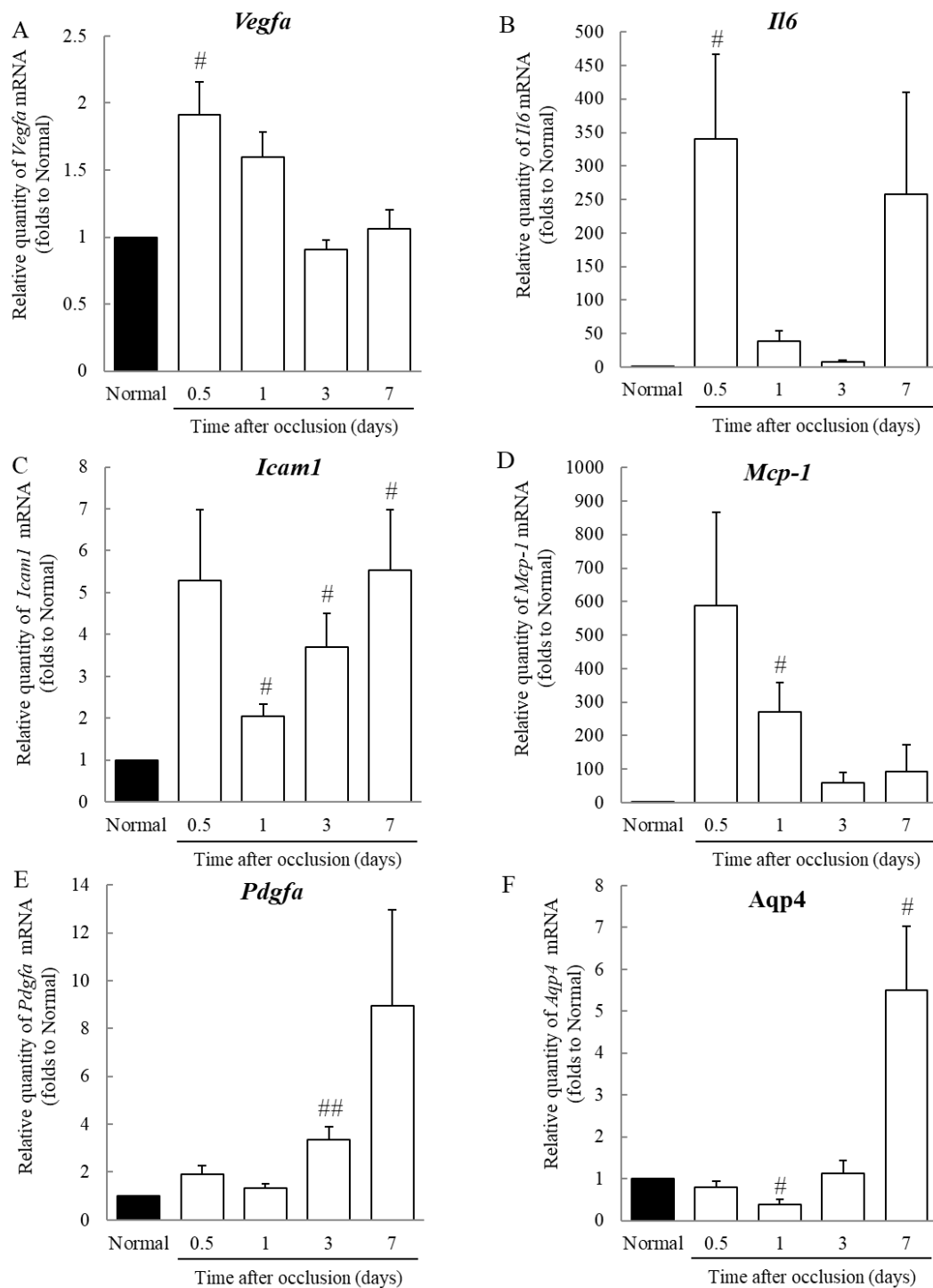


Fig. 22 Expression of retinal vein occlusion-related genes in the RVO model.

The expression of RVO related and inflammatory genes were evaluated by real-time PCR analysis 0.5 (12h), 1, 3, and 7 days after occlusion and in untreated mice. (A) The expression level of *Vegfa* mRNA was significantly increased 12h after occlusion, but unchanged compared to untreated mice after 3 and 7 days. (B) The expression level of *Il6* mRNA was remarkably increased 12h after occlusion. On days

1, 3 and 7, there was no statistically significant difference in expression levels compared to untreated controls. (C) The expression level of *Icam1* mRNA was significantly augmented on days 1, 3, and 7. (D) The expression level of *Mcp-1* was remarkably increased, to approximately 260 times that of untreated controls. Twelve hours after photocoagulation, the difference was not statistically significant. (E) The expression level of *Pdgfa* mRNA was increased to three times or more that of untreated mice. (F) The expression level of *Aqp4* was decreased on day 1; however, it was increased to approximately five times that of untreated mice by day 7. Data are expressed as means±S.E.M. (n=3–5). ^{##}*P*<0.01, [#]*P*<0.05 vs. Normal (Student's *t*-test).

3-5 抗 VEGF 抗体 の 浮腫 に対する 作用

RVO 患者 に対して 標準的 に 使用 されて いる 抗 VEGF 抗体 の 有効性 を RVO マウス モデル で 確認 する ため に、 抗 マウス VEGF 抗体 が RVO モデル における INL の 厚み の 増加 を 改善 できる か どう か を 検討 した。 血管 閉塞 直後 の 抗 VEGF 抗体 の 硝子 体内 投与 は、 RVO マウス の INL の 厚さ を 減少 させ、 嚢胞 様 浮腫 を 減少 させた。 一方、 抗 VEGF 抗体 は ONL の 厚さ には 影響 を 与え なか った (Fig. 23)。

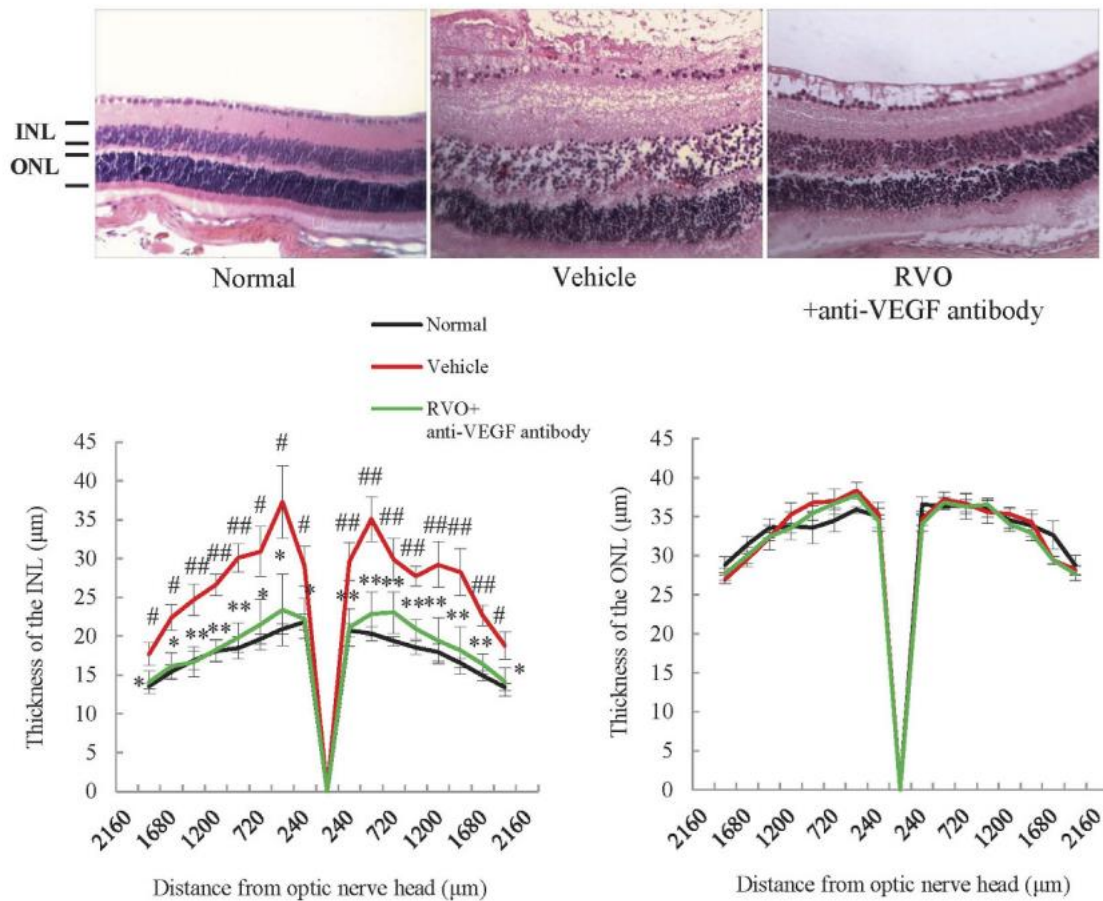


Fig. 23 Anti-VEGF antibody ameliorated cystoid and swelling edema in the INL.

Representative images of H&E-stained retinas from untreated, RVO, and RVO+anti-VEGF antibody treated groups on day 1. Plots below illustrate quantitative INL and ONL thickness data. The thickness of the INL was dramatically increased 1 day after occlusion and this was prevented by the treatment with anti-VEGF antibody. ONL thickness was not changed by laser irradiation or treatment with anti-VEGF antibody. Data are expressed as means±S.E.M. (n=4–5). * $P < 0.05$ (one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc comparison test).

3-6 抗 VEGF 抗体が無灌流領域に対する作用

抗 VEGF 抗体が NPA に対する効果を明らかにするために、フラットマウントを用いた検証を行った。抗 VEGF 抗体を血管閉塞直後に硝子体内投与すると、投与から 1 日後及び 7 日後に NPA の面積が有意に減少した (Fig. 24A-C)。一方、血管閉塞から 7 日後に抗 VEGF 抗体を投与すると、投与から 1 日後に NPA が広

大し、投与から7日後には vehicle 群と同程度まで縮小した (Fig. 24D-F)。

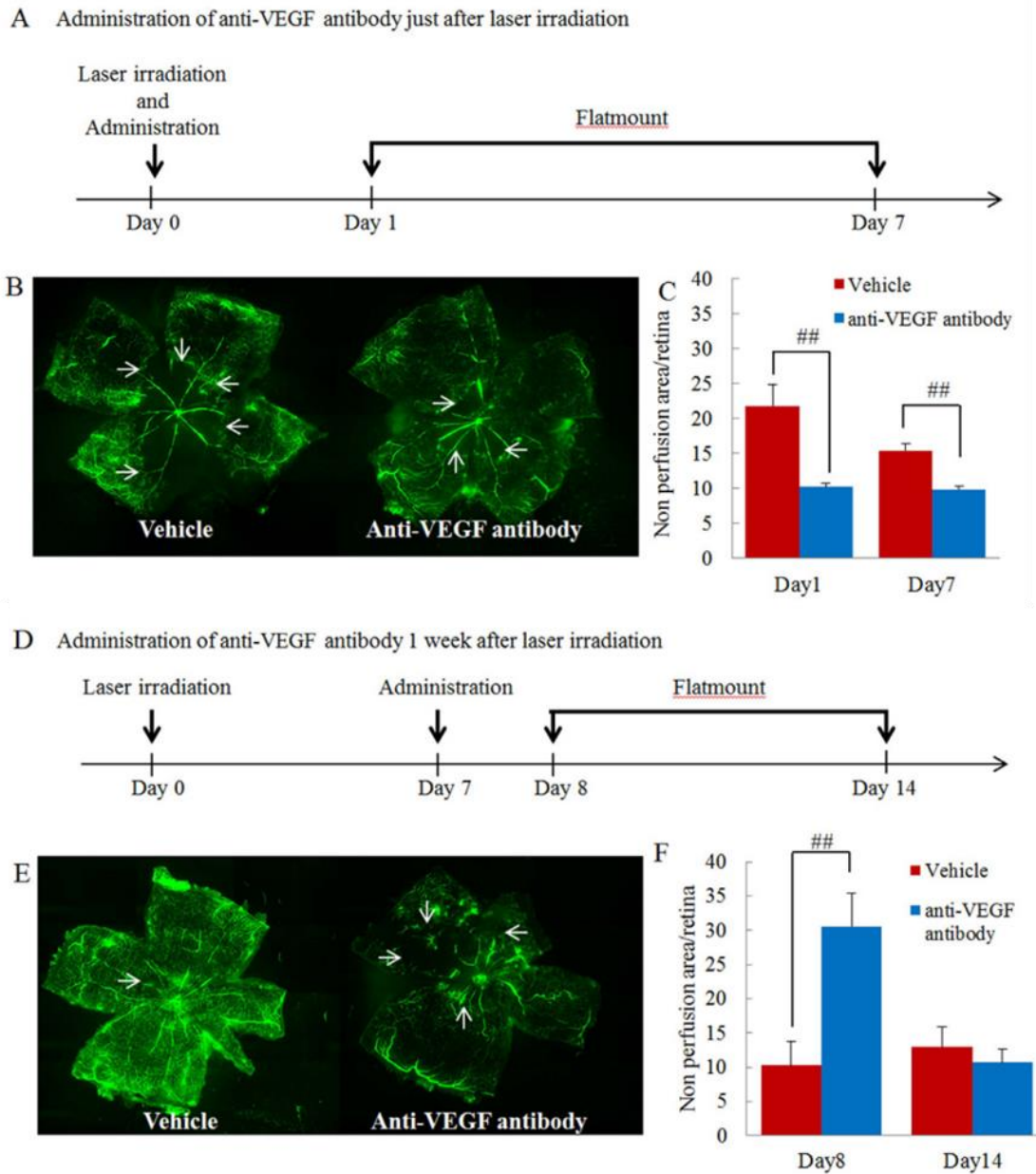


Fig. 24 Anti-VEGF antibody prevented progression of retinal nonperfusion when administered in the early phase after occlusion but aggravated nonperfusion when administered in the late phase.

(A) Protocol of early phase administration. Anti-VEGF antibody was intravitreally administered immediately after occlusion. Sampling was performed 1 and 7 days after administration. (B) Representative images of flat-mounted retinas (vehicle and anti-VEGF antibody treated groups). (C) Illustration of quantitative retinal nonperfusion area data. Nonperfused areas were reduced 1 and 7

days after occlusion. Data are expressed as means±S.E.M. (n=4–8). ^{##}*P* <0.01 (Student's t-test). (D) Protocol of late phase administration. Anti-VEGF antibody was administrated intravitreally 7 days after occlusion. Sampling was performed 1 and 7 days after administration. (E) Representative images of flat-mounted retinas (vehicle and anti-VEGF antibody treated groups). (F) Quantitative illustration of retinal nonperfusion area data. The nonperfusion area was increased by anti-VEGF antibody 1 day after administration but was unchanged 7 days after administration. Data are expressed as means±S.E.M. (n=4–5). ^{##}*P* <0.01 (Student's t-test)

第4節 考察

新しく構築した RVO モデルマウスでは嚢胞様浮腫、網膜出血、NPA といった臨床病態を反映し、標準的治療薬である抗 VEGF 抗体が病態を改善することを明らかにした。

網膜出血は糖尿病網膜症や RVO などの慢性網膜疾患において、血液網膜関門の破綻による血管透過性亢進によって形成されることが知られており、RVO における最も重要な症状の一つである (52–54)。また本モデルで RNFL、INL、OPL に嚢胞様浮腫が観察されたが、臨床でも主に OPL 及び網膜内層の INL に存在していることが知られており、本モデルと臨床病態の類似性が示唆された。しかし、今回使用したマウスにはヒトにおいて嚢胞様浮腫の主要な形成部位である黄斑が存在しない。このことはマウスモデルの重大な欠点であり、より患者に近いモデルを確立するためには、黄斑を有する霊長類を用いることが重要である。本モデルでは嚢胞様浮腫だけでなく、INL の肥厚化も認められた。これまでの報告では、浮腫の形成に *Aqp4* の発現の変化が関与していることが示されている (55, 56)。アクアポリンは、膜貫通型の水チャネルであり、浸透圧による細胞内液の移動により水分子を双方向に通過させる (57)。虚血などの病態では、AQP4 の発現変動により細胞内に K^+ イオンが蓄積し、細胞外空間と Müller 細胞間の浸透圧勾配が変化し、その結果、網膜の肥厚化が起こると考えられる (57, 58)。AQP4 ノックアウトマウスでは血液脳関門の障害を介して脳浮腫が悪化することが報告されている。RVO モデルでは、浮腫の形成と *Aqp4* の発現低下が共に観察されており、網膜浮腫の形成、もしくは維持に AQP4 が関与している可能性がある (59)。

また ERG を用いて視機能を評価したところ、b/a 波の振幅比率が減少していることが明らかとなった。a 波は網膜外層に局在する視細胞の機能に、b 波は内

層に局在する双極細胞の機能に由来すると考えられていることから、b/a 波の振幅比率の低下は網膜内層機能障害の指標として臨床でも使用されている。RVO モデルにおいて血管閉塞から 1 及び 3 日目で、b/a 波の振幅比率は低下し、時間経過とともに b 波の増加により正常範囲へと戻っていった。7 日目で振幅比率が正常マウスと同程度まで改善しているのは、7 日目において b 波の低下が維持されている状態で、a 波がさらに低下しているためである。a 波の低下は外層に局在する視細胞の機能低下を示唆しており、網膜外層の ONL は血管閉塞から 7 日目に正常より薄くなっていることにも一致する。RVO モデルにおいて、RGC や血管内皮細胞の細胞死が誘導されることが知られているが (60)、視細胞死に関する報告はない。しかしながら低酸素障害は視細胞のアポトーシスを誘導することが知られており、RVO において視細胞保護は有効な治療ターゲットとなる可能性がある。

RVO 患者で認められる NPA は黄斑浮腫の重症度と強い相関があることが知られており、重要な所見の一つである (61, 62)。この重要な病態が RVO モデルでも再現できているかを明らかにするために、網膜フラットマウントを用いて NPA の面積を評価した。その結果、閉塞 1 日後から NPA は形成され、時間の経過とともにその面積が減少することがわかった。これは網膜の肥厚化の時間変化と同様であった。また RVO 患者における NPA の大きさと黄斑浮腫の重症度は、VEGF と IL-6 の発現量と相関することが分かっているが、RVO モデルにおいても *Vegfa* と *Il6* の発現は閉塞 1 日後に正常眼と比較して顕著に増加し、浮腫や NPA と同様に時間依存的に減少していった。*Il-6* などの炎症性サイトカインの遺伝子発現は sham 群 (血管以外の部分にレーザーを照射したマウス) において変化しないことが確認できており、*Vegfa* や *Il-6* は血管閉塞によって増加したと想定される。

これまでの非臨床モデルでは RVO が慢性疾患であるにもかかわらず、血管閉塞から 3 から 7 日以内の急性期の病態のみが検討されてきた (44, 45)。そこで眼底及び網膜層の長期観察を行ったところ、本モデルでは、30 日目に INL と OPL に高反射性の白斑が観察された。RVO 患者ではしばしば網膜血管から漏出したリポ蛋白などから構成される硬性白斑が観察され、PAS 染色で識別される。本実験モデルでは、INL 及び OPL において、PAS 染色が陽性の沈着物が観察され、硬性白斑様の沈着物が形成されていることが示唆された。また NPA も 30 日後まで維持されており、本モデルは医薬品候補化合物の複数回投与の有効性検証などにも活用可能である。

本モデルと従来のモデルとの主な相違点は、(1) 使用するマウスの系統と (2) 血管閉塞に用いた光増感剤の 2 点である。これまでの研究では、C57BL/6J や Balb/c マウス系統が使用されてきた (63, 64)。これらの系統を用いて RVO モデルの作製を試みたが、浮腫などの特徴を有するモデルを確立することはできなかった。またフルオレセイン注入により RVO モデルを樹立した報告があるが、フルオレセインを用いた場合、照射 3 日後に閉塞した血管が自然に開通してしまっていた。また、別の報告ではローズベンガルを用いていたが、今回用いた濃度より低い濃度のローズベンガルであり、その濃度では血管閉塞が維持されないことを確認している。以上のことから、慢性病態を示す RVO モデルを作製するためには使用するマウスの系統、光増感剤の種類や濃度が重要であると考えられる。

本モデルの予測妥当性を明らかにするために、RVO の標準的治療薬である抗 VEGF 抗体の病態に対する有効性を検証した。過去の報告では RVO 動物モデルの検証や浮腫が VEGF 経路を介して誘導されるかどうかを調べるために、抗マウス VEGF 抗体を使用した報告は過去にない。ヒトで使用されている

bevacizumab の有効性を検証した非臨床報告はあるが、ヒト化抗ヒト抗体であり、マウスの VEGF に交差するかは不明である (45, 65, 66)。想定通り、抗マウス VEGF 抗体の投与により浮腫の発生が抑制されたことから、本実験モデルは、VEGF 経路を介した浮腫の発生など、臨床で観察されるものと同様の特徴を有することが示された。

さらに、抗 VEGF 抗体の閉塞後早期投与は NPA を改善したが、閉塞から 7 日時点での投与は NPA を増大させることが明らかとなった。閉塞から 1 日目までは血管透過性を増加させる VEGF の発現が増加しており、この VEGF を抑制することで NPA の増大を抑制していると考えられる。一方、血管閉塞から 7 日後では VEGF の発現は Naïve マウスと同程度まで減少しており、この状態で VEGF を抑制してしまうと、VEGF によって調節される nitric oxide (NO) を過剰に減少させてしまう可能性がある。NO は血管拡張に寄与する分子であり、過剰な抑制により血管収縮を引き起こし、結果として NPA を増大させてしまう可能性がある。実際に血管閉塞から 7 日後に抗 VEGF 抗体を投与すると、NO の産生酵素である endothelial NO synthase (eNOS) の活性が正常マウスより劇的に減少することが分かっている (67)。実際の臨床でも RVO 患者における抗 VEGF 抗体は標準的に使用される一方で、投与により病態が悪化する患者も存在する (36–39)。投与時の VEGF 量を測定することは、抗 VEGF 治療の治療効果を予測するうえで重要かもしれない。通常 VEGF 量は硝子体液を用いて測定するため侵襲性が高いが、近年糖尿病網膜症や RVO 患者の涙液で VEGF が増加することが知られており、涙液の VEGF 濃度を測定することが有用なバイオマーカーとなる可能性がある (68)。

第 2 章では、RVO モデルを確立し、嚢胞様浮腫、網膜出血、NPA、硬性白斑など、RVO の臨床症状をより忠実に反映していることを明らかにした。本モデ

ルは新たな RVO 治療薬を探索するのに活用できると考えている。さらに本研究では、抗 VEGF 抗体の NPA に対する治療効果の違いが、投与タイミングもしくは VEGF の増加の有無が影響していることが示唆されたが、抗 VEGF 抗体が発揮する相反する効果のメカニズムを解明するためにはさらなる検討が必要である。

第3章 網膜静脈閉塞症モデルにおける緑内障治療薬の薬効検討

第1節 緒言

第2章で述べたようにRVOの治療には抗VEGF抗体であるラニズマブが使用されている。ラニズマブは網膜浮腫を軽減することで視力を改善するが、月に1回程度の硝子体内投与が必要であり、また侵襲性の高い治療法である(35)。網膜剥離、眼内炎、白内障形成、高血圧、黄斑下出血などの副作用を軽減しつつ、治療効果を得るためには、患者は複数回の投与を必要とする(69–71)。このように抗VEGF療法は侵襲性が高く、治療の継続が簡単ではない治療法にもかかわらず、50%以上のRVO患者では有効性を示めさないことが報告されている(72)。そのため点眼薬のように侵襲性が低く、治療が継続しやすいRVO治療法の開発が求められている。

そこで第1章で虚血ストレスに対する網膜細胞障害に対して保護作用を示した2つの抗緑内障点眼薬、すなわちラタノプロストとチモロールに着目した。ラタノプロスト点眼薬は、プロスタグランジンF_{2α}のアナログで、緑内障治療の第一選択薬として多用されており、ヒトでの安全性が確認されている。また糖尿病網膜症のマウスモデルにおいて、PI3k/Akt経路を介したペリサイト減少に対する保護作用を示すことが報告されている(73)。ペリサイトの消失はRVOにおいても認められ、血管透過性の亢進を介して網膜浮腫の形成に寄与する可能性が示唆されている(74, 75)。したがって、ペリサイトの減少を防ぐラタノプロストは、網膜浮腫を改善する可能性があると考えた。

もう一つの点眼薬であるチモロールは、非選択的なβ遮断薬である。β-アドレナリン受容体はVEGFの発現や血管透過性を制御することが知られている(76)。チモロールと同じくβ-アドレナリン受容体阻害作用のあるプロプラノロールは狭心症や高血圧の管理に使用されているが、虚血性網膜障害の動物モデルにお

いて VEGF の誘導を抑制することが報告されている (77,78)。また、低酸素ストレスによって VEGF の誘導が病態形成に起因する未熟児網膜症患者においても、プロプラノロールの有効性が確認されている (79)。これらの報告から、VEGF が病態形成に関わっている RVO の網膜浮腫に対して、 β 遮断薬であるチモロールが有効である可能性があると考えた。そこで、第 2 章で構築した RVO マウスモデルを用いて網膜浮腫に対するラタノプロスト及びチモロール点眼薬の効果を検討した。

第2節 実験材料及び方法

2-1 実験材料

0.5% チモロールマレイン酸塩点眼薬、0.005% ラタノプロスト点眼薬、及び点眼基剤は日東メディック株式会社 (Toyama, Japan) から供与していただいた。生理食塩液は大塚製薬株式会社 (Tokushima, Japan)、BSA、hoechst 33342、Alexa Fluor-546 donkey anti-rabbit IgG は Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)、PFA、メタノール、KCl、PBS、ローズベンガル、グリシン、6-アミノヘキサミン酸、塩酸は富士フィルム和光純薬株式会社 (Osaka, Japan)、 KH_2PO_4 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ はナカライテスク株式会社 (Kyoto, Japan)、NaCl はキシダ化学株式会社 (Osaka, Japan)、ケタミンは第一三共株式会社 (Tokyo, Japan)、キシラジンはバイエル薬品株式会社 (Osaka, Japan)、フルオロマウントは Diagnostic Bio Systems (Pleasanton, CA, USA)、integrated stress response inhibitor (ISRIB) は Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA)、ATF4 rabbit monoclonal antibody は Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)、horse serum は Vector Laboratories (Burlington, VT, USA)、初代ヒト網膜微小血管内皮細胞 (Primary human retinal microvascular endothelial cells : HRMECs) 及び CultureBoost-R は Cell Systems (Kirkland, WA, USA)、streptomycin 及び penicillin は Meiji Seika Pharma 株式会社 (Tokyo, Japan)、ミドリン[®]P 点眼液 (0.5% トロピカミド及び0.5% フェニレフリン塩酸塩)、ヒアレイン[®]点眼液 0.1% (精製ヒアルロン酸ナトリウム)、クラビット[®]点眼液 0.5% (レボフロキサシン水和物) は参天製薬株式会社 (Osaka, Japan)、Triton X-100、Tween 20 Solution、トリスは Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)、TBS はタカラバイオ株式会社 (Shiga, Japan)、スコピゾルは千寿製薬株式会社 (Osaka, Japan)よりそれぞれ購入した。PBS は、蒸留水にそれぞれ 136.9 mM NaCl、2.68 mM KCl、8.10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、1.47 mM KH_2PO_4 となるよ

う調製した。PB は、蒸留水に 0.2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ と
なるよう調製した。

2-2 実験方法

2-2-1 実験動物

ddY マウス (8 週齢、雄) は日本エスエルシー株式会社より購入し、第 2 章
2-2-1 の手順と同様に飼育した。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 マウス網膜静脈閉塞症モデルの作製

第 2 章 2-2-2 の手順に従って、マウス網膜静脈閉塞症モデルを作製した。

2-2-3 薬物投与

0.5% チモロールマレイン酸塩点眼薬、0.005% ラタノプロスト点眼薬、及び
点眼基剤は、レーザー照射直後、3、6、12 及び 18 時間後に 5 μL 点眼投与した。
ISRIB (9 ng) はレーザー照射直後に硝子体に 2 μL 注入した。硝子体内投与は 34
ゲージ針をガラスシリンジに取り付け、検体を充填して投与した。対照群には
0.01 M PBS を硝子体内投与した。感染予防の目的で硝子体内投与後、0.5%レボ
フロキサシン点眼液を処置眼に点眼投与した。

2-2-4 組織評価

2-2-4-1 パラフィン切片切片作製

第 2 章 2-2-5-1 の手順に従って、パラフィン切片を作成した。

2-2-4-2 ヘマトキシリン・エオジン染色を用いた組織障害評価

第 2 章 2-2-5-2 の手順に従って、ヘマトキシリン・エオジン染色を実施した。

2-2-4-3 網膜組織障害評価

第 2 章 2-2-5-3 の手順に従って、網膜組織障害評価を実施した。

2-2-4-4 凍結切片作成

摘出したマウス眼球を 4% PFA 含有 0.1 M PB (pH 7.4) で 48 時間 4°C での条件で固定した。次に 5、10、15 及び 20%の スクロース含有 0.1 M PB (pH 7.4) 液にそれぞれ 4°C で 2 時間静置した。その後、25% スクロース含有 0.1 M PB (pH 7.4) 液に 24 時間 4°C にて保存し、最後に液体窒素を用いて O.C.T compound で凍結包埋した。包埋したマウス眼球は薄切するまで -80°C にて保存した。網膜切片はクライオスタット (株式会社ライカ、Tokyo, Japan) を用いて、厚さ 10 μ m で作製した。切片は MAS コーティングされたカバーガラス (松波硝子工業株式会社、Osaka, Japan) にのせ、その後 -80°C で保存した。

2-2-4-5 凍結切片免疫染色

染色の際は、凍結切片を -80°C の超低温庫より取り出し、-20°C で 1 時間静置した。次に、4°C で 1 時間、さらに室温で 2 時間静置させた。乾燥していることを確認し、super PAP pen (大道産業株式会社、Saitama, Japan) で反応液の流出を防ぐために切片の周囲を囲んだ。0.3% Triton X-100 含有 10% horse serum により 1 時間ブロッキングを行い、ATF4 rabbit monoclonal antibody (1:50) を用いて 4°C で一晩反応させた。その後、PBS で洗浄を行い、Alexa Fluor-546 donkey anti-rabbit IgG (1:1000) によって 1 時間反応させた。PBS で洗浄後、hoechst 33342 (1:1000)

を用いて核染色を行った。染色後、フルオロマウント (水溶性封入基材) 及びカバーガラスを用いて封入した後、All-in-One BZ-X710 fluorescent microscope (Keyence) にて撮影を行った。

2-2-5 細胞培養

HRMECs は、100 µg/mL streptomycin、100 U/mL penicillin 及び CultureBoost-R を含んだ complete classic medium で培養した。細胞を播種する前に、培養ディッシュとプレートは attachment factor でコーティングし、細胞は 5%の CO₂ を含むインキュベーター内で 37°Cで培養した。

24 ウェルプレートに HRMECs を 2×10^4 cells/well で播種し、24 時間培養した。培地を CultureBoost-R を含まない 10% FBS 含有培地に交換した。24 時間後、1% FBS を含む培地または FBS を含まない培地に交換し、チモロールを添加した。その後、1% O₂ の条件下で 6 時間培養した。

2-2-6 qRT-PCR 法による解析

2-2-6-1 RNA 抽出

第 2 章 2-2-7-1 の手順に従って、RNA の抽出をした。

2-2-6-2 RNA 逆転写

第 2 章 2-2-7-2 の手順に従って、逆転写を行った。

2-2-6-3 qRT-PCR 法

第 2 章 2-2-7-3 の手順に従って、qRT-PCR を行った。

使用したプライマーの配列を以下に示す。

Atf4

Forward, 5'-GCAAGGAGGATGCCTTTTC-3'

Reverse, 5'-GTTTCCAGGTCATCCATTCG-3'

VFGFA

Forward, 5'- TCTACCTCCACCATGCCAAGT -3'

Reverse, 5'- GATGATTCTGCCCTCCTCCTT -3'

ATF4

Forward, 5'-AGGAGTTTCGCCTTGGATGCCCTG-3'

Reverse, 5'-AGTGATATCCACTTCACTGCCCAG-3'

GAPDH

Forward, 5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3'

Reverse, 5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3'

すべての反応は *GAPDH* による内部補正を行った後、その平均値を用いた。

2-2-7 統計学的解析

実験成績は平均値±SEM で示した。2 群間の比較では F 検定後に Student's t-test を行った。多群間の比較では、one-way ANOVA 後に Dunnett's test もしくは Tukey's test を行った。危険率が 5%未満を有意差有りとした。

第3節 実験成績

3-1 マウス RVO モデルにおけるチモロールの薬理評価

まず網膜浮腫に対するチモロール、ラタノプロスト点眼薬の効果を調べた。レーザー照射直後に2つの点眼薬を投与し、閉塞24時間後に採取した網膜をH&E染色し、INL厚を測定した。静脈閉塞によるINL厚の増加はチモロール点眼により有意に抑制されたが、ラタノプロスト点眼ではINL厚がvehicle群と比べて減少傾向はあるものの、有意な差はなかった (Fig. 25)。

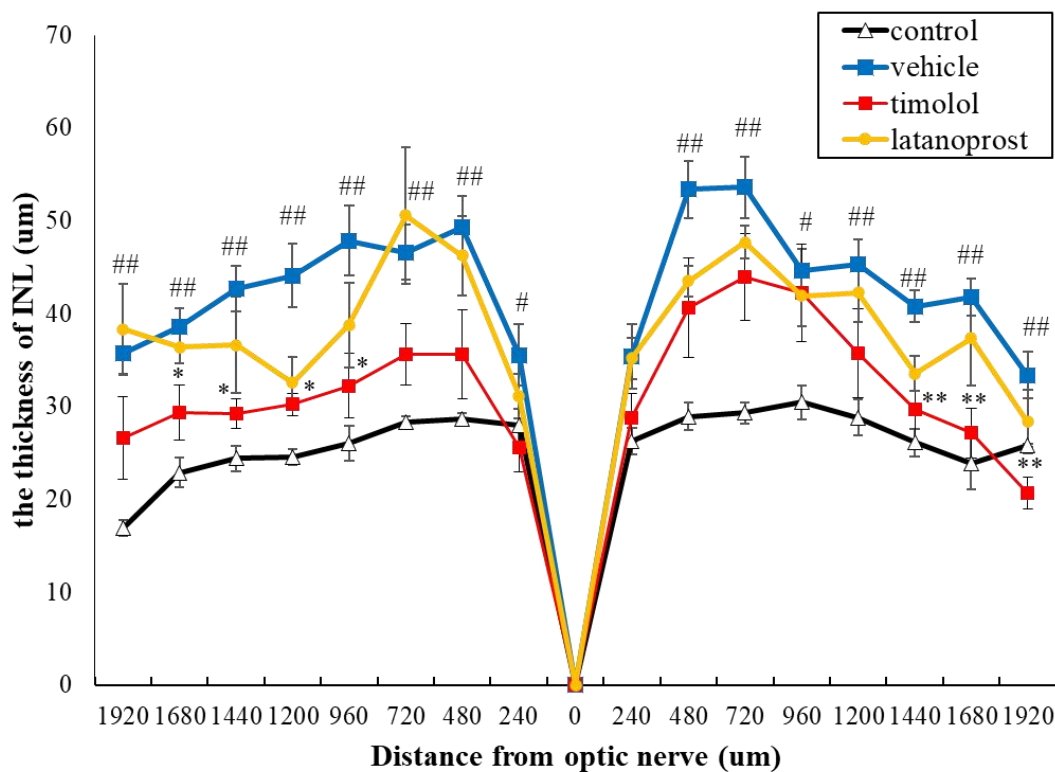
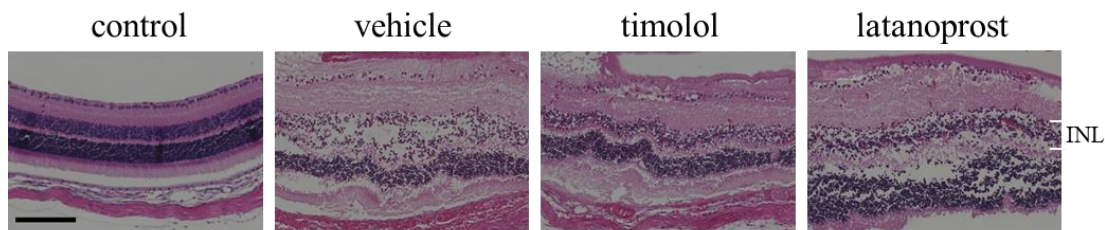


Fig. 25 Effect of timolol and latanoprost eye drops on retinal edema

Hematoxylin and eosin staining with the quantitative data of the inner nuclear layer (INL) thickness of the RVO retina after topical administration of timolol maleate and latanoprost. The scale bar is 50 µm. Data are presented as mean ± SEM (n = 7–17). **P* < 0.05, ***P* < 0.01 vs. vehicle, #*P* < 0.05, ##*P* < 0.01 vs. control (Tukey's test)

3-2 網膜遺伝子発現変化

RVO モデルにおけるチモロール点眼薬の浮腫改善効果のメカニズムを明らかにするため、RT-PCR を用いて炎症性サイトカイン及び *Vegf* の遺伝子発現の変化

を確認した。静脈閉塞 12 時間後の網膜では *Vegf* の発現増加が認められたが、その発現増加はチモロールの投与により抑制された。一方、*Tnf- α* や *Il6* などの炎症性サイトカインの発現量は、チモロール投与では変化しなかった。次に ER ストレスマーカーである *Atf4* の遺伝子発現の変化を確認した。RVO モデルの網膜では *Atf4* の発現が上昇していたが、その増加はチモロールの投与により抑制されることが明らかとなった (Fig. 26)。

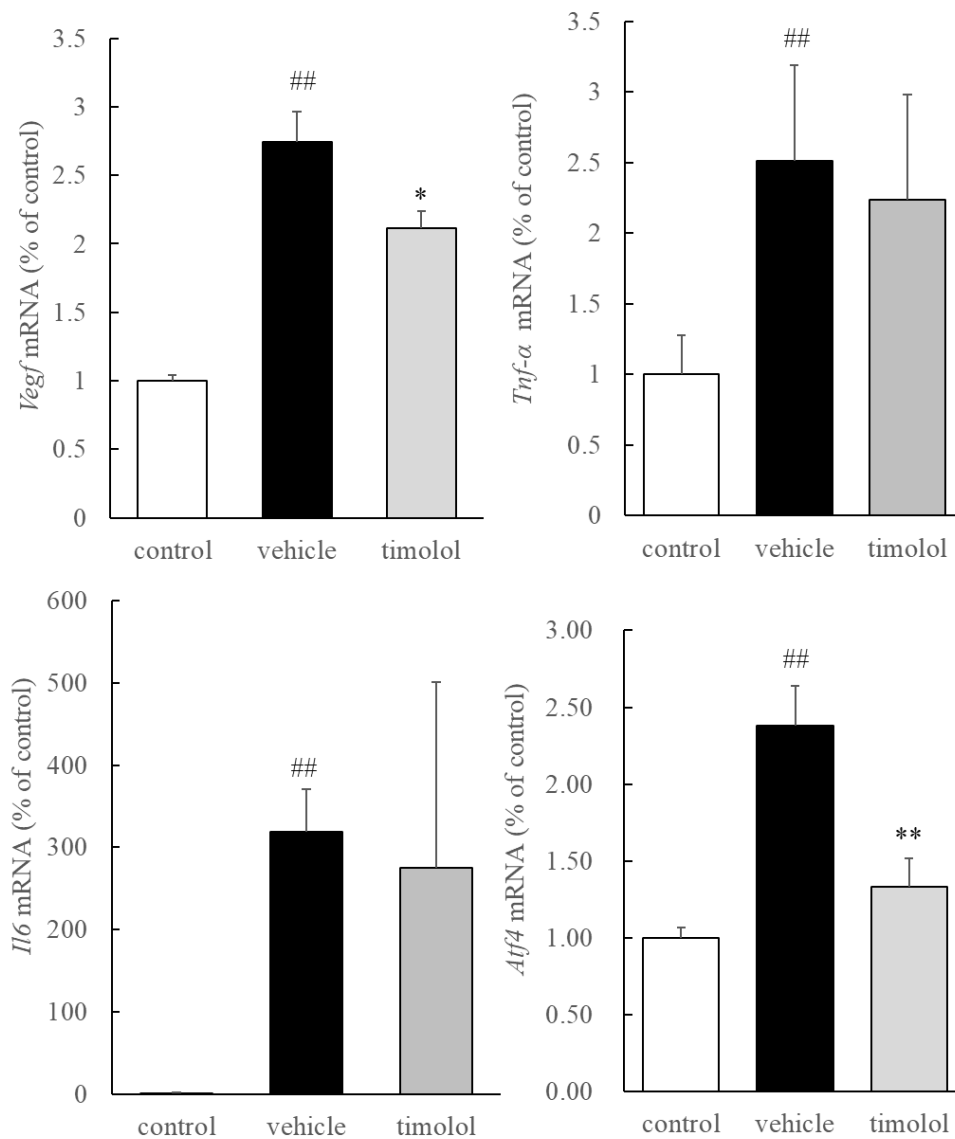


Fig. 26 Expression of RVO-related genes after timolol eye drops in the retina of RVO mice
Expression levels of *Vegf*, *Atf4*, *Il-6*, and *Tnf- α* in the occluded retina after topical administration of

timolol maleate. Results are presented as mean \pm SEM (n = 5, 6). * P < 0.05, ** P < 0.01 vs. vehicle, ## P < 0.01 vs. control (Tukey's test)

3-3 HRMECs における低酸素ストレス障害に対するチモロールの評価

次にチモロールの有効性を細胞レベルで検証するために、HRMECs の低酸素ストレス障害時における *VEGF* や *ATF4* の発現変動に対するチモロールの効果を評価した。低酸素ストレスでは *VEGF* の発現は増加した一方で、*ATF4* の発現は変動しなかった。また低酸素により増加した *VEGF* の発現は、チモロールの処置では抑制されなかった (Fig. 27A)。一方低酸素と血清除去ストレスを併用すると *VEGF* だけでなく *ATF4* の発現も増加し、増加した *VEGF* はチモロール処置によって抑制された (Fig. 27B)。

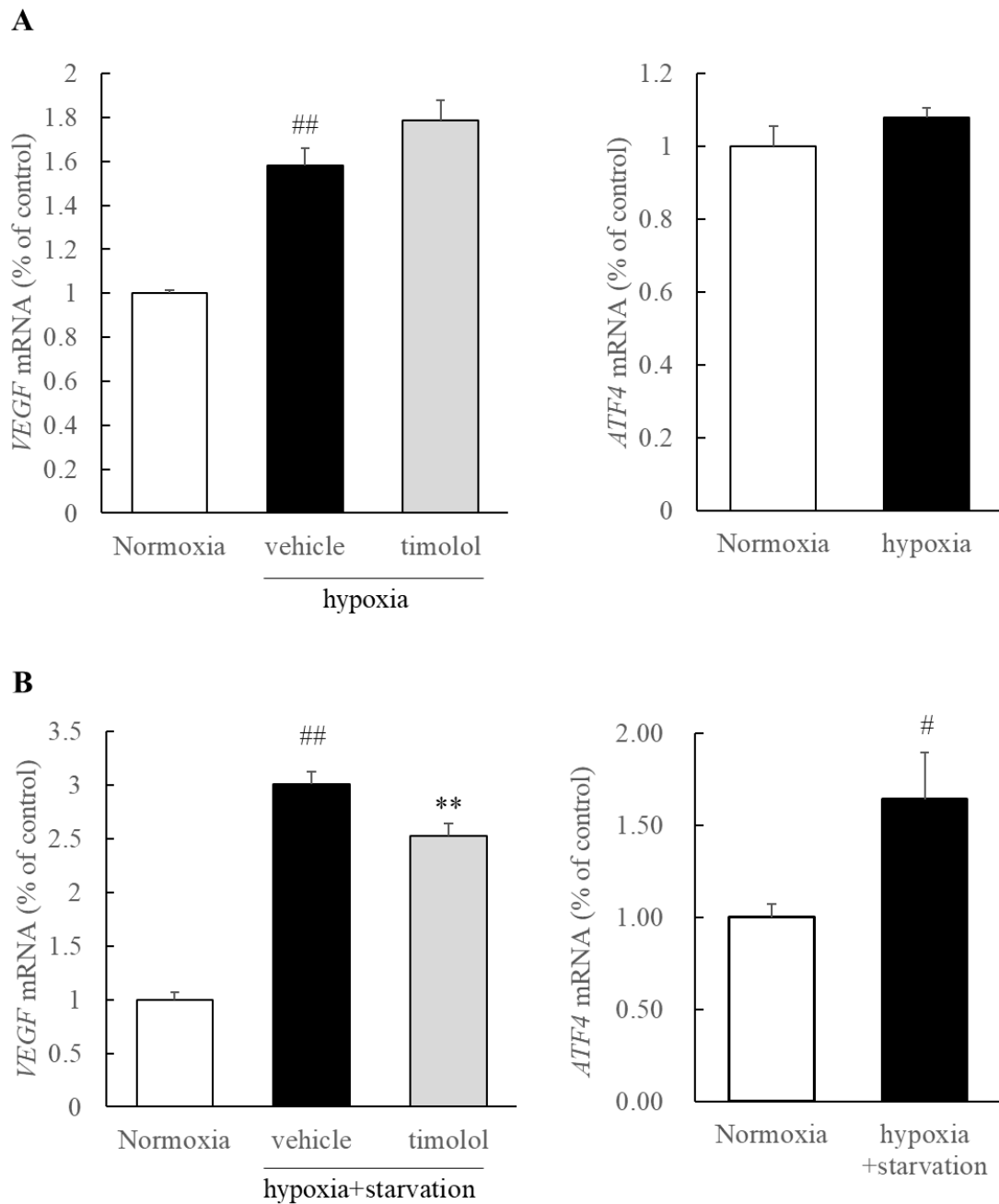


Fig. 27 Effects of timolol on gene expression in HRMECs under hypoxia

Expression of *VEGF* and *ATF4* in HRMECs cultured under hypoxic conditions (A) and under hypoxia and serum starvation (B) and treated with timolol for 6 h. Results are the mean \pm SEM (n = 4–8). * P < 0.05, ** P < 0.01 vs. vehicle, ## P < 0.01, # P < 0.05 vs. normoxia (Tukey's test or student's t -test)

3-4 マウス RVO モデルにおける ISRIB の薬理評価

マウス RVO モデルにおける *ATF4* の発現を免疫染色で調べたところ、RVO 網膜

で ATF4 の発現増加が確認された (Fig. 28A)。次に ER ストレス、VEGF、そして網膜浮腫の関係を明らかにするために、ER ストレスを抑制することが知られている ISRIB の網膜浮腫に対する効果を検証したところ、ISRIB の投与により血管閉塞による INL 厚の増加が抑制されることが明らかとなった (Fig. 28B)。また ISRIB は RVO モデルの網膜における *Vegf* の発現増加を抑制した。チモロールと同様に、ISRIB は *Tnfa* や *Il6* などの炎症性サイトカインの発現レベルは変化させなかった (Fig. 28C)。

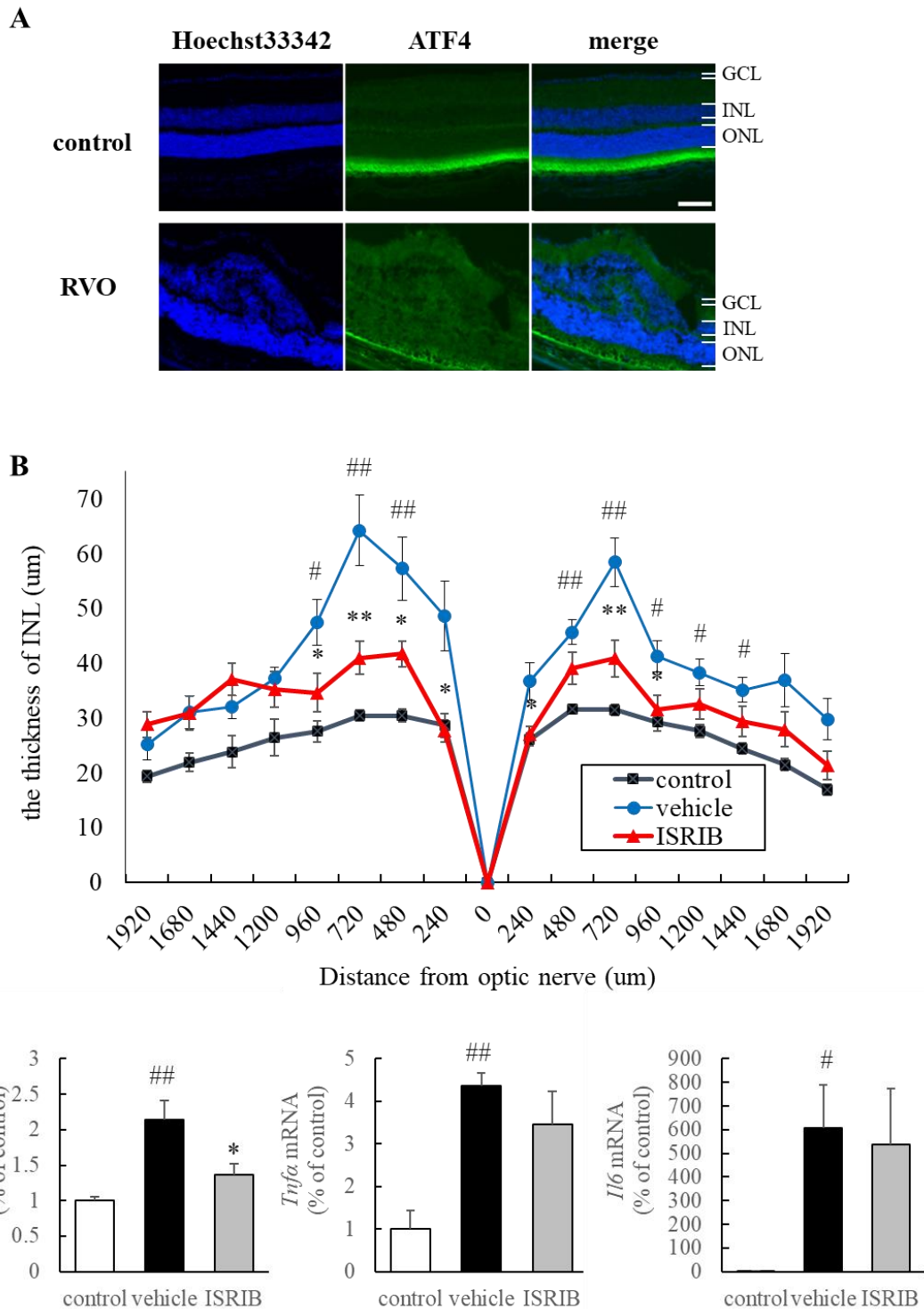


Fig. 28 Role of *Atf4* in RVO murine model

(A) Immunohistochemistry of ATF4 (green) and Hoechst 33342 (blue) 24 h after occlusion. GCL; ganglion cell layer, INL; inner nuclear layer, ONL; outer nuclear layer (B) The quantitative data of the INL thickness of occluded retina after intravitreal injection of ISRIB. Results are the mean \pm SEM (n

= 5–12). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. vehicle, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs. control (Tukey's test). (C)
Expression of *Vegf*, *Tnf- α* and *Il6* in occluded retina 12 h after injection of ISRIB. Results are the mean \pm SEM (n = 5–12). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. vehicle, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs. control (Tukey's test).

第4節 考察

β 遮断薬であるチモロール点眼薬が RVO マウスモデルにおける網膜浮腫を改善することを示した。これまでの RVO マウスモデルでの研究では、硝子体内注射での薬剤投与やヒトで使用されている薬剤ではない化合物の点眼による効果しか検討されていなかった (80, 81)。しかし今回の検討では、多くの国で承認されている点眼薬であるチモロールが RVO の病態を改善する可能性があることを初めて明らかにした。

本研究ではチモロールの点眼は網膜浮腫を改善させたものの、ラタノプロスト点眼薬は網膜浮腫を改善する傾向があったものの有意な差はなかった。これまでの報告では、ラタノプロストはペリサイトの障害を改善することが報告されていたが (73)、別の研究では、ラタノプロストが ovo chick chorioallantoic membrane model において *Vegf* 発現を増加させることが報告されており (82)、浮腫に対して相反する薬理メカニズムが発揮されたため、浮腫が改善しなかった可能性がある。ラタノプロストの点眼では網膜浮腫の改善が認められなかったため、以降の浮腫改善のメカニズムに関する実験では、チモロールについてのみ検討を行った。

In vivo の検証により、RVO モデルにおけるチモロールの薬理作用は、虚血ストレスにより誘発される *Vegf* 及び *Atf4* の発現抑制を介することが示唆された。RVO モデルにおける網膜浮腫は VEGF の増加に伴う血管透過性の上昇によって引き起こされると考えられている (83)。この VEGF の発現には β -アドレナリン受容体の一部関与しているとされている。例えば、低酸素ストレスは、 β -アドレナリン受容体のリガンドであるカテコールアミンの濃度を上昇させる (84)。また未熟児網膜症の動物モデルとして知られる oxygen-induced retinopathy (OIR) モデルでも、網膜におけるノルエピネフリンが増加することが報告されている

(85)。さらに β 遮断薬の点眼投与や硝子体内投与により、OIR モデルや脈絡膜血管新生モデルにおいて、*Vegf* の発現や病的な血管新生を抑制することが報告されている (78, 86)。これまでの報告と一致して、本研究では、 β 遮断薬であるチモロールが RVO モデルにおいて *Vegf* の発現増加及び網膜浮腫の形成を抑制した。RVO モデルにおいても OIR モデルと同様、血管閉塞による低酸素ストレスが生じるため、網膜においてカテコールアミン量が増加している可能性がある。また RVO モデルにおいて *Atf4* の増加が認められた。*Atf4* は ER ストレス応答経路の一部として主要な転写因子の一つである。チモロールは RVO モデルにおいて増加した *Atf4* の発現も抑制した。これまでに β -アドレナリン受容体アゴニストである Isoproterenol は、ER ストレス関連タンパク質である GRP78 を増加させ、ER ストレスを誘発することが知られており、 β -アドレナリン受容体は ER ストレスと関連があると考えられている (87, 88)。さらに、ER ストレスは VEGF の発現を制御することも知られている。例えば HRMEC に ER ストレス誘導剤である thapsigargin を処置すると *Vegf* の発現が増加すること、また ATF4 阻害作用を有する ISRIB が脈絡膜血管新生モデルにおける血管新生を抑制することを報告されている (89)。以上のことから、低酸素ストレスによって増加するカテコールアミンの β -アドレナリン受容体への結合をチモロールが阻害することで、ER ストレス及びその下流の VEGF の増加を抑制している可能性が示唆される。

網膜において β -アドレナリン受容体は血管内皮細胞、ミュラー細胞、双極細胞に発現している (90)。また初代培養ヒト臍帯静脈内皮細胞では、低酸素ストレスにより VEGF の発現を制御に関わる Hypoxia Inducible Factor-1 α (HIF-1 α) の核内移行が促進されるが、 β 遮断薬のプロプラノロールはこの核内への HIF-1 α の移行を抑制することが報告されている (76)。そこで受容体が発現し、 β 遮

断薬による HIF-1 α の低下が報告されている内皮細胞で、 β -アドレナリン受容体が低酸素ストレス時の VEGF 発現増加を制御しているのではないかと考え、低酸素条件下で HRMEC の VEGF 発現増加をチモロールが抑制するか検証した。まず血清含有培地で培養した HRMEC に低酸素ストレスを与えると VEGF の発現量が増加したが、チモロールは VEGF の発現量の増加を抑制しなかった。さらにこの条件では、ATF4 の発現は増加していなかった。一方、血清を含まない培地で培養した HRMEC に低酸素ストレスを加えると、VEGF だけでなく ATF4 も発現が増加し、チモロールの処置は VEGF の発現を抑制した。網膜色素上皮細胞株である ARPE-19 においては、血清除去が ER ストレスを誘発することが報告されており、HRMEC においても ATF4 は血清除去によって誘導された可能性がある (91)。

次に、ER ストレスが RVO モデルにおける網膜浮腫形成に関与しているかを明らかにするために、ISRIB の薬効評価を RVO モデルで行った。その結果、ISRIB の硝子体内投与によって網膜浮腫の形成や *Vegf* の発現増加が抑制されることが明らかとなった。したがって RVO モデルにおいて、虚血によって惹起された ER ストレスが VEGF の誘導を促進することで網膜浮腫を形成していることが示唆された。

今回の検討では既に緑内障治療薬として使用されているチモロール点眼薬が *Vegf* の増加を抑制し、網膜浮腫を改善することを示した。現在、RVO の第一選択治療は抗 VEGF 抗体の硝子体内投与であるが、侵襲性、高コスト、通院の必要性など、アドヒアランスに関する課題がある。RVO 患者において、チモロールの効果は必ずしも抗 VEGF 抗体より優れているとは言えないが、低コストかつ非侵襲的な治療法であることから、病院での抗 VEGF 抗体治療後に自宅での維持療法としてチモロールを点眼することで、抗 VEGF 抗体の治療間隔を延長

することができるかもしれない。

総括及び結論

今回の検討は緑内障治療薬の神経保護作用を明らかにすること、緑内障治療薬の RVO に対する有効性を明らかにすることを目的に実施した。

第 1 章では、緑内障治療薬であるチモロールとラタノプロスト単剤及びそれらの併用処置した際の網膜神経節細胞障害に対する影響について検討した。検討結果について以下にまとめる。

1. チモロール単剤、ラタノプロスト単剤及びチモロール/ラタノプロスト併用剤が酸化ストレス、ER ストレスによる細胞死を抑制した。またチモロール単剤及びチモロール/ラタノプロスト併用剤は血清除去ストレスに対する細胞死を抑制した。
2. ER ストレス及び血清除去ストレスによる網膜神経細胞障害においては、チモロールやラタノプロストの各単剤より併用剤のほうが、より細胞死を抑制した。
3. チモロールとラタノプロストの併用剤による保護効果は PI3K 阻害剤によって抑制された。

以上より、チモロール及びラタノプロストの単剤及びそれらの併用剤は網膜神経保護作用を示すことが示唆された。

第 2 章においては、臨床の病態を反映した RVO モデルを構築し、既存治療薬である抗 VEGF 抗体の有効性を確認した。検討結果を以下にまとめる。

1. RVO モデルでは網膜浮腫、視機能の低下、NPA の形成といった臨床病態や RVO 患者で発現変動が確認されている遺伝子の増減が確認された。
2. 血流の低下、視機能の低下、NPA の形成は血管閉塞から 30 日後まで維持された。

3. 血管閉塞直後に抗 VEGF 抗体を投与すると、網膜浮腫と NPA の形成が抑制された。また血管閉塞から 7 日後に抗 VEGF 抗体を投与すると NPA 面積が増大した。

以上より、臨床の病態を反映した RVO モデルが構築できた。また、抗 VEGF 抗体の治療効果は投与タイミングに依存する可能性が示唆された。

第 3 章では、RVO モデルの浮腫に対する緑内障治療薬チモロール及びラタノプロストの有効性を検討した。以下に検討結果についてまとめる。

1. チモロールの点眼が RVO モデルにおける網膜浮腫を抑制した。
2. チモロールの点眼投与は RVO モデルにおける VEGF 及び ATF4 の増加を抑制した。
3. HRMECs における低酸素及び血清除去ストレスは VEGF 及び ATF4 を増加させ、チモロールの処置は増加した VEGF を抑制した。
4. ER ストレスを抑制する ISRIB の投与は RVO モデルにおける浮腫の形成及び VEGF の遺伝子発現増加を抑制した。

以上より、チモロール点眼が VEGF や ER ストレスの抑制を介して RVO モデルにおける網膜浮腫を改善する可能性を明らかにした。

以上、本検討では緑内障治療薬のチモロールとラタノプロストが網膜神経細胞において保護作用を有し、それらを併用することにより、高い保護効果を発揮する可能性を明らかにした。また臨床の病態を反映した RVO モデルを構築し、チモロール及びラタノプロストの有効性を検証したところ、網膜浮腫に対するチモロールの有効性が示唆された。チモロールの点眼剤は既存治療薬と比

べて侵襲性や治療コストが低いため RVO に対する補助療法としての可能性が期待される。

謝辞

本稿を終えるに臨み、本研究の機会を賜り、また終始御懇切なる御指導並びに御助言を賜りました恩師 岐阜薬科大学 生体機能解析学大講座 薬効解析学研究室 前教授 原英彰博士（現、岐阜薬科大学長）に深謝致します。

本研究に際し、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました岐阜薬科大学 生体機能解析学大講座 薬効解析学研究室教授 嶋澤雅光博士、同准教授 中村信介博士、同助教 久世祥己博士、岐阜薬科大学 バイオメディカルリサーチ寄附講座 特任講師 大津航博士に感謝の意を表します。

また、諸種の御協力と御助言を頂きました 岐阜薬科大学 生体機能解析学大講座 薬効解析学研究室諸氏に心より感謝致します。

本論文の審査にあたり、有益なる御指導及び御助言を賜りました岐阜薬科大学 医療薬剤学大講座 臨床薬剤学研究室教授 原宏和博士、岐阜薬科大学 生体機能解析学大講座 生体情報学研究室教授 松永俊之博士、岐阜薬科大学 機能分子学大講座 薬理学研究室教授 檜井栄一博士に深謝致します。

最後に、本研究の遂行にあたり、実験試薬の御提供を賜りました日東メディック株式会社に心から感謝の意を表します。

引用文献

1. Tham, Y. C., Li, X., Wong, T. Y., Quigley, H. A., Aung, T., and Cheng, C. Y. (2014) Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology* **121**, 2081–2090
2. Saccà, S. C., Izzotti, A., Rossi, P., and Traverso, C. (2007) Glaucomatous outflow pathway and oxidative stress. *Exp. Eye Res.* **84**, 389-399
3. Tezel, G. (2006) Oxidative stress in glaucomatous neurodegeneration: Mechanisms and consequences. *Prog. Retin. Eye Res.* **25**, 490-513
4. Iwase, A., Suzuki, Y., Araie, M., Yamamoto, T., Abe, H., Shirato, S., Kuwayama, Y., Mishima, H. K., Shimizu, H., Tomita, G., Inoue, Y., and Kitazawa, Y. (2004) The prevalence of primary open-angle glaucoma in Japanese: the Tajimi Study. *Ophthalmology* **111**, 1641–1648
5. found, A. not, Anonymous, and found, A. not. (1998) The effectiveness of intraocular pressure reduction in the treatment of normal-tension glaucoma. Collaborative Normal-Tension Glaucoma Study Group. *Am. J. Ophthalmol.* **126**, 498-505
6. Schulzer, M., Alward, W. L., Feldman, F., Cashwell, L. F., Wilensky, J., Geijssen, H. C., Greeve, E., Quigley, H., Skuta, G., Lichter, P. R., Blondeau, P., Anderson, D. R., Grajewski, A., Hodapp, E., Balazsi, G., Amyot, M., Levene, R. Z., Minckler, D., Heuer, D., Drance, S. M., Mikelberg, F., Douglas, G., Johnstone, M., Trope, G., Hoskins, H. D., Pollack, I. P., Mills, R., Kasner, O. P., Schwartz, A., Liebmann, J., Ritch, R., Cohen, J., Tuulonen, A., Airaksinen, P. J., Clarkson, J., Litinsky, S., Hardy, R., Schiffman, J., Rose, A., Neaton, J.,

- Anderson, D. R., Steele, T., and Anderson, D. R. (1998) Comparison of glaucomatous progression between untreated patients with normal-tension glaucoma and patients with therapeutically reduced intraocular pressures. *Am. J. Ophthalmol.* **126**, 487-497
7. Lambiase, A., Aloe, L., Centofanti, M., Parisi, V., Mantelli, F., Colafrancesco, V., Manni, G. L., Bucci, M. G., Bonini, S., and Levi-Montalcini, R. (2009) Experimental and clinical evidence of neuroprotection by nerve growth factor eye drops: Implications for glaucoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 13469–13474
8. Quaranta, L., Bettelli, S., Uva, M. G., Semeraro, F., Turano, R., and Gandolfo, E. (2003) Effect of Ginkgo biloba extract on preexisting visual field damage in normal tension glaucoma. *Ophthalmology* **110**, 359-362
9. Krupin, T., Liebmann, J. M., Greenfield, D. S., Ritch, R., and Gardiner, S. (2011) A randomized trial of brimonidine versus timolol in preserving visual function: Results from the low-pressure glaucoma treatment study. *Am. J. Ophthalmol.* **151**, 671-681
10. Shih, G. C. and Calkins, D. J. (2014) Secondary neuroprotective effects of hypotensive drugs and potential mechanisms of action. <http://dx.doi.org/10.1586/eop.12.13> **7**, 161–175
11. Ricci, B., Ricci, F., and Maggiano, N. (2000) Oxygen-induced retinopathy in the newborn rat: Morphological and immunohistological findings in animals treated with topical timolol maleate. *Ophthalmologica* **214**, 136-139
12. Hirano, Y., Suzuki, N., Tomiyasu, T., Kurobe, R., Yasuda, Y., Esaki, Y., Yasukawa, T., Yoshida, M., and Ogura, Y. (2021) Multimodal Imaging of

- Microvascular Abnormalities in Retinal Vein Occlusion. *J. Clin. Med.* **10**, 34–66
13. Anholt, R. R. H. and Carbone, M. A. (2013) A molecular mechanism for glaucoma: Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response. *Trends Mol. Med.* **19**, 586-593
 14. Chen, S. Da, Wang, L., and Zhang, X. L. (2013) Neuroprotection in glaucoma: Present and future. *Chin. Med. J. (Engl)*. **126**, 1567-1577
 15. Diestelhorst, M., Krieglstein, G. K., Lusky, M., and Nagasubramanian, S. (1997) Clinical dose-regimen studies with latanoprost, a new ocular hypotensive PGF2 alpha analogue. *Surv. Ophthalmol.* **41 Suppl 2**, S77-81
 16. Osborne, N. N., Ji, D., Majid, A. S. A., Fawcett, R. J., Sparatore, A., and Del Soldato, P. (2010) ACS67, a hydrogen sulfide-releasing derivative of latanoprost acid, attenuates retinal ischemia and oxidative stress to RGC-5 cells in culture. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **51**, 284-294
 17. Yamagishi, R., Aihara, M., and Araie, M. (2011) Neuroprotective effects of prostaglandin analogues on retinal ganglion cell death independent of intraocular pressure reduction. *Exp. Eye Res.* **93**, 265–270
 18. Chen, Y. –N., Yamada, H., Aihara, M., and Araie, M. (2004) Neuroprotective Effect of Beta–adrenergic blockers on Hypoxic Damage in Purified Retinal Ganglion Cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **45**, 2077–2077
 19. Hommer, A., Sperl, P., Resch, H., Popa-Cherecheanu, A., Qiao, C., Schmetterer, L., and Garhöfer, G. (2012) A double-masked randomized crossover study comparing the effect of latanoprost/timolol and brimonidine/timolol fixed combination on intraocular pressure and ocular blood flow in patients with primary open-angle glaucoma or ocular hypertension. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*

28, 569-575

20. Lazaridou, M. N., Montgomery, D. I., Ho, W. O., and Jaberoo, D. (2008) Changes in intraocular pressure following a switch from latanoprost monotherapy to latanoprost/timolol fixed combination therapy in patients with primary open-angle glaucoma or ocular hypertension: Results from a clinical practice database. *Curr. Med. Res. Opin.* **24**, 2725-2728
21. Charles, I., Khalyfa, A., Kumar, D. M., Krishnamoorthy, R. R., Roque, R. S., Cooper, N., and Agarwal, N. (2005) Serum deprivation induces apoptotic cell death of transformed rat retinal ganglion cells via mitochondrial signaling pathways. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **46**, 1330-1338
22. Benítez-Rangel, E., Olguín-Albuerne, M., López-Méndez, M. C., Domínguez-Macouzet, G., Guerrero-Hernández, A., and Morán, J. (2020) Caspase-3 Activation Correlates With the Initial Mitochondrial Membrane Depolarization in Neonatal Cerebellar Granule Neurons. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, 544
23. Agostinho, P., Duarte, C. B., Carvalho, A. P., and Oliveira, C. R. (1997) Oxidative stress affects the selective ion permeability of voltage-sensitive Ca²⁺ channels in cultured retinal cells. *Neurosci. Res.* **27**, 323–334
24. Wood, J. P. M., Schmidt, K. G., Melena, J., Chidlow, G., Allmeier, H., and Osborne, N. N. (2003) The β -adrenoceptor antagonists metipranolol and timolol are retinal neuroprotectants: Comparison with betaxolol. *Exp. Eye Res.* **76**, 505–516
25. Matsuo, M., Kuse, Y., Takahashi, K., Kuwahara, K., Tanito, M., Kaidzu, S., Shimazawa, M., Hara, H., and Ohira, A. (2019) Carteolol hydrochloride reduces visible light-induced retinal damage in vivo and BSO/glutamate-induced

- oxidative stress in vitro. *J. Pharmacol. Sci.* **139**, 84-90
26. Takano, N., Tsuruma, K., Ohno, Y., Shimazawa, M., and Hara, H. (2013) Bimatoprost protects retinal neuronal damage via Akt pathway. *Eur. J. Pharmacol.* **702**
27. Huang, Y., Li, Z., Wang, N., van Rooijen, N., and Cui, Q. (2008) Roles of PI3K and JAK pathways in viability of retinal ganglion cells after acute elevation of intraocular pressure in rats with different autoimmune backgrounds. *BMC Neurosci.* **9**, 56-61
28. Cheung, Z. H., Chan, Y. M., Siu, F. K. W., Yip, H. K., Wu, W., Leung, M. C. P., and So, K. F. (2004) Regulation of caspase activation in axotomized retinal ganglion cells. *Mol. Cell. Neurosci.* **25**, 383-393
29. Sekine, Y., Shimada, M., Satake, S., Okubo, M., Hisaka, A., Hara, T., Honjo, M., and Aihara, M. (2018) Pharmacokinetic Analysis of Intraocular Penetration of Latanoprost Solutions with Different Preservatives in Human Eyes. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* **34**, 289-286
30. Suzuki, G., Kunikane, E., Shinno, K., Kozai, S., Kurata, M., and Kawamura, A. (2020) Ocular and Systemic Pharmacokinetics of Brimonidine and Timolol After Topical Administration in Rabbits: Comparison Between Fixed-Combination and Single Drugs. *Ophthalmol. Ther.* **9**, 115-125
31. Orii, Y., Kunikane, E., Yamada, Y., Morioka, M., Iwasaki, K., Arimura, S., Mizuno, A., and Inatani, M. (2022) Brimonidine and timolol concentrations in the human vitreous and aqueous humors after topical instillation of a 0.1% brimonidine tartrate and 0.5% timolol fixed-combination ophthalmic solution: An interventional study. *PLoS One* **17**, e0277313

32. Bunce, C., Xing, W., and Wormald, R. (2010) Causes of blind and partial sight certifications in England and Wales: April 2007-March 2008. *Eye (Lond)*. **24**, 1692–1699
33. Rogers, S., McIntosh, R. L., Cheung, N., Lim, L., Wang, J. J., Mitchell, P., Kowalski, J. W., Nguyen, H., and Wong, T. Y. (2010) The Prevalence of Retinal Vein Occlusion: Pooled Data from Population Studies from the United States, Europe, Asia, and Australia. *Ophthalmology* **117**, 313-319.
34. Jaisle, G. B., Szurman, P., Feltgen, N., Spitzer, B., Pielen, A., Rehak, M., Spital, G., Heimann, H., and Meyer, C. H. (2011) Predictive factors for functional improvement after intravitreal bevacizumab therapy for macular edema due to branch retinal vein occlusion. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **249**, 183–192
35. Campochiaro, P. A., Heier, J. S., Feiner, L., Gray, S., Saroj, N., Rundle, A. C., Murahashi, W. Y., and Rubio, R. G. (2010) Ranibizumab for macular edema following branch retinal vein occlusion: six-month primary end point results of a phase III study. *Ophthalmology* **117**, 1102-1112
36. Mir, T. A., Kherani, S., Hafiz, G., Scott, A. W., Zimmer-Galler, I., Wenick, A. S., Solomon, S., Han, I., Poon, D., He, L., Shah, S. M., Brady, C. J., Meyerle, C., Sodhi, A., Linz, M. O., Sophie, R., and Campochiaro, P. A. (2016) Changes in Retinal Nonperfusion Associated with Suppression of Vascular Endothelial Growth Factor in Retinal Vein Occlusion. *Ophthalmology* **123**, 625-634
37. Campochiaro, P. A., Wykoff, C. C., Shapiro, H., Rubio, R. G., and Ehrlich, J. S. (2014) Neutralization of vascular endothelial growth factor slows progression of retinal nonperfusion in patients with diabetic macular edema. *Ophthalmology*

121, 1783–1789

38. Isola, V., Pece, A., Massironi, C., Reposi, S., and Dimastrogiovanni, F. (2013) Accelerated ischemic vascular retinopathy after intravitreally injected bevacizumab for central retinal vein occlusion in elderly patients. *Clin. Ophthalmol.* **7**, 455–460
39. Sophie, R., Hafiz, G., Scott, A. W., Zimmer-Galler, I., Nguyen, Q. D., Ying, H., Do, D. V., Solomon, S., Sodhi, A., Gehlbach, P., Duh, E., Baranano, D., and Campochiaro, P. A. (2013) Long-term outcomes in ranibizumab-treated patients with retinal vein occlusion; the role of progression of retinal nonperfusion. *Am. J. Ophthalmol.* **156**, 693-705
40. Bringmann, A., Reichenbach, A., and Wiedemann, P. (2004) Pathomechanisms of cystoid macular edema. *Ophthalmic Res.* **36**, 241–249
41. Tryfon G, R. and Marilita, M. (2008) Cystoid macular edema. *Clin. Ophthalmol.* **2**, 919
42. Murakami, T., Okamoto, F., Iida, M., Sugiura, Y., Okamoto, Y., Hiraoka, T., and Oshika, T. (2016) Relationship between metamorphopsia and foveal microstructure in patients with branch retinal vein occlusion and cystoid macular edema. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **254**, 2191–2196
43. Wykoff, C. C., Brown, D. M., Croft, D. E., Major, J. C., and Wong, T. P. (2015) Progressive retinal nonperfusion in ischemic central retinal vein occlusion. *Retina* **35**, 43–47
44. Ebnetter, A., Agca, C., Dysli, C., and Zinkernagel, M. S. (2015) Investigation of retinal morphology alterations using spectral domain optical coherence tomography in a mouse model of retinal branch and central retinal vein

- occlusion. *PLoS One* **10**, e0119046
45. Zhao, T., Lu, Q., Tao, Y., Liang, X. Y., Wang, K., and Jiang, Y. R. (2011) Effects of apelin and vascular endothelial growth factor on central retinal vein occlusion in monkey eyes intravitreally injected with bevacizumab: A preliminary study. *Mol. Vis.* **17**, 1044-1055
 46. Coscas, G. and Gaudric, A. (1984) Natural course of nonaphakic cystoid macular edema. *Surv. Ophthalmol.* **28 Suppl**, 471–484
 47. Glacet-Bernard, A., Coscas, G., Chabanel, A., Zourdani, A., Lelong, F., and Samama, M. M. (1996) Prognostic factors for retinal vein occlusion: prospective study of 175 cases. *Ophthalmology* **103**, 551–560
 48. Finkelstein, D. (1992) Ischemic macular edema. Recognition and favorable natural history in branch vein occlusion. *Arch. Ophthalmol. (Chicago, Ill. 1960)* **110**, 1427–1434
 49. Hikichi, T., Konno, S., and Trempe, C. L. (1995) Role of the vitreous in central retinal vein occlusion. *Retina* **15**, 29–33
 50. Sun, C., Li, X. X., He, X. J., Zhang, Q., and Tao, Y. (2013) Neuroprotective effect of minocycline in a rat model of branch retinal vein occlusion. *Exp. Eye Res.* **113**, 105–116
 51. Genevois, O., Paques, M., Simonutti, M., Sercombe, R., Seylaz, J., Gaudric, A., Brouland, J. P., Sahel, J., and Vicaut, E. (2004) Microvascular Remodeling after Occlusion-Recanalization of a Branch Retinal Vein in Rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **45**, 594–600
 52. Wong, T. Y. and Scott, I. U. (2010) Clinical practice. Retinal-vein occlusion. *N. Engl. J. Med.* **363**, 2135–2144

53. Frank, R. N. (2004) Diabetic retinopathy. *N. Engl. J. Med.* **350**, 48–58
54. Liu, J., Clermont, A. C., Gao, B. B., and Feener, E. P. (2013) Intraocular Hemorrhage Causes Retinal Vascular Dysfunction via Plasma Kallikrein. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **54**, 1086–1094
55. Bringmann, A., Uckermann, O., Pannicke, T., Iandiev, I., Reichenbach, A., and Wiedemann, P. (2005) Neuronal versus glial cell swelling in the ischaemic retina. *Acta Ophthalmol. Scand.* **83**, 528–538
56. Rehak, M., Hollborn, M., Iandiev, I., Pannicke, T., Karl, A., Wurm, A., Kohen, L., Reichenbach, A., Wiedemann, P., and Bringmann, A. (2009) Retinal Gene Expression and Müller Cell Responses after Branch Retinal Vein Occlusion in the Rat. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **50**, 2359–2367
57. Goodyear, M. J., Crewther, S. G., and Junghans, B. M. (2009) A role for aquaporin-4 in fluid regulation in the inner retina. *Vis. Neurosci.* **26**, 159–165
58. Pannicke, T., Iandiev, I., Uckermann, O., Biedermann, B., Kutzera, F., Wiedemann, P., Wolburg, H., Reichenbach, A., and Bringmann, A. (2004) A potassium channel-linked mechanism of glial cell swelling in the postischemic retina. *Mol. Cell. Neurosci.* **26**, 493–502
59. Zhou, J., Kong, H., Hua, X., Xiao, M., Ding, J., and Hu, G. (2008) Altered blood-brain barrier integrity in adult aquaporin-4 knockout mice. *Neuroreport* **19**, 1–5
60. Dominguez, E., Raoul, W., Calippe, B., Sahel, J. A., Guillonneau, X., Paques, M., and Sennlaub, F. (2015) Experimental Branch Retinal Vein Occlusion Induces Upstream Pericyte Loss and Vascular Destabilization. *PLoS One* **10**, e0132644
61. Noma, H., Minamoto, A., Funatsu, H., Tsukamoto, H., Nakano, K., Yamashita,

- H., and Mishima, H. K. (2006) Intravitreal levels of vascular endothelial growth factor and interleukin-6 are correlated with macular edema in branch retinal vein occlusion. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **244**, 309–315
62. Sakimoto, S., Kamei, M., Suzuki, M., Yano, S., Matsumura, N., Sakaguchi, H., Gomi, F., and Nishida, K. (2013) Relationship between grades of macular perfusion and foveal thickness in branch retinal vein occlusion. *Clin. Ophthalmol.* **7**, 39–45
63. Yang, G., Kitagawa, K., Matsushita, K., Mabuchi, T., Yagita, Y., Yanagihara, T., and Matsumoto, M. (1997) C57BL/6 strain is most susceptible to cerebral ischemia following bilateral common carotid occlusion among seven mouse strains: selective neuronal death in the murine transient forebrain ischemia. *Brain Res.* **752**, 209–218
64. Fujii, M., Hara, H., Meng, W., Vonsattel, J. P., Huang, Z., and Moskowitz, M. A. (1997) Strain-Related Differences in Susceptibility to Transient Forebrain Ischemia in SV-129 and C57Black/6 Mice. *Stroke* **28**, 1805–1811
65. Chuang, L. H., Wu, W. C., Yeung, L., Wang, N. K., Hwang, Y. S., Chen, K. J., Kuo, J. Z. C., and Lai, C. C. (2011) Serum concentration of bevacizumab after intravitreal injection in experimental branch retinal vein occlusion. *Ophthalmic Res.* **45**, 31–35
66. Drechsler, F., Köferl, P., Hollborn, M., Wiedemann, P., Bringmann, A., Kohen, L., and Rehak, M. (2012) Effect of intravitreal anti-vascular endothelial growth factor treatment on the retinal gene expression in acute experimental central retinal vein occlusion. *Ophthalmic Res.* **47**, 157–162
67. Nishinaka, A., Inoue, Y., Fuma, S., Hida, Y., Nakamura, S., Shimazawa, M., and

- Hara, H. (2018) Pathophysiological role of VEGF on retinal edema and nonperfused areas in mouse eyes with retinal vein occlusion. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **59**, 4701-4713
68. Azhan, A., Zunaina, E., Mahaneem, M., and Siti-Azrin, A. H. (2021) Comparison of VEGF level in tears post phacoemulsification between non-proliferative diabetic retinopathy and non-diabetic patients. *J. Diabetes Metab. Disord.* **20**, 2073-2079
69. Adelman, R. A., Zheng, Q., and Mayer, H. R. (2010) Persistent ocular hypertension following intravitreal bevacizumab and ranibizumab injections. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* **26**, 105-110
70. Krishnan, R., Goverdhan, S., and Lochhead, J. (2009) Intravitreal pegaptanib in severe proliferative diabetic retinopathy leading to the progression of tractional retinal detachment. *Eye* **23**, 1238-1239
71. Shamsi, H. N. Al. (2013) Diabetic macular edema: New promising therapies. *World J. Diabetes* **4**, 324-338
72. Pielen, A., Feltgen, N., Isserstedt, C., Callizo, J., Junker, B., and Schmucker, C. (2013) Efficacy and Safety of Intravitreal Therapy in Macular Edema Due to Branch and Central Retinal Vein Occlusion: A Systematic Review. *PLoS One* **8**, e78538
73. Cheng, Y., Peng, L., Deng, X., Li, T., Guo, H., Xu, C., Fang, T., Liu, X., Sun, B., and Chen, L. (2021) Prostaglandin F₂ α protects against pericyte apoptosis by inhibiting the PI3K/Akt/GSK3 β / β -catenin signaling pathway. *Ann. Transl. Med.* **9**, 1021
74. Dominguez, E., Raoul, W., Calippe, B., Sahel, J. A., Guillonneau, X., Paques,

- M., and Sennlaub, F. (2015) Experimental branch retinal vein occlusion induces upstream pericyte loss and vascular destabilization. *PLoS One* **10**
75. Seo, E. J., Choi, J. A., Koh, J. Y., and Yoon, Y. H. (2020) Aflibercept ameliorates retinal pericyte loss and restores perfusion in streptozotocin-induced diabetic mice. *BMJ Open Diabetes Res. Care* **8**, e0132644
76. Cheong, H. I., Asosingh, K., Stephens, O. R., Queisser, K. A., Xu, W., Willard, B., Hu, B., Dermawan, J. K. T., Stark, G. R., Prasad, S. V. N., and Erzurum, S. C. (2016) Hypoxia sensing through β -adrenergic receptors. *JCI Insight* **1**
77. Casini, G., Dal Monte, M., Fornaciari, I., Filippi, L., and Bagnoli, P. (2014) The β -adrenergic system as a possible new target for pharmacologic treatment of neovascular retinal diseases. *Prog. Retin. Eye Res.* **42**, e90240
78. Dal Monte, M., Casini, G., la Marca, G., Isacchi, B., Filippi, L., and Bagnoli, P. (2013) Eye drop propranolol administration promotes the recovery of oxygen-induced retinopathy in mice. *Exp. Eye Res.* **111**, 27-35
79. Stritzke, A., Kabra, N., Kaur, S., Robertson, H. L., and Lodha, A. (2019) Oral propranolol in prevention of severe retinopathy of prematurity: a systematic review and meta-analysis. *J. Perinatol.* **39**, 1584-1594
80. Hida, Y., Nakamura, S., Nishinaka, A., Inoue, Y., Shimazawa, M., and Hara, H. (2018) Effects of ripasudil, a ROCK inhibitor, on retinal edema and nonperfusion area in a retinal vein occlusion murine model. *J. Pharmacol. Sci.* **137**, 129-136
81. Avrutsky, M. I., Ortiz, C. C., Johnson, K. V., Potenski, A. M., Chen, C. W., Lawson, J. M., White, A. J., Yuen, S. K., Morales, F. N., Canepa, E., Snipas, S., Salvesen, G. S., Jean, Y. Y., and Troy, C. M. (2020) Endothelial activation of caspase-9 promotes neurovascular injury in retinal vein occlusion. *Nat. Commun.*

11, 3173

82. Sabaner, M. C., Duman, R., Vurmaz, A., and Ertekin, T. (2021) Effects of topical prostaglandin drops on angiogenesis in an in ovo chick chorioallantoic membrane model. *Cutan. Ocul. Toxicol.* **40**, 54-60
83. Fuma, S., Nishinaka, A., Inoue, Y., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Kondo, M., and Hara, H. (2017) A pharmacological approach in newly established retinal vein occlusion model. *Sci. Rep.* **7**, 43509
84. Bechmann, N., Poser, I., Seifert, V., Greunke, C., Ullrich, M., Qin, N., Walch, A., Peitzsch, M., Robledo, M., Pacak, K., Pietzsch, J., Richter, S., and Eisenhofer, G. (2019) Impact of extrinsic and intrinsic hypoxia on catecholamine biosynthesis in absence or presence of hif2 α in pheochromocytoma cells. *Cancers (Basel)*. **11**, 594
85. Dal Monte, M., Martini, D., Latina, V., Pavan, B., Filippi, L., and Bagnoli, P. (2012) Beta-adrenoreceptor agonism influences retinal responses to hypoxia in a model of retinopathy of prematurity. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **53**, 2181-2192
86. Lavine, J. A., Farnoodian, M., Wang, S., Darjatmoko, S. R., Wright, L. S., Gamm, D. M., Ip, M. S., Sorenson, C. M., and Sheibani, N. (2017) β 2-adrenergic receptor antagonism attenuates CNV through inhibition of VEGF and IL-6 expression. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **58**, 299-308
87. Dalal, S., Foster, C. R., Das, B. C., Singh, M., and Singh, K. (2012) β -Adrenergic receptor stimulation induces endoplasmic reticulum stress in adult cardiac myocytes: Role in apoptosis. *Mol. Cell. Biochem.* **364**, 59-70
88. Song, S., Gao, P., Xiao, H., Xu, Y., and Si, L. Y. (2013) Klotho suppresses cardiomyocyte apoptosis in mice with stress-induced cardiac injury via

- downregulation of endoplasmic reticulum stress. *PLoS One* **8**, e82968
89. Yasuda, H., Tanaka, M., Nishinaka, A., Nakamura, S., Shimazawa, M., and Hara, H. (2021) Role of activating transcription factor 4 in murine choroidal neovascularization model. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 8890
90. Ruan, Y., Böhmer, T., Jiang, S., and Gericke, A. (2020) The Role of Adrenoceptors in the Retina. *Cells* **9**, 2594
91. Zhang, Y., Ren, S., Liu, Y., Gao, K., Liu, Z., and Zhang, Z. (2017) Inhibition of Starvation-Triggered Endoplasmic Reticulum Stress, Autophagy, and Apoptosis in ARPE-19 Cells by Taurine through Modulating the Expression of Calpain-1 and Calpain-2. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 2146

略語一覽

| | |
|---|---|
| Akt | protein kinase B |
| ANOVA | analysis of variance |
| aqp4 | aquaporin4 |
| BRVO | branch retinal vein occlusion |
| BSA | bovine serum albumin |
| BSO | buthionine sulphoximine |
| CRVO | central retinal vein occlusion |
| DMEM | Dulbecco's modified Eagle's medium |
| eNOS | endothelial nitric oxide synthase |
| ER | endoplasmic reticulum |
| ERG | electroretinogram |
| FITC | fluorescein isothiocyanate |
| HIF-1 α | hypoxia Inducible Factor-1 α |
| HRMECs | human retinal microvascular endothelial cells |
| ICAM-1 | intercellular adhesion molecule 1 |
| INL | inner nuclear layer |
| ISRIB | integrated stress response inhibitor |
| KH ₂ PO ₄ | potassium dihydrogenphosphate |
| LY294002 | PI3 kinase inhibitor 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one |
| MBR | mean blur rate |
| MCP-1 | monocyte chemotactic protein 1 |
| Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O | disodium hydrogenphosphate · 12-water |
| NaCl | sodium chloride |
| NO | nitric oxide |
| NPA | nonperfusion area |
| OCT | optical coherence tomography |
| ONL | outer nuclear layer |
| OPL | outer plexiform layer |
| PAS | periodic acid Schiff |
| PB | phosphate buffer |
| PBS | phosphate-buffered saline |
| PDGFA | platelet derived growth factor subunit A |
| PFA | paraformaldehyde |

| | |
|---------------|---|
| PI | propidium iodide |
| RGC | retinal ganglion cell |
| RNFL | retinal nerve fiber layer |
| RVO | retinal vein occlusion |
| SDS | sodium dodecyl sulfate |
| SEM | standard error of the mean |
| TBS | tris-buffered saline |
| TNF- α | tumor necrosis factor- α |
| trolox | 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl chroman-2-carboxylic acid |
| VEGF | vascular endothelial growth factor |