

53. 霊長類を用いた緑内障の発症メカニズム解明と治療研究

原田 高幸

東京都医学総合研究所 運動・感覚システム研究分野 視覚病態プロジェクト

Key words : 緑内障, マーモセット, 網膜神経節細胞, 生体イメージング, 酸化ストレス

緒言

我が国における失明原因の多くは網膜および視神経の変性疾患で占められており、Quality of Life の観点からも大きな社会的問題となっている。日本眼科医学会の調査では、視覚障害が我が国にもたらす社会損失額は年間 8.8 兆円と試算されている。日本における最大の失明原因は緑内障であり、40 歳以上の有病率は約 6 % にのぼる。緑内障は眼圧上昇によって網膜神経節細胞死とその軸索である視神経の変性が起きて、結果的に回復不能な視野障害に陥るものと考えられてきた。しかし本邦では眼圧が正常であるにもかかわらず緑内障症状を発症する「正常眼圧緑内障」が全体の約 7 割を占めるという事実が判明している。我々は世界初の正常眼圧緑内障モデルマウスをすでに報告しているが、ヒトとマウスでは解剖学的構造に差異があり、特に視神経を圧迫して緑内障を悪化させる篩状板がマウスには存在しない。また近年では画像診断技術の進歩により、進行した緑内障では後頭葉に存在する視覚野が萎縮することが報告されている。これは緑内障が単なる眼疾患ではなく、高次中枢の神経変性疾患であることを示しており、よりヒトに近いモデル動物の必要性が高まっている。そこで本研究ではマーモセットを用いた経時的な機能解析法を確立するとともに、自然発症緑内障個体を見出して、その病態を検討した。

方法および結果

1. マーモセットを用いた視機能計測法の確立

東京都医学総合研究所で飼育しているコモンマーモセット (*Callithrix jacchus*) について、全身麻酔下で眼底写真の撮影と光干渉断層計 (optical coherence tomography: OCT) の撮影を行った (RS-3000: Nidek, Japan)。その結果、マーモセットではヒトによく類似した眼底写真が撮影され、視神経乳頭と黄斑部が観察された (図 1A)。また前眼部 OCT では隅角底部まで明瞭な撮像が可能であり、開放隅角であることが確認された (図 1B)。さらに緑内障の発症に重要とされる篩状板についても、視神経乳頭部位で撮像することにより、鮮明に描出可能であった (図 1C、矢印)。

次に視機能を客観的に測定するため、多局所網膜電位の計測を行った (VERIS 6.0 system: Electro-Diagnostic Imaging, Redwood City, CA, USA)。計測は比較的若齢と考えられる 6 個体 (18~30 か月齢、平均月齢 23.1 ± 1.4 、体重 357 ± 9.7 g) と老齢の 6 個体 (95~144 か月齢、平均月齢 117.8 ± 5.4 、体重 372 ± 21.3 g) の合計 12 個体について行った。網膜神経節細胞および視神経由来の電位と考えられる二次核を抽出したところ、若齢群および老齢群ともに、ヒトと同様の波形が観察された (図 2A)。また若齢では良好な反応を示すが、老齢では全体の感度低下に加え、中心部での反応の低下が目立った。そこで定量的な解析を行ったところ、若齢群では 3.3 ± 0.2 nV/deg² であるのに対し、老齢群では 2.8 ± 0.1 nV/deg² と有意に低下することが確認された (図 2B)。このようにマーモセットでは生体イメージングによる網膜や視神経の形態観察に加えて、定量的な視機能評価が可能であることがわかった。

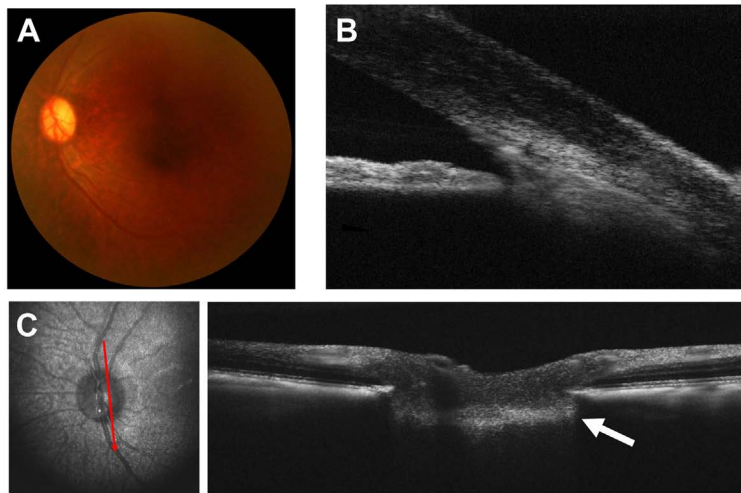


図1. マーモセットの非侵襲的な形態観察

(A) 眼底写真。(B) 前眼部 OCT 像。(C) 視神経乳頭部における OCT 像。赤矢印方向への撮像により、篩状板が観察された (白矢印)。

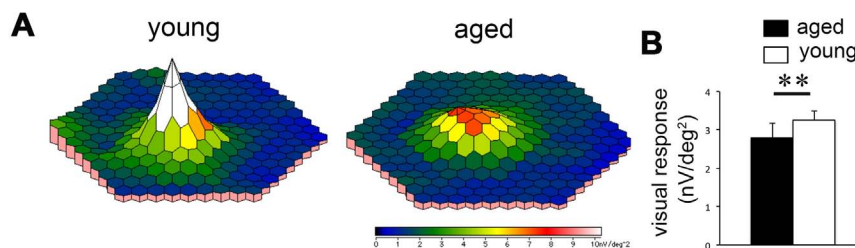


図2. マーモセットの非侵襲的な視機能解析

(A) 若齢および老齢個体における多局所網膜電位の3Dプロット。(B) (A)の定量的解析。老齢群では若齢群と比較して、有意な視機能の低下が観察された。 $**P < 0.01$ (Student's *t* test)。

2. 緑内障マーモセットの非侵襲的観察

我々は上記の老齢群の中に、片眼(左眼)の乳頭陥凹が拡大し、緑内障の発症が疑われる個体を見出した(図3A、BおよびE、F)。このマーモセットの視神経をOCTで観察すると、左眼にのみ特徴的な乳頭陥凹の拡大が描出された(図3C、G)。次に多局所網膜電位の二次核を測定したところ、右眼は通常の高齢個体(図2A)と同様の結果であった(図3D)。しかし左眼については感度が大きく低下しており、緑内障による視神経変性の影響が考えられた(図3H)。次にTONO-PEN XL (Mentor, MA, USA)を用いて眼圧の計測を行った。その結果、両眼共に17 mmHgであり、他の老齢個体(21.8 ± 1.1 mmHg)より低値であった。以上から同個体は、これまでに報告のない、正常眼圧緑内障を自然発症したマーモセットと考えられた。

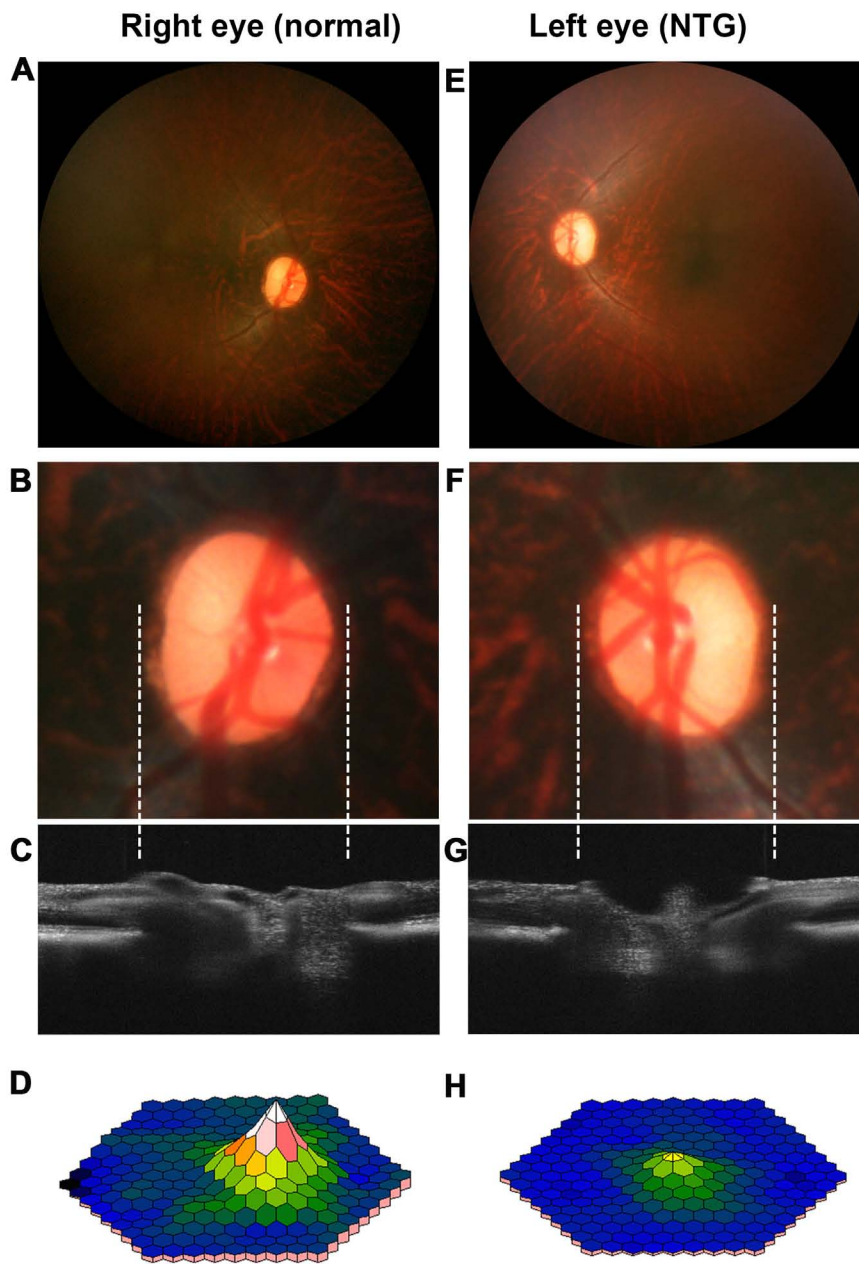


図3. 片眼に緑内障を発症したマーモセットの解析結果

(A-D) 右眼、(E-H) 左眼。(A、B、E、F) 眼底写真。(C、G) 視神経乳頭部の OCT 像。左眼では典型的な視神経乳頭陥凹が観察された。(D、H) 多局所網膜電位の 3D プロット。左眼の視機能低下が観察された。

さらに同個体を 1 年後に再検査したところ、右眼についても左眼と同様に視神経乳頭の陥凹が観察された (図 4A)。さらに多局所網膜電位の二次核についても右眼と同様の低下が観察され (図 4B)、両眼性の正常眼圧緑内障に進展したものと考えられた。

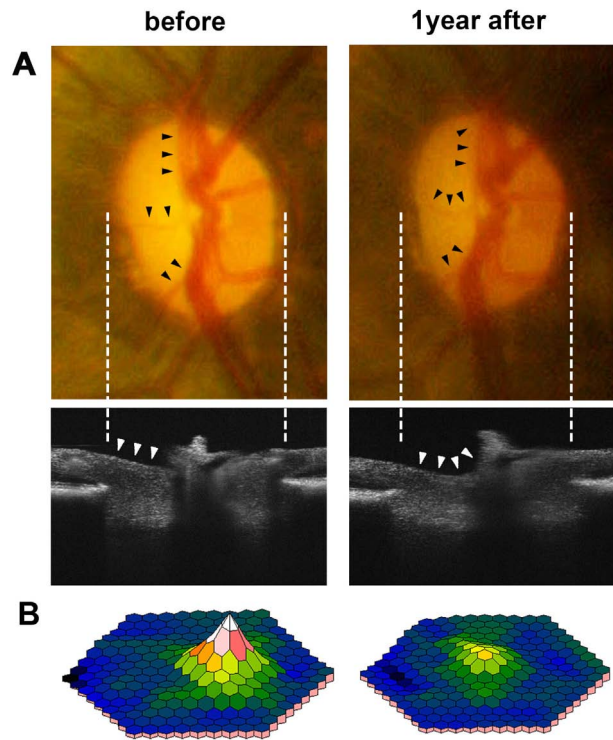


図4. 緑内障マーモセットの1年後の解析結果

(A) 初回および1年後の再検査時の右眼の眼底写真と視神経乳頭部のOCT像。緑内障の発症に伴い、視神経乳頭における血管走行の変化(黒矢頭)や進行性の視神経乳頭陥凹(白矢頭)が観察された。(B) 多局所網膜電位の3Dプロット。右眼でも視機能低下が観察された。

3. 血中グルタチオン濃度の測定

マーモセットの大腿静脈より0.5 ccの全血を採取し、遠心4,600 rpm (5分、4℃)にて分離された血漿を使用した。グルタチオン濃度の測定にはOxiSelect™ Total Glutathione Assay Kit (Cell Biolabs, Inc. San Diego, CA, USA)を使用した。グルタチオンのチオール基と発色試薬とを反応させて比色測定(405 nm)をChroMate 4300® Microplate Reader (Awareness Technology Inc, Palm City, FL, USA)によって定量し、スタンダードカーブを作成して濃度を決定した。その結果、若齢群では $0.178 \pm 0.021 \mu\text{M}$ であったのに対し、老齢群では $0.083 \pm 0.041 \mu\text{M}$ と血液中のグルタチオン濃度は有意に低下することが確認された。またNTG個体では $0.015 \mu\text{M}$ と更に低下しており、ヒト緑内障と類似した所見が確認された¹⁾。

考 察

我が国における最大の失明原因は緑内障であり、特に正常眼圧緑内障が全体の約7割におよぶことが判明している。我々は世界初の正常眼圧緑内障モデルマウスをすでに報告しているが²⁾、本研究ではよりヒトに近い霊長類であるマーモセットを用いて、生体イメージングによる網膜や篩状板の観察、さらに客観的な視機能測定法を確立した。このように非侵襲的かつ経時的な観察方法は、薬剤や食品などによる神経保護効果の検討に加えて、抗加齢研究等にも有用と考えられる。またこの手法を用いて自然発症した正常眼圧緑内障個体を見出し、その病態を検討した。緑内障患者では視神経変性や視野欠損の進行に左右差があることが特徴の1つとなっているが、マーモセットにおいても同様な特徴を捉えることができた。さらに今回の個体では緑内障患者と同様に抗酸化システムの指標である血中グルタチオン濃度の低下が見られたことなどから、マーモセットを用いた疾患研究の有用性が確認された。近年では緑内障患者において、より高次の中樞である視覚野の変性が報告されており³⁾、将来的にはこうした領域が新たな治療上のターゲットとなることが想定される。マーモセットでは齧歯類などと比較して脳が大きく高次機能が発達しており、かつ視覚野も含めた構造と機能の解明が進んでいることから、今後は高次中樞も含めた病態把握と治療研究を計画している。

共同研究者

本研究の共同研究者は、東京慈恵医科大学眼科学教室の野呂隆彦である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深謝いたします。

文 献

- 1) Gherghel D, Mroczkowska S, Qin L. Reduction in blood glutathione levels occurs similarly in patients with primary-open angle or normal tension glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54(5):3333-9. doi: 10.1167/iov.12-11256. PMID: 23599328.
- 2) Harada T, Harada C, Nakamura K, Quah HM, Okumura A, Namekata K, et al. The potential role of glutamate transporters in the pathogenesis of normal tension glaucoma. *J Clin Invest.* 2007;117(7):1763-70. PMID: 17607354.
- 3) Wang J, Li T, Sabel BA, Chen Z, Wen H, Li J, et al. Structural brain alterations in primary open angle glaucoma: a 3T MRI study. *Sci Rep.* 2016;6:18969. doi: 10.1038/srep18969. PMID: 26743811.