
 総 説

網膜色素変性に対するあたらしい薬物治療の可能性

大黒 浩

札幌医科大学眼科学講座

要 約

遺伝性網膜変性症である網膜色素変性は、臨床的に暗順応の低下、視野狭窄、網膜血管の狭細化および網膜電図で a および b 波の振幅低下を特徴とし、未だ有効な治療法のない難病である。病理学的には視細胞のアポトーシスによる変性が主で、本症の原因は網膜視細胞特異蛋白質における多数の遺伝子異常と考えられている。しかしそれらの遺伝子産物がどのような機能異常を来し、最終的に不可逆性の網膜変性に至るかについては明らかではない。今回我々の研究グループは本症における網膜機能異常を明らかにするために、原因が異なる 6 種類の網膜変性動物モデル ① 網膜色素上皮細胞 (RPE) に原因をもつ Royal College of Surgeons (RCS) ラット、光受容体ロドプシン遺伝子が原因である ② P23H (23 番プロリンがヒスチジンに変換されたもの) ラット、③ S334ter (334 番セリンが終止コドンに変換されたもの) ラット、④ 光傷害ラット、⑤ フォスフォジエステラーゼ (phosphodiesterase : PDE) に傷害をもつ Retinal degeneration (rd) マウス、さらに ⑥ リカバリンを介した順応系に異常をもつ cancer-associated retinopathy (CAR) モデルラットを用いた。これらについて ① 網膜電図による機能評価、② 網膜形態評価、③ レチノイド

の解析、④ ロドプシン再生能、⑤ ロドプシン脱リン酸化能、および ⑥ cGMP 濃度変化について検討した。その結果、用いた網膜変性モデルに共通の視細胞機能異常として明暗順応を制御する機構に異常 (ロドプシンリン酸化と脱リン酸化の障害) があることが判明した。

次に、網膜機能異常としての順応障害を是正し網膜変性阻止効果が期待される薬物として ① 視細胞における機能是正を目指してカルシウムチャンネルブロッカー、および ② RPE における是正を目指してレチノイドおよびアントシアニンを各種モデル動物に投与し、それらの薬物効果を検討した。その結果、カルシウムチャンネルブロッカーであるニルバジピンは今回試したいずれのモデルに対しても有効性を示したのに対し、レチノイドやアントシアニンには補助効果は期待されるもののさらなる検討が必要と考えられた。(日眼会誌 112 : 7-21, 2008)

キーワード：網膜色素変性、暗順応、ロドプシン脱リン酸化、カルシウムチャンネルブロッカー、動物モデル

 A Review

New Drug Therapy for Retinal Degeneration

Hiroshi Ohguro

Department of Ophthalmology, Sapporo Medical University School of Medicine

Abstract

Retinitis pigmentosa (RP) is an inherited retinal degeneration characterized by nyctalopia, ring scotoma, and bone-spicule pigmentation of the retina. So far, no effective therapy has been found for RP. As a possible molecular etiology of RP, retina-specific gene deficits are most likely involved, but little has been identified in terms of intracellular mechanisms leading to retinal photoreceptor cell death at post-

translational levels. In order to find an effective therapy for RP, we must look for underlying common mechanisms that are responsible for the development of RP, instead of designing a specific therapy for each of the RP types with different causes.

Therefore, in the present study, several animal models with different causes of RP were studied, including 1) Royal College of Surgeons (RCS) rats with

別刷請求先：060-8543 札幌市中央区南 1 条西 16 札幌医科大学眼科学講座 大黒 浩
(平成 18 年 10 月 17 日受付, 平成 19 年 9 月 3 日改訂受理)

Reprint requests to: Hiroshi Ohguro, M.D. Department of Ophthalmology, Sapporo Medical University School of Medicine, South-1 West-16, Chuo-ku, Sapporo 060-8543, Japan

(Received October 17, 2006 and accepted in revised form September 3, 2007)

a deficit of retinal pigment epithelium (RPE) function caused by rhodopsin mutation ; 2) P23H rats, 3) S334ter rats, 4) photo stress rats, 5) retinal degeneration (*rd*) mice with a deficit of phosphodiesterase (PDE) function ; and 6) cancer-associated retinopathy (CAR) model rats with a deficit of recoverin-dependent photoreceptor adaptation function. In each of these models, the following assessments were made in order to elucidate common pathological mechanisms among the models : 1) retinal function assessed by electroretinogram (ERG), 2) retinal morphology, 3) retinoid analysis, 4) rhodopsin regeneration, 5) rhodopsin phosphorylation and dephosphorylation, and 6) cytosolic cGMP levels. We found that unregulated photoreceptor adaptation processes caused by an imbalance of rhodopsin phosphorylation and dephosphorylation caused retinal dysfunction leading to photoreceptor cell death.

As possible candidate drugs for normalizing these retinal dysfunctions and stopping further retinal degeneration, nilvadipine, a Ca channel blocker, retinoid derivatives, and anthocyanine were chosen and tested to determine their effect on the above animal models with retinal degeneration. Nilvadipine showed beneficial effects against retinal degeneration in all models tested, but retinoid derivatives and anthocyanine showed these beneficial effects in only some models. Thus our present data allowed us to test the effectiveness of nilvadipine in the treatment of human RP patients.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophtalmol Soc 112 : 7—21, 2008)

Key words : Retinitis pigmentosa, Dark adaptation, Rhodopsin dephosphorylation, Calcium channel blocker, Animal model

I 緒 言

遺伝性網膜変性疾患である網膜色素変性は多くの場合進行性に眼底が荒廃し、視力、視野が障害され、網膜の電気応答が消失するのを特徴とする。残念ながらこのような患者を根本的に救う方策は現時点ではない。現在、網膜色素変性の病態は、網膜特異遺伝子の異常や網膜特異蛋白質に対する自己免疫機序により何らかの網膜機能異常を来し、最終的に網膜変性に陥るものと考えられている^{1)~3)}。網膜色素変性では、原因である遺伝子の異常として視細胞特異遺伝子、網膜色素上皮特異遺伝子またはそれ以外の遺伝子など非常に多くの原因遺伝子が発見されている^{1)~3)}。しかし一方で網膜色素変性の原因と病型の関連性に着目すると原因遺伝子が異なっても病型がきわめて類似していたり、また逆に原因遺伝子が同じでも病型が異なるといった現象がみられる^{1)~3)}。以上の事実は、網膜色素変性の病型と原因が1対1で対応するのではなく、複数の原因が同一の網膜機能異常を引き起こすこともあれば、逆に同一の原因が何らかの因子により別の網膜機能異常を引き起こすことを強く示唆するものである。したがって、このことは網膜傷害を直接誘導する網膜機能異常を分子レベルで明らかにし、それに対する対処法をデザインすることにより本症に対する治療の可能性を示唆するものである。

そこで今回我々の研究グループは、網膜色素変性における網膜機能異常として本症の標的部である網膜視細胞および網膜色素上皮細胞 (RPE) に的を絞り、分子病態を解明することとそれらの機能異常を正常化させることで網膜変性の進行をくい止めうる薬物治療の開発を目指して検討を行った。

II 網膜変性における網膜機能異常の解析

1. 光トランスダクションカスケードとレチノイドサイクル

網膜変性症の標的部である視細胞と網膜色素上皮細胞の機能は光信号を電気信号に変換させる光トランスダクションカスケードおよびその制御機構 (信号停止と順応) である。光トランスダクションカスケード⁴⁾⁵⁾は、視

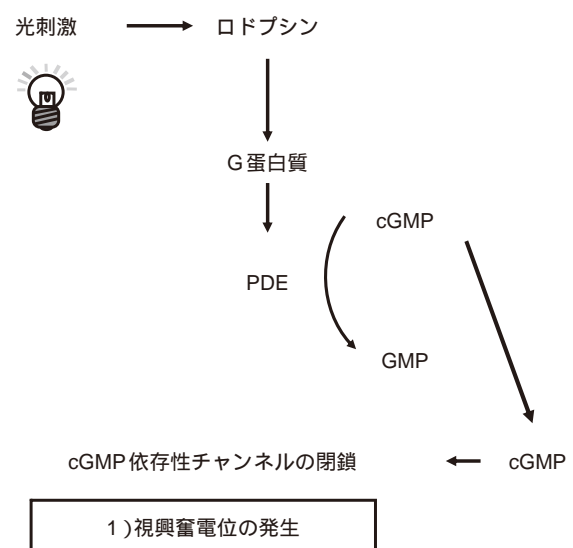


図 1 視細胞における視興奮機序。

光刺激によりロドプシンが褪色中間体に変換すると G 蛋白質、PDE (cGMP フォスフォジエステラーゼ) が次々に活性化され、細胞質中の cGMP (cyclic guanosine mono-phosphate) が急減する。これにより形質膜上の cGMP 依存性チャンネルが閉鎖し、過分極性の視興奮電位が発生する。

細胞杆体外節円板膜上にある光受容蛋白質ロドプシンが光信号を吸収し、活性型褪色中間体に変換されると三量体 G 蛋白質(Gt), cyclic guanosine mono-phosphate(cGMP) 分解酵素フォスフォジエステラーゼ(phosphodiesterase: PDE)が次々と活性化され、最終的に細胞内 cGMP 濃度の急減に呼応して形質膜上の cGMP 依存性チャンネルが閉鎖し、細胞内外でイオン濃度勾配が生じることにより視興奮電位が発生する(図 1)。いったん発生した視興奮は次の光信号に備えて直ちに停止する。これは光褪色ロドプシンがロドプシンキナーゼによりリン酸化されアレスチンという蛋白質と複合体を形成すると Gt 以下の反応が停止することによりもたらされる⁶⁾(図 2)。さらに光褪色したロドプシンは光感光する以前に戻るために、レチノイドサイクルが必要である⁷⁾(図 3)。ロドプシンはオプシンという蛋白質と 11-cis-retinal (CR: 11 位に O がシス結合したレチナール)というレチノイドからなる色素蛋白質である。光褪色により 11-cis-retinal が all-trans-retinal(AT: 全トランス型レチノール)に異性化し、直ちに RPE に移され all-trans-retinyl ester(AT ester: AT のエステル化型)として蓄えられ

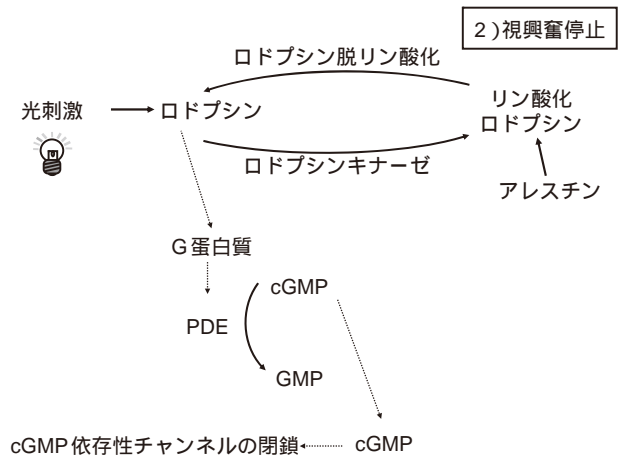
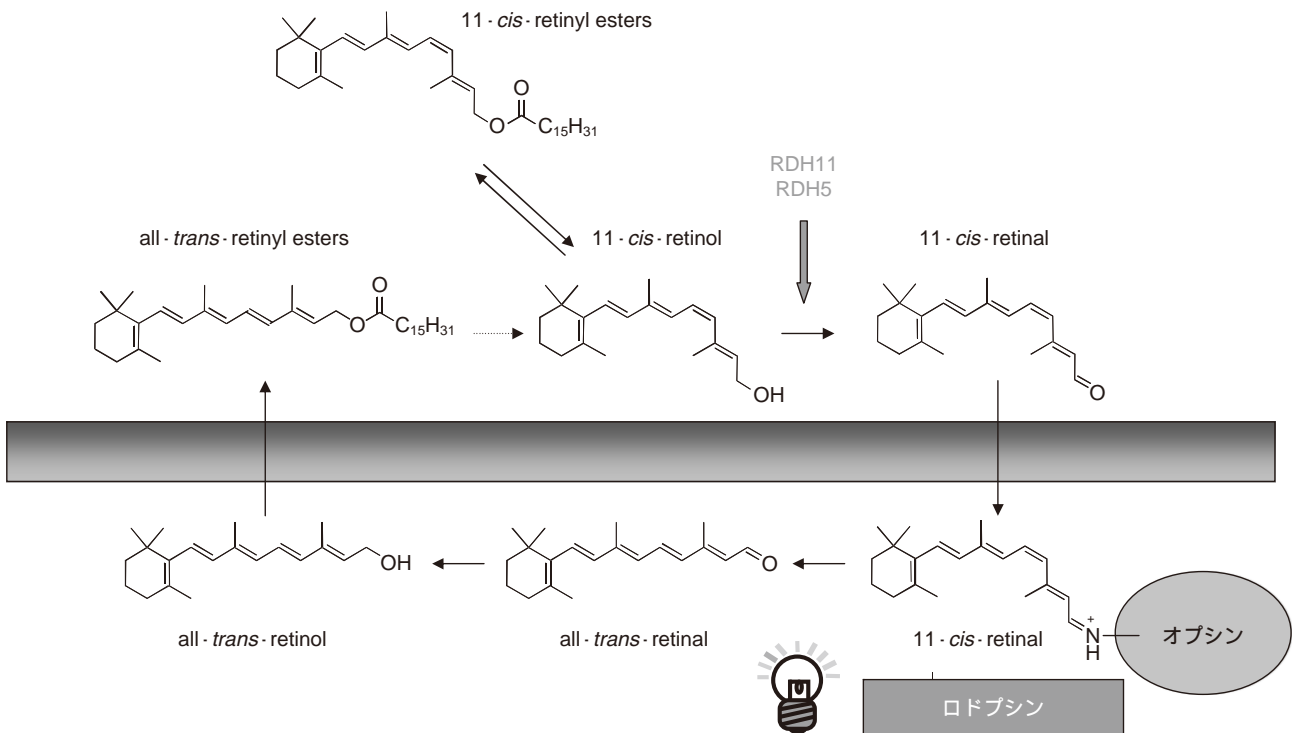


図 2 視細胞における視興奮停止機序。
ロドプシン褪色中間体がロドプシンキナーゼによりリン酸化されるとこれにアレスチンが結合する。これによりロドプシン褪色中間体が G 蛋白質と結合できなくなり G 蛋白質以下の反応が停止する。

網膜色素上皮細胞内



視細胞杆体外節内

図 3 ロドプシン再生のためのレチノイドサイクル。

ロドプシンはオプシンと 11-cis-retinal からなる色素蛋白質である。視細胞杆体外節中(ROS: rod outer segments)でロドプシン光褪色により 11-cis-retinal が all-trans-retinal 次いで all-trans-retinol に異性化すると、これが色素上皮細胞(RPE: retinal pigment epithelium)に移送される。ここで再び 11-cis 型に異性化された後に還元酵素(RDH: retinol dehydrogenase)の働きで 11-cis-retinal へと異性化される。11-cis-retinal は引き続き視細胞杆体外節に戻されオプシンと結合しロドプシンへと再生される。

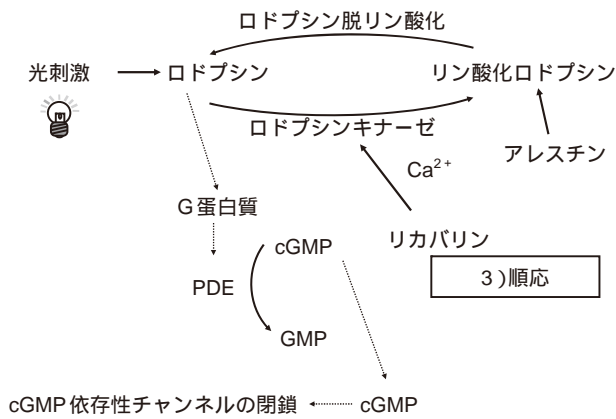


図 4 視細胞における順応機序.

光環境に応じて cGMP 依存性チャンネルの開閉に伴い細胞内カルシウム濃度変化する。これに呼応してカルシウム結合蛋白質リカバリンがロドプシンのリン酸化をコントロールすることで視興奮のレベルが調節されることにより順応がもたらされる。

表 1 今回の研究で用いたモデル動物

動物モデル	傷害部位
RCS ラット	網膜色素上皮細胞, <i>MertK</i> の遺伝子異常
P23H ラット	ロドプシン遺伝子異常
S334ter ラット	ロドプシン遺伝子異常
光傷害ラット	ロドプシン
<i>rd</i> マウス	cGMP フォスフォジエステラーゼ
CAR ラット	特異抗体によるリカバリン作用抑制

RCS: Royal College of Surgeons, *rd*: retinal degeneration, CAR: cancer-associated-retinopathy.

る。暗室条件では酵素反応により再び 11-*cis*-retinal に変換され、視細胞に戻りオプシンと結合することで、ロドプシンへと完全に再生される。これに加えて視細胞が種々の背景光に対して至適条件で働くための順応過程がある⁸⁾(図 4)。この過程は cGMP 依存性チャンネルの開閉に伴って細胞内カルシウムイオン濃度が変化するが、この変化に呼応してリカバリン, GCAP (guanylate cyclase activating protein: グアニル酸シクラーゼ活性化蛋白質) などのカルシウム結合蛋白質がロドプシンのリン酸化を制御し、信号停止の度合いを調節することによりもたらされる。

網膜変性では以上示した光トランスダクションカスケードとその制御機構の中でどこかの反応に異常を来していると思われるので、それを突き止める目的で、原因が異なる 6 つの網膜変性動物モデル[RPE に原因をもつ RCS ラット⁹⁾, ロドプシンに異常をもつロドプシン遺伝子 P23H¹⁰⁾ および S334ter¹¹⁾ ラット, ならびに光傷害ラット¹²⁾, PDE の傷害をもつ retinal degeneration (*rd*) マウス¹³⁾, リカバリンを介した順応系に異常をもつ cancer-associated retinopathy (CAR) モデル¹⁴⁾]を用い検討した

11-*cis*-retinal (CR)



All-*trans*-retinal (AT) + AT ester

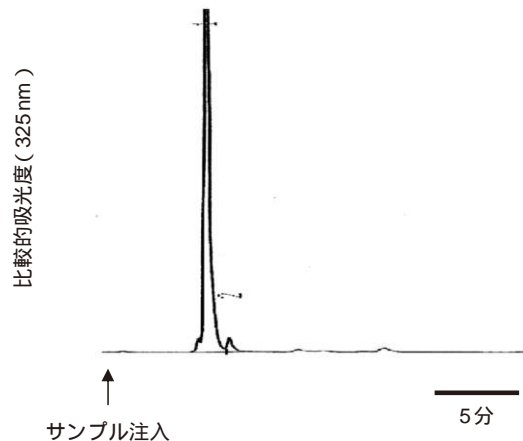


図 5 レチノイドの高速液体クロマトグラフィーによる分離.

網膜より有機溶媒(ヘキサン)を用いてレチノイドを抽出し、これを高速液体クロマトグラフィーに装着したシリカカラムにより網膜における主要レチノイドである 11-*cis*-retinal (CR), all-*trans*-retinal (AT) および all-*trans*-retinyl ester (AT ester) を異なるピークとして分離した。

(表 1)。

2. 網膜変性モデルを用いた網膜傷害機序の検討

上記の 6 種のモデルを用いて、全視野刺激による網膜電図で解析を行ったところ、程度の差はあるもののすべてのモデルで a および b 波の波形の振幅低下がみられた。さらに網膜の組織学的検討では程度の差はあるもののすべてのモデルで網膜外層の菲薄化および組織破壊がみられた。従来の報告どおり^{9)~14)} いずれのモデルも網膜外層が傷害され網膜電図の異常を示す網膜変性を有することが確認され、今回の検討に用いるのに有用であると思われた。

そこで各モデルにおける網膜傷害機序を分子レベルで明らかにする目的で ① RPE の機能としてレチノイドサイクルにおけるレチノイドの解析, ② 視細胞機能として光トランスダクションカスケード初期反応である視興奮におけるロドプシンの光褪色能, ③ 視興奮の停止お

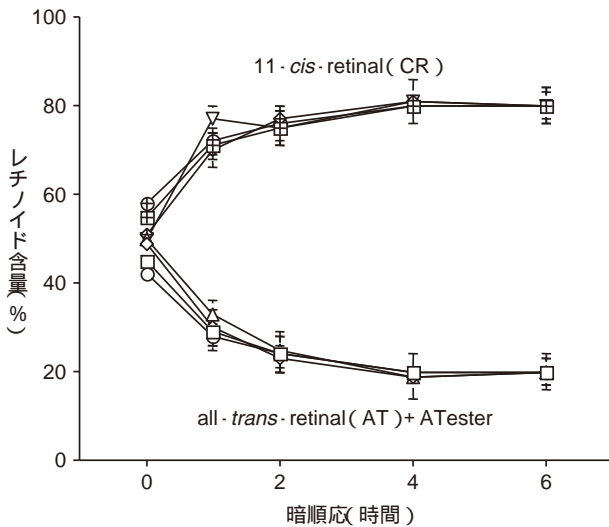


図 6 暗順応時における網膜変性モデル網膜内のレチノイドの変化。

正常ラット (Sprague-Dawley ; SD ラット) およびモデルラット (Royal College of Surgeons ; RCS ラット, P23H ラットおよび S334ter ラット) を 650 lux の明室条件より暗順応を行い時間経過における網膜内の各レチノイド含量の比率を検討した。光照射によって増加した all-trans-retinal (AT) と all-trans-retinyl ester (AT ester) は経時的に減少し、これとは反対に 11-cis-retinal (CR) は増加した。各条件ともに 4 眼 4 匹で実験を行った。データは平均値 ± 標準偏差を表す。

—□— : SD (AT + ATester) —■— : SD (CR)
 —◇— : RCS (AT + ATester) —◆— : RCS (CR)
 —○— : P23H (AT + ATester) —●— : P23H (CR)
 —△— : S334ter (AT + ATester) —▽— : S334ter (CR)

および順応におけるロドプシンリン酸化および脱リン酸化能、④ 光トランスダクションの最終反応である cGMP 代謝について網羅的に検討した。

1) レチノイドサイクルにおけるレチノイドの解析

上述のごとく視細胞中でロドプシンの光褪色により生じた all-trans-retinal が RPE で all-trans-retinyl ester としていったん貯蔵され、暗室中で再び 11-cis-retinal (CR) へと変換される (図 3) ので、明室では 11-cis-retinal は減少し、all-trans-retinal と all-trans-retinyl ester は増加する。逆に暗室条件では 11-cis-retinal は増加し、all-trans-retinal と all-trans-retinyl ester は減少する。そこでこのような変化が動物モデルでみられるかを調べるために、網膜から有機溶媒を用いてレチノイドを抽出し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で各レチノイドの分析をした。本解析により主なレチノイドである 11-cis-retinal と all-trans-retinal および all-trans-retinyl ester はきれいに分離され、両者の比較ができることが判明した (図 5)。そこで RCS ラット, P23H ラットおよび S334ter ラットを用いて 650 lux の明室条件より暗順応を行い時間経過によるレチノイドの比率を検討したところ、いずれのモデルにおいても正常ラットであ

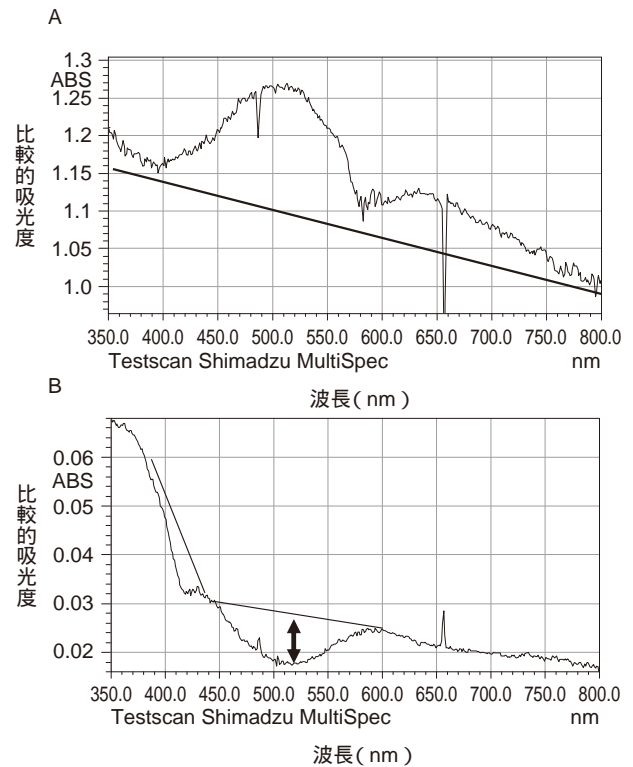


図 7 ロドプシンの光褪色における吸収スペクトルの特徴。

A : 感光されていないロドプシンは 500 nm に吸収ピークをもつ特徴ある吸収スペクトルパターンを示す (波形)。光照射により褪色中間体に変化すると吸収特性が変化し、500 nm の吸収ピークが消失する (ベースライン)。B : 種々の光条件 (感光したものとしていないロドプシンが含まれる) で網膜を取り出しベースラインを記録し、その後完全褪色させ吸収スペクトルを測定すると感光していないロドプシンのみが 500 nm の吸収量が低下するためにこの位置で下に凸の吸収スペクトルとなる。その吸収差 (矢印) をロドプシンのモル吸収係数で除することにより最初に含まれていたロドプシン量を計測した。

る Sprague-Dawley (SD) ラットと同様に光照射によって増加した all-trans-retinal と all-trans-retinyl ester は経時的に減少し、これとは反対に 11-cis-retinal は増加した (図 6)。つまりこれらのモデルではレチノイドサイクルは正常に機能していることが予想された。

2) ロドプシンの褪色能の解析

分光学的にロドプシンは感光されていない状態では 500 nm に吸収ピークをもつ特徴ある吸収スペクトルパターンを示す (図 7)。光照射により褪色中間体に変化すると吸収特性が変化し、500 nm の吸収ピークが消失する¹⁵⁾。この 500 nm における吸収差により感光されていないロドプシン量を計算することができる。しかし明順応におけるロドプシン褪色率の検討は m/sec という非常に速い反応であり、本研究のようなモデル動物を用いた実験系では非常に困難である。そこで分単位の遅い反

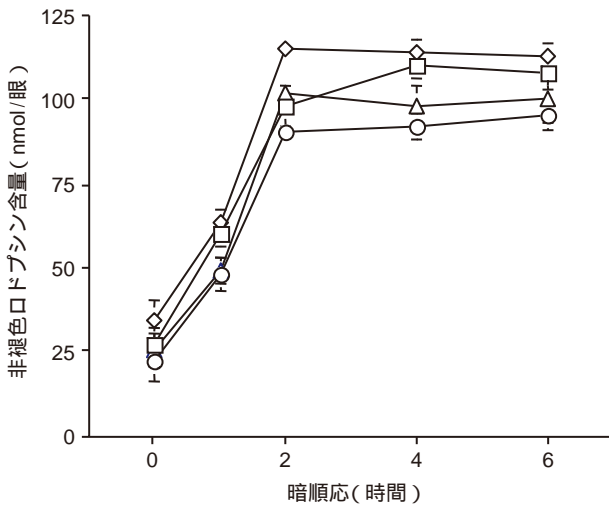


図 8 暗順応時における網膜変性モデルのロドプシン再生能。

正常ラット (Sprague-Dawley ; SD ラット) およびモデルラット (Royal College of Surgeons ; RCS ラット, P23H ラットおよび S334ter ラット) を 650 lux の明室条件より暗順応を行い時間経過によるロドプシン再生能を検討した。検討したすべてのラットにおいてロドプシンは約 2 時間で再生した。方法は各光条件でラットから眼球を摘出したものを 1 個につき 1 ml の 10 mM hepes buffer, pH7.5, 2 mM octylglucoside 中でホモゲナイズし、吸収スペクトルを測定した。その後 10 mM hydroxylamine を加えて 150 w ランプの下で完全褪色させ、再び吸収スペクトルを測定し、両者の吸収差より非褪色ロドプシン量を計算した。各条件ともに 5 眼 5 匹で実験を行った。データは平均値 ± 標準偏差を表す。

—□— : SD ラット —○— : P23H ラット
—◇— : RCS ラット —△— : S334ter ラット

応である暗順応時のロドプシンの再生のレベルを検討した。具体的には種々の光条件(感光したものとしていないロドプシンが含まれる)で網膜を取り出しベースラインを記録し、その後完全褪色させ吸収スペクトルを測定すると、感光していないロドプシンのみの 500 nm の吸収量が低下するためにこの位置で吸収スペクトルパターンは下に凸の波形となる。したがってこれらの吸収差をロドプシン 500 nm におけるモル吸光係数で除して計算することにより、最初の光条件において褪色していないロドプシンの量が正確に計算できる。この方法により RCS ラット, P23H ラットおよび S334ter の暗順応条件におけるロドプシンの再生率を調べたところ、いずれのモデルラット網膜においても正常の SD ラットと同様にロドプシンが約 2 時間程度で再生した(図 8)。

3) ロドプシンのリン酸化および脱リン酸化能の解析

ロドプシンは光条件下でロドプシンキナーゼにより特異的にリン酸化され、暗室条件で、PP2A という酵素により脱リン酸化されるという可逆反応を受ける¹⁶⁾。ロドプシン分子におけるリン酸化部位は、C 末端の 334,

338, 343 の 3 つのセリン残基¹⁷⁾(図 9)で、今回これらのリン酸化部位に生じる変化をピンポイントで検討するために、各セリン残基のリン酸化を特異的に認識する抗体を合成ペプチドを用いて調製し、ウサギに免疫して作製した¹⁸⁾。ELISA 法で調べたところ、得られた 3 種類の抗体は各部位のリン酸化を特異的に認識しうる抗体で、いずれもウエスタンブロッティングで蛋白質におけるリン酸化を認識できることが判明した。そこでこれらの抗体を用い、明室条件によりロドプシンのリン酸化の様子がどのように変化するかを調べた(図 10)。光照射した直後の視細胞外節は抗体により全体が染色された。その後暗順応した際には時間経過とともに染色が外節の基底部より先端に向かって消失する様子が観察された。これは光依存的に起こったロドプシンリン酸化が外節基底部より先端に向かって順に脱リン酸化されていることを示している。リン酸化されたロドプシンは光に対して感受性をもたないため、暗室条件では視細胞外節すべてが光感受性をもち最も感度が良いと考えられる。光に曝された外節ではほとんどがリン酸化されるので最も感度が低くなり、次に再び暗室条件で外節の基底部より脱リン酸化されると感度が少しずつ回復していくと考えられる(図 11)。これはすなわちロドプシンのリン酸化および脱リン酸化の様子が視細胞における暗順応の過程と一致し、両者が密接な関係にあることを示している。そこでロドプシンリン酸化を特異的に認識する抗体を用い、光条件の異なる網膜を免疫染色し、染色された外節の長さを計測することにより各種モデル動物における視細胞順応の状態や異常の有無を推測した。650 lux の通常の明視条件から暗順応した際には、正常ラットである Brown-Norway (BN) ラットおよび SD ラットでは数時間で脱リン酸化が終了するのに比べ、P23H ラットおよび RCS ラット¹⁸⁾では数日もかかり、P23H ラットおよび RCS ラットでは暗順応機構が著しく障害されていることが示された(図 12)。さらに光傷害モデルでもロドプシンは脱リン酸化の遅延がみられた¹⁹⁾(図 13)。一方、S334ter ラットのロドプシンはリン酸化部位を欠いているため全くリン酸化反応はみられなかった(図 14)。これらに加え、以前我々のグループでロドプシンリン酸化を検討したところ、対照に比べ CAR モデルラットではリン酸化率の著明な増加を報告している²⁰⁾。さらにまたロドプシンリン酸化近傍である C 末端の 345 V (345 番目のバリン)と 347 P (347 番目のプロリン)の位置に遺伝子変異をもつロドプシンのリン酸化能を、人工的に合成した C 末端ペプチドを用いて検討した結果、正常に比べこれら変異をもつペプチドのリン酸化が有意に亢進していることが分かっている²¹⁾。上記の検討をまとめると、各動物モデルにおいてレチノイドサイクル、ロドプシン光褪色能には異常がみられないが、ロドプシンリン酸化による制御機構に異常を来していることが判明した

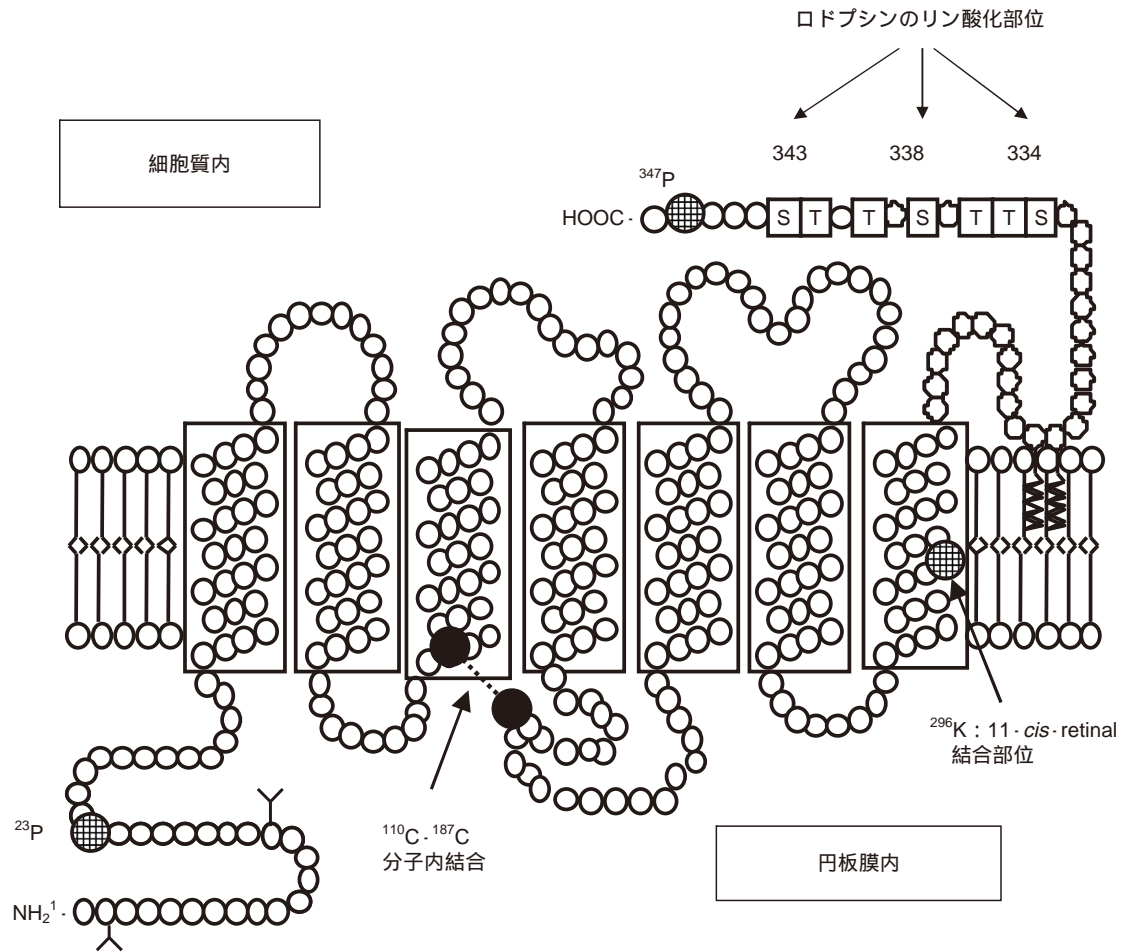


図 9 ロドプシンリン酸化部位。
 主要なロドプシンリン酸化部位は C 末端の 3 つのセリン残基(334Ser, 338Ser および 343Ser)である。

(表 2).

4) cGMP 代謝の検討

上述のごとく cGMP は視興奮におけるセカンドメッセンジャーといわれ、これが直接 cGMP 依存性チャンネルの開閉を制御する非常に重要な因子である。したがって cGMP 濃度を調べることにより生化学的に網膜視細胞全体の機能を推測することができる。P23H ラットおよび RCS ラットなどのロドプシンリン酸化が亢進するものでは、信号停止の状態が続くため PDE の活性化が低下し、また *rd* マウスでは PDE の活性化能が先天的に傷害されているため cGMP 濃度が増加すると予想される。一方、S334ter ラットのようにロドプシンがリン酸化されないものでは PDE 活性化が亢進し、結果として cGMP 濃度は減少すると予想される。そこで 650 lux の明室条件より暗順応すると、予想どおり SD ラットに比べて P23H ラットおよび RCS ラットでは cGMP 濃度増加が速く、逆に S334ter ラットでは遅い傾向にあることが判明した(図 15)。以上の結果を総括すると今回調べた 6 種類の網膜変性モデルに共通に存在する視細胞機能異常として明暗順応を制御する機構に異常(ロドプシンリン酸化、脱リン酸化の傷害)があり、これによ

り視細胞機能が正常に維持できなくなった結果最終的に網膜が変性する可能性が示唆された(表 2)。

今回の我々の結果を支持するものとして Sanberg らの論文がある²²⁾。すなわち 3 名の網膜色素変性患者の網膜電図(rod a-wave)が、ネコの網膜に PDE 阻害剤である IBMX (isobutylmethylxanthine) という薬剤で内因性の PDE を完全に阻害し、さらに cGMP で灌流することで cGMP 過剰状態にして記録した網膜電図ときわめて類似していたことから、ヒト網膜色素変性患者においても cGMP 濃度の増加があると考察している。これに加えて、我々が日常診察している網膜色素変性患者の初発症状に暗順応の低下、夜盲がある。これは今回動物モデルでみられた順応や光感受性を司るロドプシンリン酸化および脱リン酸化の異常を強く示唆するものである。

Ⅲ 網膜変性症における網膜障害機序に基づいた薬物治療法の可能性

作業仮説として、完全に網膜視細胞が変性してしまう前段階としての順応低下などの機能障害を、何らかの薬物で是正することができれば網膜変性の進行を遅らせることができるのではないかと考え、以下の薬剤で検討を

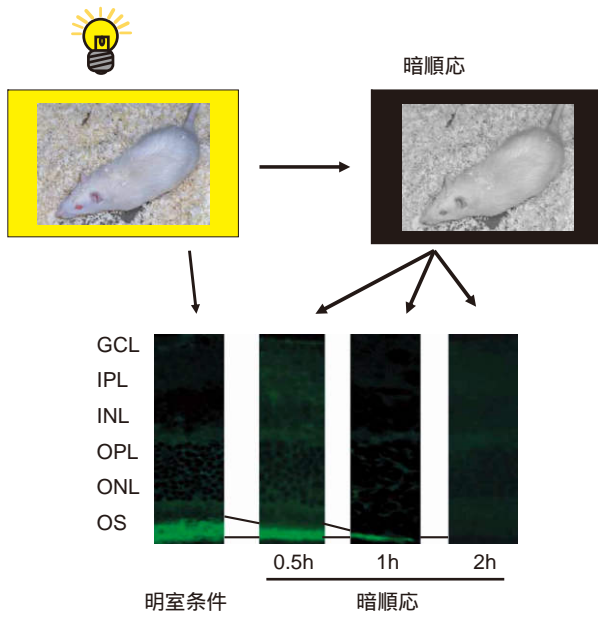


図 10 暗順応時におけるロドプシン脱リン酸化の様子。リン酸化 338Ser を特異的に認識する抗体を用いて正常ラットが暗順応する際のロドプシンリン酸化の様子を免疫染色で検討した。明順応時には抗体により視細胞外節全体が染色されたが暗順応の時間経過とともに外節基部より先端に向かって徐々に染色が消失していった。GCL : ganglion cell layer, IPL : inner plexiform layer, INL : inner nuclear layer, OPL : outer plexiform layer, ONL : outer nuclear layer, OS : outer segment.

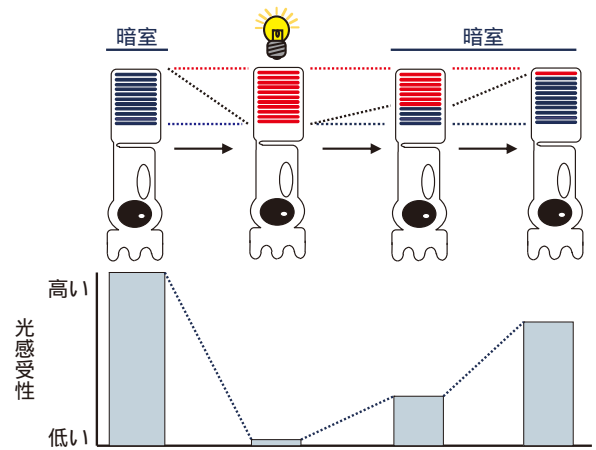


図 11 ロドプシンリン酸化・脱リン酸化の生理的意義。リン酸化されたロドプシンは光に対して感受性をもたないので、暗室条件では視細胞杆体外節すべてが光感受性をもち最も感度が良いと考えられる。次に光に当たると外節のほとんどがリン酸化されるので最も感度が低くなり、次に再び暗室条件で外節の基部より脱リン酸化されると感度が少しずつ回復していくものと思われる。これはすなわちロドプシンのリン酸化および脱リン酸化の様子が視細胞における暗順応の過程と一致し、両者が密接な関係にあることを示している。

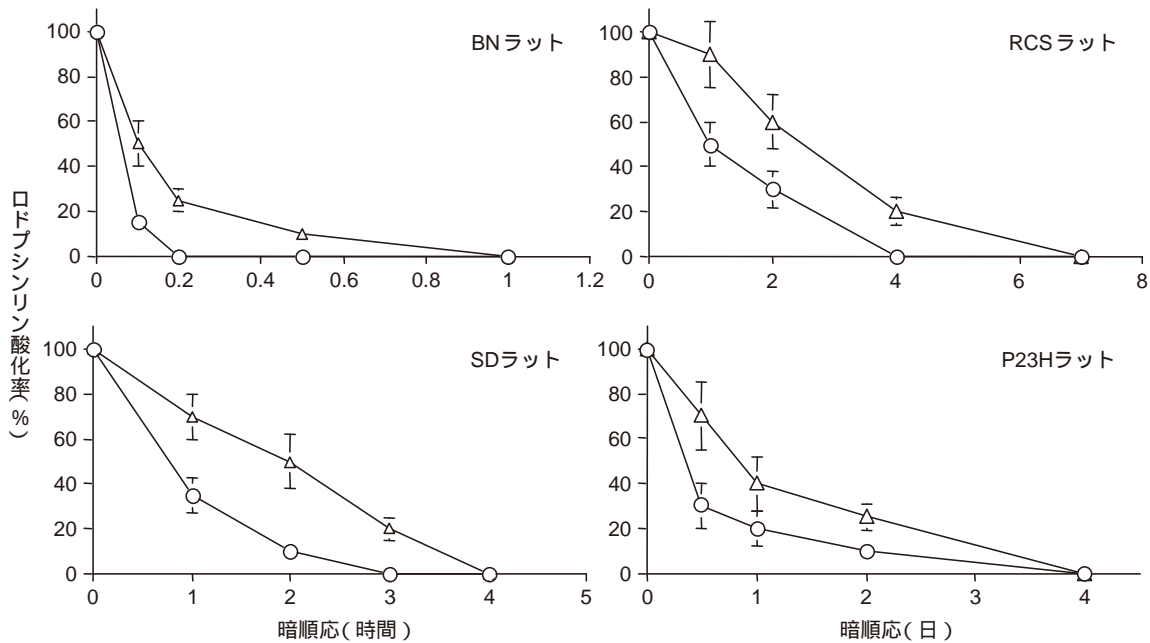


図 12 RCS ラットおよび P23H ラットを用いたロドプシンリン酸化能の検討。抗リン酸化ロドプシン抗体を用いて暗順応時におけるロドプシン脱リン酸化の様子を検討した。方法は 650 lux の明室条件より暗順応を行い時間経過により網膜を固定、パラフィン切片を作製し、リン酸化 338Ser または 334Ser に対する抗体で免疫染色した。各条件におけるロドプシンリン酸化率は、視細胞杆体外節の長軸における染色陽性の長さの比率を測定することにより算出した。正常ラット SD (Sprague-Dawley) または BN (Brown-Norway) ラットでは数時間のうちにロドプシンのリン酸化 338Ser または 334Ser の脱リン酸化が完結したのに対して RCS ラットおよび P23H ラットでは数日かかった。各条件ともに 5 眼 5 匹で実験を行った。データは平均値 ± 標準偏差を表す。

—○— : リン酸化 338Ser —△— : リン酸化 334Ser

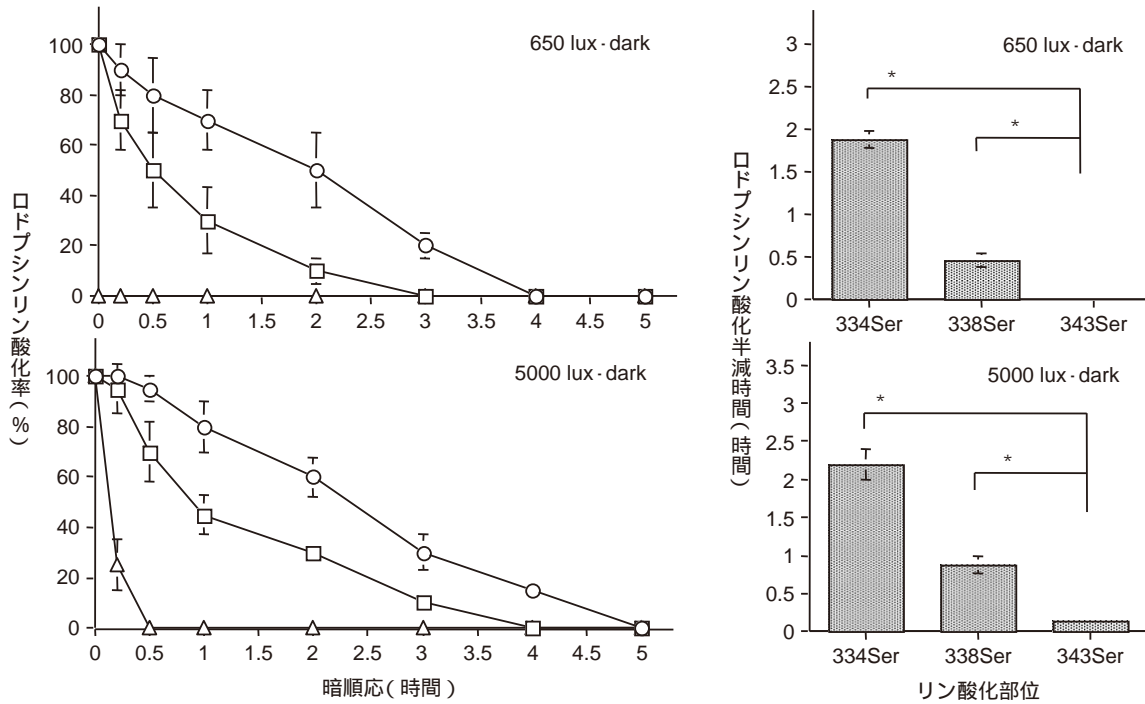


図 13 光傷害ラットを用いたロドプシンリン酸化能の検討.

抗リン酸化ロドプシン抗体を用いて暗順応時におけるロドプシン脱リン酸化の様子を検討した. 正常ラット SD (Sprague-Dawley) または BN (Brown-Norway) ラットを用いて 650 lux または 5000 lux, 24 時間光傷害を加えた. これらを直ちに暗順応し, 時間経過でリン酸化 334Ser, 338Ser または 343Ser の脱リン酸化の様子を図 12 に示す方法で検討した (左). —○—: リン酸化 334Ser, —□—: リン酸化 338Ser, —△—: リン酸化 343Ser. また右図には各リン酸化部位の脱リン酸化が 50% に達する時間をプロットした. 各光傷害条件でロドプシン脱リン酸化が 3 箇所部位で有意に差があることが分かった. 各条件ともに 5 眼 5 匹で実験を行った. データは平均値 ± 標準偏差を表す. *: $p > 0.01$ (Mann-Whitney test).

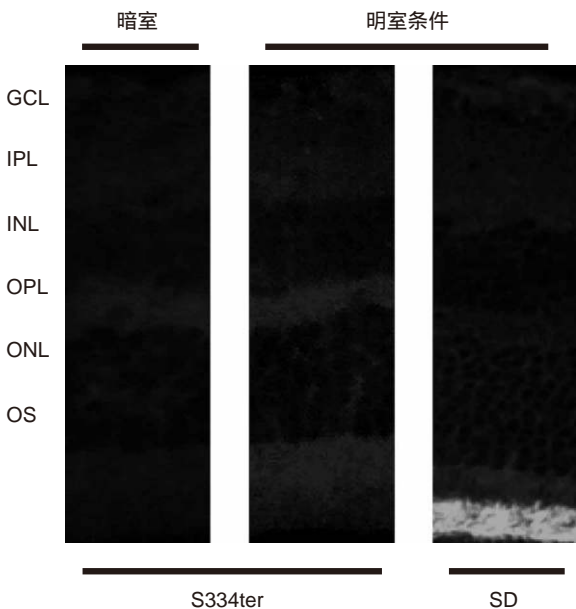


図 14 S334ter ラットを用いたロドプシンリン酸化能の検討.

抗リン酸化ロドプシン抗体を用いたロドプシンリン酸化の検討で S334ter ラット網膜に反応性はみられずリン酸化が起きていないことが判明した. 各条件ともに 3 眼 3 匹で実験を行い同様の結果を得ている.

行った. すなわち, 機能異常としての順応障害を是正し, 網膜変性阻止効果を期待できる薬物として ① 視細胞における機能是正を目指した薬剤, ② RPE における是正を目指した薬剤, および ③ それ以外の薬剤の 3 つの可能性を考えた.

1. 視細胞における機能是正を目指した薬剤

上述の動物モデルでみられたロドプシンリン酸化亢進により視興奮停止状態が続くと, 結果として cGMP 依存性チャンネルが解放状態となり細胞内カルシウム濃度が増加し, カルシウム依存的な細胞傷害が引き起こされると予想される. そこで視細胞杆体外節の cGMP 依存性チャンネルからのカルシウム流入増加を抑える手段として, 視細胞杆体内節にある電位依存性カルシウムチャンネルをカルシウムチャンネルブロッカーでブロックすることにより, カルシウム依存的な細胞傷害の抑制および順応機能の改善ができないかと考えた. 臨床的に使用される主なカルシウムチャンネルブロッカーとしてフェニルアルキルアミン系, ベンゾチアゼピン系, ジヒドロピリジン系がある. これらのうち最も多く臨床で使用されているジヒドロピリジン系の中でニルバジピンに注目した. その理由としてニルバジピンは脳血管選択性が高く²³⁾, 脂溶性も高いため²⁴⁾, より網膜視細胞に浸透する

表 2 動物実験のまとめ

検討項目	RCS ラット	P23H ラット	S334ter ラット	光傷害ラット	rd マウス	CAR ラット
全視野刺激網膜電図組織	a ↓, b ↓	a ↓, b ↓	a ↓, b ↓	a ↓, b ↓	a ↓, b ↓	a ↓, b ↓
レチノイドサイクル(暗順応時)	正常	正常	正常	—	—	—
ロドプシン再生率(暗順応時)	正常	正常	正常	—	—	—
ロドプシン脱リン酸化能(暗順応時)	遅延	遅延	リン酸化せず	遅延	—	遅延
cGMP 濃度(暗順応時)	増加	増加	減少	—	増加 [#]	—

—：実験データなし，[#]：以前の論文で報告されている(文献 13)

RCS：Royal College of Surgeons, rd：retinal degeneration, CAR：cancer-associated retinopathy.

可能性があると考えたからである。そこで網膜変性モデルに対してニルバジピンを含む種々のカルシウムチャンネルブロッカーの効果を網膜電位図により機能評価したところ、ニルバジピンが rd マウス²⁵⁾ および RCS ラット²⁶⁾ の両方の網膜変性に対して有効であることが示された(図 16)。さらにニルバジピンは、効果に差はみられたものの他の P23H, S334ter, 光傷害および CAR ラット網膜変性²⁷⁾ に対して有効であることが判明した(図 17)。

そこで、ニルバジピンの網膜変性阻止効果についてさらに詳しく調べる目的で、DNA microarray を用いて検討した²⁸⁾。その結果ニルバジピン投与によって増加した遺伝子群の中には、種々の成長制御遺伝子やアポトーシス関連遺伝子などが含まれていた(表 3)。その中でも非常に興味深いものとして FGF2(fibroblast growth factor 2)²⁹⁾ および Arc (activity-regulated cytoskeleton-associated protein)³⁰⁾ があげられる。これらの因子はそれぞれ網膜および神経系でアポトーシスを抑制する因子であり、ニルバジピンの網膜変性阻止効果に深くかかわる可能性があると考えられた。実際にニルバジピンを投与したラットの網膜では FGF2, Arc が蛋白質レベルでも増加していた(図 18)。しかしニルバジピンの薬効には血管拡張による血流増加作用もあるため、これによる二次的な効果という可能性も否定できなかった。そこで血流などの影響を排除した新しい細胞培養系での assay を用いた検討を行った。最近開発されたエンドサイトーシスを利用して細胞外の蛋白質などを細胞内に導入する新しいバイオポーターを用い、網膜由来の網膜芽細胞腫に対してアポトーシスを引き起こす実行因子であるカスパーゼ 3 を導入することにより意図的にアポトーシスを誘導できるかを検討した。フローサイトメトリーで検討すると、アポトーシスでみられる信号はカスパーゼ 3 とバイオポーターの両方が存在したときのみみられ、カスパーゼ 3 がバイオポーターにより細胞内に取り込まれたことが示された(図 19)。次にこの細胞傷害系を用いてニルバジピンの効果を検討したところ、ニルバジピンが網膜芽細胞腫のカスパーゼ 3 依存的細胞傷害を濃度依存的に抑制した(図 20)。また細胞外からカルシウムを除くとその効果が消失したことから、このニルバジピンの

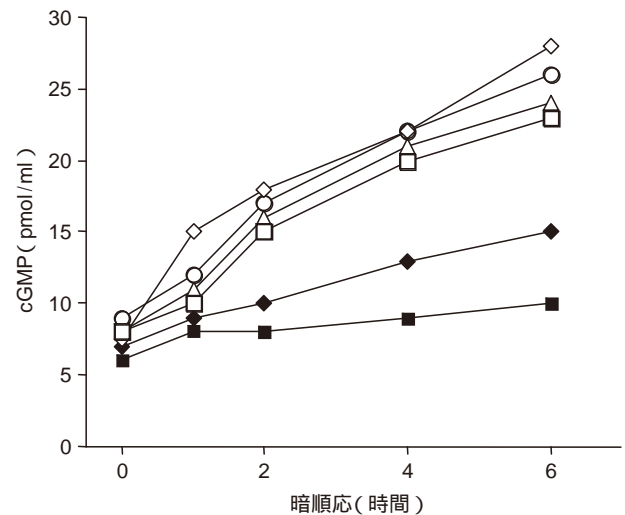


図 15 暗順応時における RCS ラット, P23H ラットおよび S334ter ラットを用いた網膜内 cGMP 濃度変化の検討。

暗順応時における網膜内 cGMP 濃度変化を ELISA キットを用いて検討した。正常ラット(Sprague-Dawley; SD ラット)に比べ、RCS(Royal College of Surgeons)ラット, P23H ラット(ホモおよびヘテロ)の cGMP 濃度回復が早いのにに対し、S334ter ラット(ホモおよびヘテロ)では遅延していた。各条件ともに 2 眼 2 匹で 1 回の実験を行い 3 回繰り返した。データは平均値を表す。

- ：SD ラット
- ◇—：RCS ラット
- ：P23H ホモラット
- △—：P23H ヘテロラット
- ：S334ter ホモラット
- ◆—：S334ter ヘテロラット

効果はカルシウムチャンネルを抑えることによるものであることが示された。したがって、この結果はニルバジピンが網膜変性以外の網膜神経細胞にアポトーシスを引き起こす疾患、例えば緑内障などに対しても共通に効果がある可能性を示唆している。実際にニルバジピンが実験的あるいは臨床的に緑内障の視野障害進行を抑えることが報告されている³¹⁾³²⁾。

2. RPE における機能是正を目指した薬剤

上述のようにロドプシンリン酸化亢進により感受性の

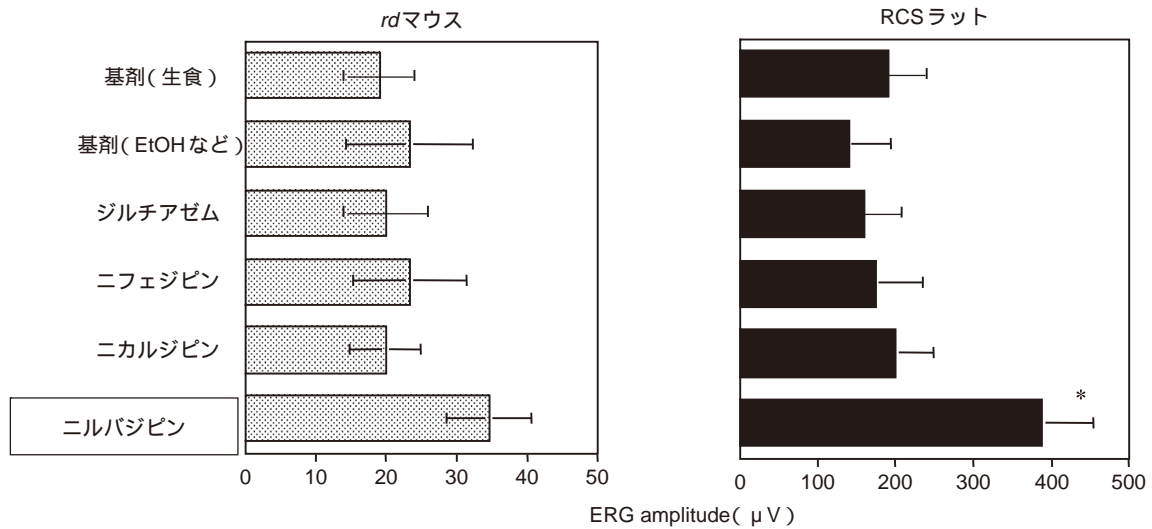


図 16 各種カルシウムチャンネルブロッカーの rd マウスおよび RCS ラット網膜変性に対する影響。
 rd (retinal degeneration) マウス (生後 9 日) および RCS (Royal College of Surgeons) ラット (生後 4 週) に種々のカルシウムチャンネルブロッカーおよびそれらの基剤を 1 週間腹腔内投与したところ、他に比べてニルバジピンを投与した rd マウスおよび RCS ラットでは網膜電図の波形の障害の程度が軽度であった。各条件ともに 10 眼 10 匹で実験を行った。データは平均値 ± 標準偏差を表す。* : p < 0.01 (Mann-Whitney test)。

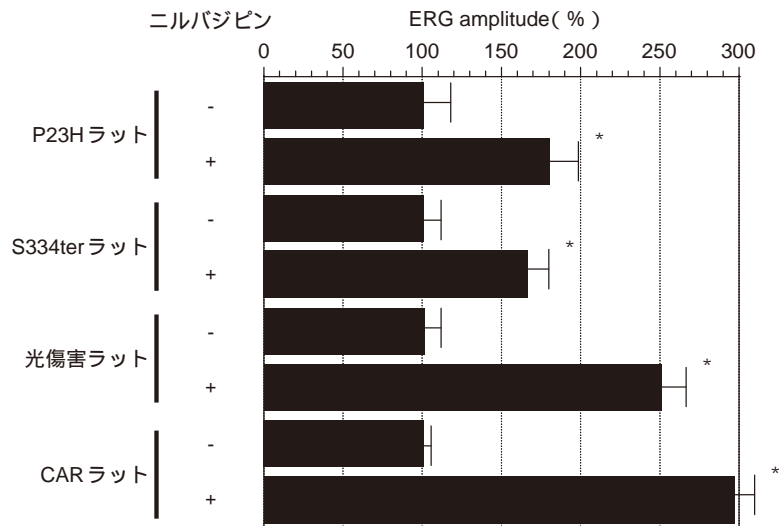


図 17 ニルバジピンの P23H ラット、S334ter ラット、光傷害ラットおよび CAR モデルラット網膜変性に対する影響。
 ニルバジピンを投与したところ、P23H ラット、S334ter ラット、光傷害ラットおよび CAR (cancer-associated retinopathy) モデルラットすべてで基剤に比べ網膜電図の波形の障害の程度が軽度であった。各条件ともに 10 眼 10 匹で実験を行った。データは平均値 ± 標準偏差を表す。
 * : p < 0.01 (Mann-Whitney test)。

あるロドプシンの量が相対的に減少することによって順応低下が引き起こされると考えられるので、この機能異常を是正するには RPE におけるレチノイドサイクルでもたらされる光感受性ロドプシンの量を増やせばよいと予想される (図 3)。類似の例として Leber 先天盲という重度の先天異常の中にレチノイドサイクルの中の all-trans-retinyl ester から 11-cis-retinol に変換する際に必須な RPE65 という RPE 特異蛋白質をコードする遺伝子

が欠損し 11-cis 型レチノイドが産生されなくなる異常がある。これに対して Van Hooser らは RPE65 が欠損している遺伝子操作マウスに 11-cis と同様の効果を有する 9-cis-retinal を食事中に加えたところ網膜電図の波形が回復したと報告している³³⁾。したがって、類似の原理で他の網膜変性に対しても活性化型のレチノイドを補充することによりロドプシンの再生能が亢進する可能性が予想された。そこでビタミン A より合成されるレチノイド

表 3 ニルバジピン投与にて変化した遺伝子(Royal College of Surgeons ; RCS ラット)(DNA microarray による)

発現低下した遺伝子	機能	発現上昇した遺伝子	機能
CD45 antigen	Apoptosis	Fibroblast growth factor 2(FGF2)	Possible therapeutic factor for RCS retinal degeneration
ErbA proto-oncogene	Apoptosis	Activity-regulated cytoskeleton-associated protein(Arc)	Immediate early genes
Janus tyrosine protein kinase 2 (JAK2)	Apoptosis	Transducin β subunit	Phototransduction
Tumor necrosis factor α	Apoptosis	Neural visinin-like protein2	Ca ²⁺ metabolism
Cytochrome P450 XXVII	Oxidative metabolism	Neural visinin-like protein3	Ca ²⁺ metabolism
Cytochrome P450 IIC11	Oxidative metabolism	Endoplasmic reticulum Ca ²⁺ ATPase	Ca ²⁺ metabolism
Ca ²⁺ channel β 3 subunit	Ca ²⁺ metabolism	V-erbA related protein	Transcription factor
ADP-ribosyl cyclase 1	Ca ²⁺ metabolism	NF-kapper B transcription factor	Transcription factor
Voltage-gated K channel 3.4	Potassium channel	GABA receptor α 1 subunit	Neurotransmitter receptor
Taurine transporter	Possible neuroprotective factor	GABA receptor pi subunit	Neurotransmitter receptor
Apolipoprotein B mRNA editing protein	Plasma lipoprotein Risk factor for atherosclerosis	NMDA receptor 2A	Neurotransmitter receptor
GABA receptor γ 3 subunit	Neurotransmitter receptor	Glutamate receptor 6	Neurotransmitter receptor
Opioid receptor delta1	Neurotransmitter receptor	Goasubunit	Signal transduction
Somatostatin receptor 4	Neurotransmitter receptor	Mitogen-activated protein(MAP) kinase 9	Signal transduction
Vasopression V2 receptor	Hormonal, hypertension-related	MAP kinase kinase 5	Signal transduction
Mineralocorticoid receptor	Hormonal, hypertension-related	Protein kinase C α	Signal transduction
Renin	Hormonal, hypertension-related	Protein kinase C δ	Signal transduction
Glypican 1	Extracellular matrix, Regulator of FGF2	Ral B	Ras-related GTP binding protein

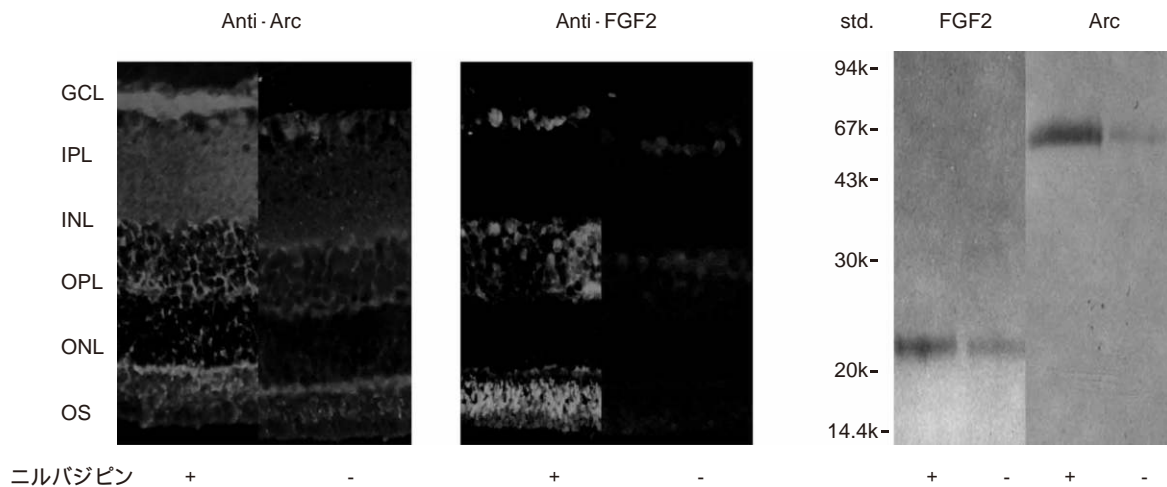


図 18 ニルバジピン投与による網膜内 Arc および FGF2 発現増加。

SD(Sprague-Dawley)ラットに2週間ニルバジピンを投与したところ、基剤に比べて免疫組織およびウエスタンブロッティングで Arc (activity-regulated cytoskeleton-associated protein) および FGF2 (fibroblast growth factor 2) 発現増加がみられた。各条件ともに3眼3匹をそれぞれ免疫組織およびウエスタンブロッティングの実験に用い、同様の結果であった。

(all-trans retinal, 13-cis-retinal, 9-cis-retinal)を RCS ラット, P23H および S334ter ラットに2週間経口投与し、網膜電図による機能評価と組織学的な評価を行った。その結果、レチノイドも種によって P23H および S334ter ラットに対して機能保護効果が期待されることが判明した(図 21)。

3. その他の薬剤

もう一つの可能性として暗順応改善効果が期待されて

いるアントシアニンがあるが、最近カエルの網膜でアントシアニンがロドプシン再生率を向上させたことが報告されている³⁴⁾。そこでこれが光感受性ロドプシン量を増やす可能性があるか検討した。ブラックカラントという果実には4種類のアントシアニンが豊富に含まれており、その成分が分子レベルで詳しく検討されているためブラックカラントより抽出されたアントシアニンを RCS ラット, P23H ラットおよび S334ter ラットに毎日

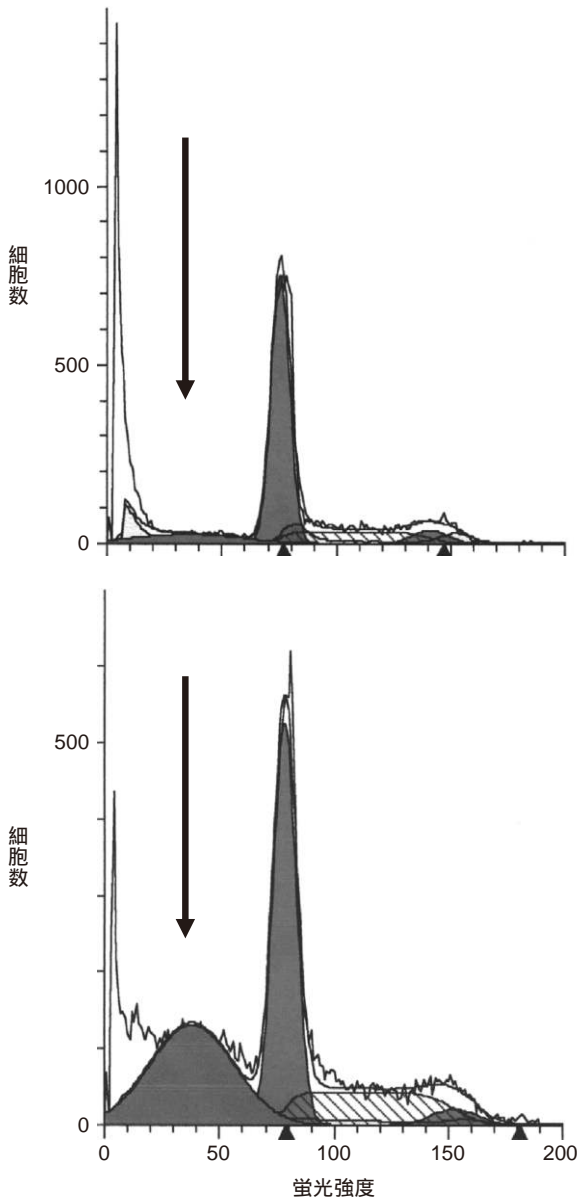


図 19 バイオポーターによるカスパーゼ 3 細胞導入によるアポトーシスの誘導。
網膜芽細胞腫をカスパーゼ 3 のみ(上図)またはカスパーゼ 3 およびバイオポーター(下図)でインキュベートした。アポトーシス(矢印)は両者でインキュベートしたときのみで誘導された。アポトーシスの検出には細胞のヨウ化プロピジウム染色によるアポトーシス検出法³⁵⁾を用いフローサイトメトリーで行った。各条件とも 3 回実験を繰り返し、同様の結果であった。

2 週間経口投与し、網膜電図による機能評価と組織学的な評価を行った。その結果、アントシアニンは RCS ラットの網膜電図波形を若干改善した(図 22)。

以上総括するとニルバジピンは今回試した 6 種類いずれのモデルに対しても有効性を示し、臨床応用する価値があるものと考えられたのに対し、レチノイドやアントシアニンは一部のモデルに補助効果を期待できるものさらなる検討が必要と思われた。

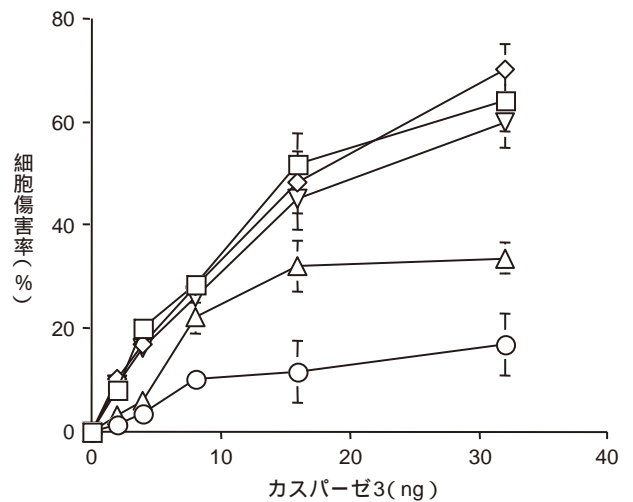


図 20 カスパーゼ 3 細胞導入によりアポトーシスが誘導された網膜芽細胞腫に対するニルバジピンの効果。
カスパーゼ 3 細胞導入によりアポトーシスが誘導された網膜芽細胞腫に対するニルバジピンの効果は、MTT 比色定量法キット(コスモバイオ社製、東京)を用いて細胞傷害の程度を検討した。カスパーゼ 3 細胞導入による細胞傷害は濃度依存的で、これは濃度依存的にニルバジピンにより抑制された。またニルバジピンの効果は細胞外カルシウム除去により消失した。各条件とも 3 回実験を繰り返した。

- : 0 μM ニルバジピン
- ◇ : 100 μM ニルバジピン (Ca²⁺ free medium)
- : 100 μM ニルバジピン
- △ : 10 μM ニルバジピン
- ▽ : 1 μM ニルバジピン

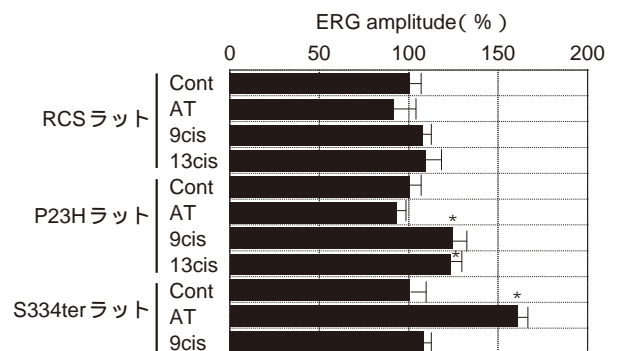


図 21 レチノイドの網膜変性モデルに対する効果。
レチノイド(all-trans-retinal, 13-cis-retinal, 9-cis-retinal)を RCS (Royal College of Surgeons) ラット, P23H ラットおよび S334ter ラットに 2 週間経口投与し、網膜電図による機能評価を行った。基剤(オリーブオイル)に比べレチノイドの種によって P23H ラットまたは S334ter ラットの一部分で網膜電図の波形の障害の程度が軽度であったものがみられた。各条件ともに 10 眼 10 匹で実験を行った。データは平均値 ± 標準偏差を表す。* : p < 0.05 (Mann-Whitney test)。Cont : olive oil, AT : all-trans-retinal, 9cis : 9-cis-retinal, 13cis : 13-cis-retinal。

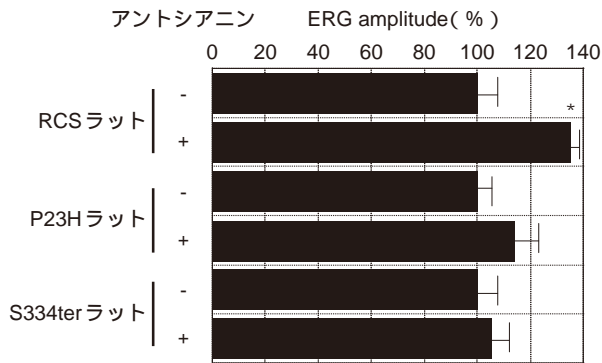


図 22 ブラックカラントより抽出されたアントシアニンの網膜変性モデルに対する効果。

ブラックカラントより抽出されたアントシアニンを RCS (Royal College of Surgeons) ラット, P23H ラット および S334ter ラットに 2 週間経口投与し, 網膜電図による機能評価を行った。基剤に比べアントシアニン投与したものは網膜電図の波形の障害の程度が若干軽度であった。各条件ともに 10 眼 10 匹で実験を行った。データは平均値 \pm 標準偏差を表す。* : $p < 0.05$ (Mann-Whitney test)。

IV おわりに

今まで網膜色素変性に対する薬物治療は不可能と考えられてきたが, 今回モデル動物を用いた検討によりニルバジピン, レチノイド, アントシアニンなどを用いることで進行が阻止される可能性が見出された。本症は非常に緩徐に年単位で進行する疾患であり, 治療効果の判定には長期間の経過観察が必要であることは言うまでもないが, 今回の動物実験は将来の根本的な治療の開発につながるものであることを願っている。なお, 本総説の内容は第 109 回日本眼科学会総会宿題報告で発表した。

本研究遂行のため, 動物実験および網膜電図を用いた機能的解析は山崎仁志助手, 石川 太助手, 高野淑子大学院生, 宮川靖博大学院生, 伊藤 忠大学院生, 形態学的研究は大黒幾代講師, 目時友美大学院生, 分子生物学的研究は間宮和久助手, 培養細胞は蝦名祐一氏, DNA microarray による研究は佐藤元哉先生が担当した。トランスジェニック動物の提供, 生化学的解析のために協力して下さった K. Palczewski 博士, 前田忠郎博士, 前田亜希子博士, M. LaVail 博士, T. Redmond 博士, また臨床的検討のために貴重な症例を紹介していただきました青森県眼科医会の諸先生および弘前大学眼科の諸先生, ならびに本研究遂行のすべてにわたりご指導を賜りました弘前大学眼科中澤 満教授に心から感謝いたします。

文 献

- 1) 大黒 浩, 前田忠郎, 柳橋さつき, 宮川靖博, 丸山幾代, 中澤 満 : 網膜色素変性の分子病態. 日眼会

- 誌 106 : 461—473, 2002.
- 2) 佐藤元哉, 大黒 浩 : ミトコンドリア病 : 片側萎縮, 精神発達遅滞, 網膜色素変性症, 前庭機能異常, 筋力低下. 日本臨床増刊号 : 667—669, 2002.
- 3) Soeft SV, Westerveld A, Dejong PTVM, Bleeker-Wagemakers EM, Bergen AAB : Retinitis Pigmentosa : Defined from a molecular point of view. *Surv Ophthalmol* 43 : 321—334, 1999.
- 4) Maeda T, Maeda A, Maruyama I, Nakazawa M, Ohguro H : Molecular mechanisms in quenching pathway of vertebrate and invertebrate photoreceptor cells. In : *Recent Res Dev Photochem Photobiol*, vol. 5, Transworld Research Network, Trivandrum, 175—180, 2001.
- 5) Lagnado L, Baylor D : Signal flow in visual transduction. *Neuron* 8 : 995—1002, 1992.
- 6) 大黒 浩 : ロドプシンのリン酸化脱リン酸化の生理的意義と疾病との関係. 日眼会誌 100 : 575—581, 1996.
- 7) Sarri JC : Retinoids in photosensitive systems. In : Sporn MB, et al (Eds) : *The retinoids : Biology, Chemistry, and Medicine*, 2nd edition. Raven Press, Ltd., New York, 351—385, 1994.
- 8) Kawamura S : Rhodopsin phosphorylation as a mechanism of cyclic GMP phosphodiesterase regulation by S-modulin. *Nature* 362 : 855—857, 1991.
- 9) Goldman AI, O'Brien PJ : Phagocytosis in the retinal pigment epithelium of the RCS rat. *Science* 201 : 1023—1025, 1978.
- 10) Birch DG, Hood DC, Nusinowitz S, Pepperburg DR : Abnormal activation and inactivation mechanisms of rod transduction in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa and the pro-23-his mutation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36 : 1603—1614, 1995.
- 11) Chen J, Makino CL, Peachery NS, Baylor DA, Simon MI : Mechanisms of rhodopsin inactivation *in vivo* as revealed by a COOH-terminal truncation mutant. *Science* 267 : 374—377, 1995.
- 12) Wenzel A, Grimm C, Samardzija M, Remé CE : Molecular mechanisms of light-induced photoreceptor apoptosis and neuroprotection for retinal degeneration. *Prog Retinal Eye Res* 24 : 275—306, 2005.
- 13) Bowes C, Li T, Danciger M, Baxter LC, Farber DB : Retinal degeneration in *rd* mouse is caused by a defect in the b-subunit of rod cGMP-phosphodiesterase. *Nature* 347 : 677—680, 1999.
- 14) Ohguro H, Ogawa K, Maeda T, Maeda A, Maruyama I : Cancer-associated retinopathy induced by both anti-recoverin and anti-hsc 70 antibodies *in vivo*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 : 3160—3167, 1999.
- 15) Hurley JB : Molecular properties of the cGMP cascade of vertebrate photoreceptors. *Ann Rev Physiol* 49 : 793—812, 1987.
- 16) Palczewski K, Van Hooser JP, Ohguro H : Identification of residues that are phosphorylated

- within a receptor. In : Benovic JL(ed) : Regulation of G-protein coupled receptor function and expression, Wiley-Liss, New York, 69—91, 1999.
- 17) **Ohguro H, Van Hooser JP, Milam AH, Palczewski K** : Rhodopsin phosphorylation and dephosphorylation *in vivo*. J Biol Chem 270 : 14259—14262, 1995.
 - 18) **Ohguro H, Ohguro I, Mamiya K, Maeda T, Nakazawa M** : Prolonged survival of the phosphorylated form of rhodopsin during dark adaptation of royal college surgeons rat. FEBS Lett 551 : 128—132, 2003.
 - 19) **Ishikawa F, Ohguro H, Ohguro I, Yamazaki H, Mamiya K, Metoki T, et al.** : Prolonged rhodopsin phosphorylation in light-induced retinal degeneration in rat models. Invest Ophthalmol Vis Sci 47 : 5204—5211, 2006.
 - 20) **Maeda T, Maeda A, Maruyama I, Ogawa K, Kuroki Y, Sahara H, et al.** : Mechanisms of photoreceptor cell death in cancer-associated retinopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci 42 : 705—712, 2001.
 - 21) **Ohguro H** : High levels of rhodopsin phosphorylation in missense mutations of C-terminal region of rhodopsin FEBS Lett 413 : 433—435, 1997.
 - 22) **Sanberg MA, Miler S, Berson EL** : Rod electroretinograms in an elevated cyclic guanosine monophosphate-type human retinal degeneration. Invest Ophthalmol Vis Sci 31 : 2283—2287, 1990.
 - 23) **Tokuma Y, Fujiwara T, Noguchi H** : Absorption, distribution and excretion of nilvadipine, a new dihydropyridine calcium antagonist, in rats and dogs. Xenobiotica 17 : 1341—1349, 1987.
 - 24) **Ohtsuka M, Ono T, Hiroi J, Esumi K, Kikuchi H, Kumada S** : Comparison of the cardiovascular effect of FR34235, a new dihydropyridine, with other calcium antagonists. J Cardiovasc Pharmacol 5 : 1074—1082, 1983.
 - 25) **Takano Y, Ohguro H, Dezawa M, Ishikawa H, Yamazaki H, Ohguro I, et al.** : Study of effects of calcium channel blockers on retinal degeneration of *rd* mouse. Biochem Biophys Res Commun 313 : 1015—1022, 2004.
 - 26) **Yamazaki H, Ohguro H, Maeda T, Maruyama I, Takano Y, Metoki T, et al.** : Nilvadipine, a Ca²⁺ antagonist, effectively preserves retinal dysfunctions in Royal College Surgeons rat. Invest Ophthalmol Vis Sci 43 : 919—926, 2002.
 - 27) **Ohguro H, Ogawa K, Maeda T, Maruyama I, Maeda A, Takano Y, et al.** : Retinal dysfunction in cancer-associated retinopathy is improved by Ca²⁺ antagonist administration and dark adaptation. Invest Ophthalmol Vis Sci 42 : 2589—2595, 2001.
 - 28) **Sato M, Ohguro H, Ohguro I, Mamiya K, Takano Y, Yamazaki H, et al.** : Study of pharmacological effects of nilvadipine on RCS rat retinal degeneration by microarray analysis. Biochem Biophys Res Commun 306 : 826—831, 2003.
 - 29) **Faktovich EG, Steinberg RH, Yasumura D, Matthes MT, LaVail MM** : Photoreceptor degeneration in inherited retinal dystrophy delayed by basic fibroblast growth factor. Nature 347 : 83, 1990.
 - 30) **Lyford GL, Yamagata K, Kaufmann G, Barnes CA, Sanders LK, Copeland NG, et al.** : Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. Neuron 14 : 433—445, 1995.
 - 31) **山崎芳夫, 早水扶公子, 田中千鶴** : 正常眼圧緑内障におけるニルバジピンの視野障害進行に対する効果. 臨眼 53 : 729—733, 1999.
 - 32) **山崎芳夫, 田中千鶴, 早水扶公子, 辻 典明** : 正常眼圧緑内障に対するニルバジピンの長期投与効果. あたらしい眼科 17 : 411—414, 2000.
 - 33) **Van Hooser JP, Aleman TS, He Y-G, Cideciyan AV, Kuksa V, Pitter SJ, et al.** : Rapid restoration of visual pigment and function with oral retinoid in a mouse model of childhood blindness. Proc Natl Acad Sci USA 97 : 8623—8628, 2000.
 - 34) **Matsumoto H, Nakamura Y, Tachibanaki S, Kawamura S, Hirayama M** : Stimulation effects of cyanidine 3-glycosides on the regeneration of rhodopsin. J Agric Food Chem 51 : 3560—3563, 2003.
 - 35) **Riccardi C, Nicoletti I** : Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. Nat Protoc 1 : 1458—1461, 2006.
-