

第 113 回 日本眼科学会総会 評議員会指名講演 I

眼疾患と動物モデル

緑内障研究へのマウスの応用

—眼圧および網膜神経節細胞障害機序の解明を目指して—

相原 一

東京大学大学院医学系研究科外科学専攻感覚運動機能医学講座眼科学

共同研究者

村田 博史, 佐伯忠賜朗, 太田 貴史, 靄我 英和, 藤代 貴志, 大橋 正明, 中川 卓
陳 逸寧, 新 卓也, 澤村 裕正, 山岸 麗子, 富所 敦男, 新家 眞

(東京大学医学部眼科学教室)

河崎 洋志(東京大学医学部神経生化学教室)

間淵 文彦(山梨大学医学部眼科学教室)

杉本栄一郎(広島大学医学部眼科学教室)

原田 高幸(東京都神経科学総合研究所分子神経生物学)

寺田 純雄(東京医科歯科大学神経機能形態学教室)

原 英彰(岐阜薬科大学薬効解析学教室)

成宮 周(京都大学医学部神経細胞薬理学教室)

Jonathan G. Crowston (Centre for Eye Research Australia, University of Melbourne)

Antje Bernd (Department für Augenheilkunde, Eberhard-Karls-Universität Tübingen)

James D. Lindsey, Robert N. Weinreb (Hamilton Glaucoma Center, University of California San Diego)

要 約

緑内障の最大の病因である眼圧制御機構および唯一の治療法である薬物による眼圧下降機序と、それに伴う慢性進行性の緑内障性視神経症の病態解明には、*in vivo* 実験系である動物眼での解析が必須である。遺伝子改変が可能で多くの実験ツールが存在する優れた実験動物であるマウスを用いた、眼圧および緑内障分野への応用はまだ始まったばかりである。2000 年以降マウスの眼圧測定が可能になり、ヒトと同様な眼圧に対する基礎的な情報が得られ、日内変動、体位、時計遺伝子など多くの眼圧制御機構があることが明らかになった。さらに薬物による眼圧下降機序は、房水動態による生理的な解析か

ら、一歩進んで受容体を中心とした分子レベルでの機序が解明されるに至った。次に緑内障疾患モデルとして高眼圧マウスが作製され、遺伝子改変マウスを用いた効率的な網膜神経節細胞障害評価法が見出され、神経線維の障害パターンが解析された。マウス眼とヒト眼との相同性を踏まえたうえで、マウス動物モデルにより眼圧制御機構や網膜神経節細胞障害の機序に迫ることが可能である。(日眼会誌 114 : 217—247, 2010)

キーワード：マウス、緑内障、眼圧、網膜神経節細胞、
遺伝子改変マウス

別刷請求先：113-8655 東京都文京区本郷 7-3-1 東京大学大学院医学系研究科外科学専攻感覚運動機能医学講座眼科学
相原 一 E-mail : aihara-ky@umin.ac.jp

(平成 21 年 10 月 13 日受付, 平成 21 年 11 月 6 日改訂受理)

Reprint requests to : Makoto Aihara, M. D., Ph. D. Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan

(Received October 13, 2009 and accepted in revised form November 6, 2009)

A Review

The Use of Mice in Glaucoma Research —To Clarify the Mechanism of Intraocular Pressure Regulation and Retinal Ganglion Cell Damage

Makoto Aihara

Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, University of Tokyo

Abstract

Animal models are indispensable for glaucoma research, because intraocular pressure (IOP) regulation, IOP reduction by ocular hypotensive drugs, and chronic progressive glaucomatous optic neuropathy stem from the eye and its adnexa. The mouse, an excellent animal model available as transgenic mice which are an outstanding experimental tool, has been recently applied for glaucoma research. Many regulating factors such as diurnal variation, body position, and clock genes have been elucidated since accurate measurements of mouse IOP have been published in this decade. These advances were followed by clarification of the molecular mechanism of IOP reduction by

eye drops and of the aqueous humor dynamics using transgenic mice. Now, the pathogenesis of glaucomatous optic neuropathy is being investigated using glaucoma mouse models and transgenic mice expressing fluorescent proteins in retinal ganglion cells. By comparing the differences between mouse and human eyes, the mechanism of IOP regulation and retinal ganglion cell damage will be gradually revealed.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 114 : 217—247, 2010)

Key words : Mouse, Glaucoma, Intraocular pressure, Retinal ganglion cell, Transgenic mouse

I 緒 言

緑内障は、その診断学の進歩により日本での最新疫学調査では40歳以上の有病率は実に5%¹⁾、視覚障害者の原因としては第1位、という高齢化社会を背景にした今後の日本では重要な眼疾患となっている。緑内障は主として高眼圧ストレスによる多因子性慢性進行性神経変性疾患であり、緑内障性視神経症 (glaucomatous optic neuropathy : GON) の病態解明と眼圧下降治療に主眼をおいたアプローチが必要である。GONは、生体内でも特異的な眼組織と全生体内での制御に基づく生理現象である眼圧と、その上昇および視神経乳頭構造が関与する視神経組織障害であるため、その病態解明には *in vivo* の解析が必須である。さらに病因解明のために必要な眼内圧測定生理検査、病理検査などは、他臓器では可能な侵襲的疾患アプローチであるが、緑内障では致命的であるため、疾患動物モデルの開発と応用が有用であるのは言を俟たない。そして、GONに対して現在唯一エビデンスがある眼圧下降治療について、多くの治療薬があるものの、眼圧維持機構はもとより、眼圧下降薬の作用機構も房水動態による生理学的な評価に留まっており、将来の新規眼圧下降薬の開発のためにも眼圧制御機構の分子生物学的アプローチが望まれる。

このような緑内障研究の特殊性に基づき、まず図1に眼圧制御機構の解明に向けた動物モデルの応用の戦略図

を示す。眼圧制御に関する因子は多数挙げられるが、実際にヒトでの条件を均一化することは困難である。その点では動物モデルは環境因子を制御しやすい。眼圧制御因子による眼圧変動あるいは多くの薬物による眼圧変化を測定し、実際の臨床データと比較検討することで眼圧制御因子を明らかにし、それに対する薬剤開発と臨床応用が可能となる。

図2に緑内障動物モデルの応用に向けた戦略図を示す。緑内障臨床データから得られた高眼圧および眼圧以外の標的因子に対しモデル動物を作製する。そして、ヒトでは不可能な進行途中での組織学的解析により病態をより解明し、病因としての位置づけを再確認、そしてその標的因子に対する治療戦略を組み立て、臨床応用を目指すことになる。現状では高眼圧がGONの標的因子として最重要であることからモデル動物としては高眼圧モデルの作製が行われている。また、特に日本に多い正常眼圧緑内障¹⁾の病因として考えられる虚血、グルタミン酸、遺伝子異常などを標的にした動物モデルも作製可能である。もっともこれら2つの動物モデルによる解析は、動物とヒトとの生物学的相同性の検証をもとに実行されなければならない。

さて、眼圧と緑内障の存在は10世紀の古くに遡る歴史を持ち、また有病率の高い疾患にもかかわらず、実際に動物モデルが盛んに緑内障研究に応用されるようになってきたのは21世紀からの10年間に過ぎない。その

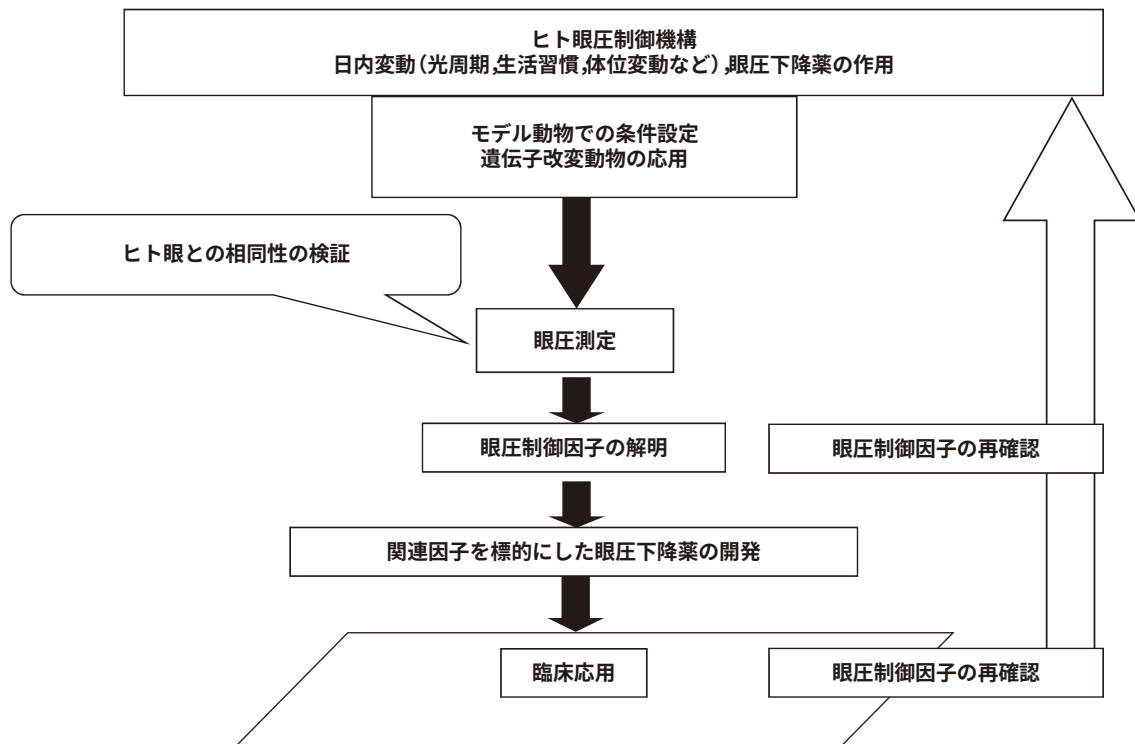


図 1 眼圧制御機構の解明と動物モデル.

臨床データから推定される眼圧制御機構や眼圧下降作用は、多因子性でありヒトでの解析には限界がある。その点、モデル動物では環境因子を制御し、遺伝子改変動物を応用できるため、眼圧制御機構をより正確に解析し、新たな薬剤開発につながる知見が得られる。

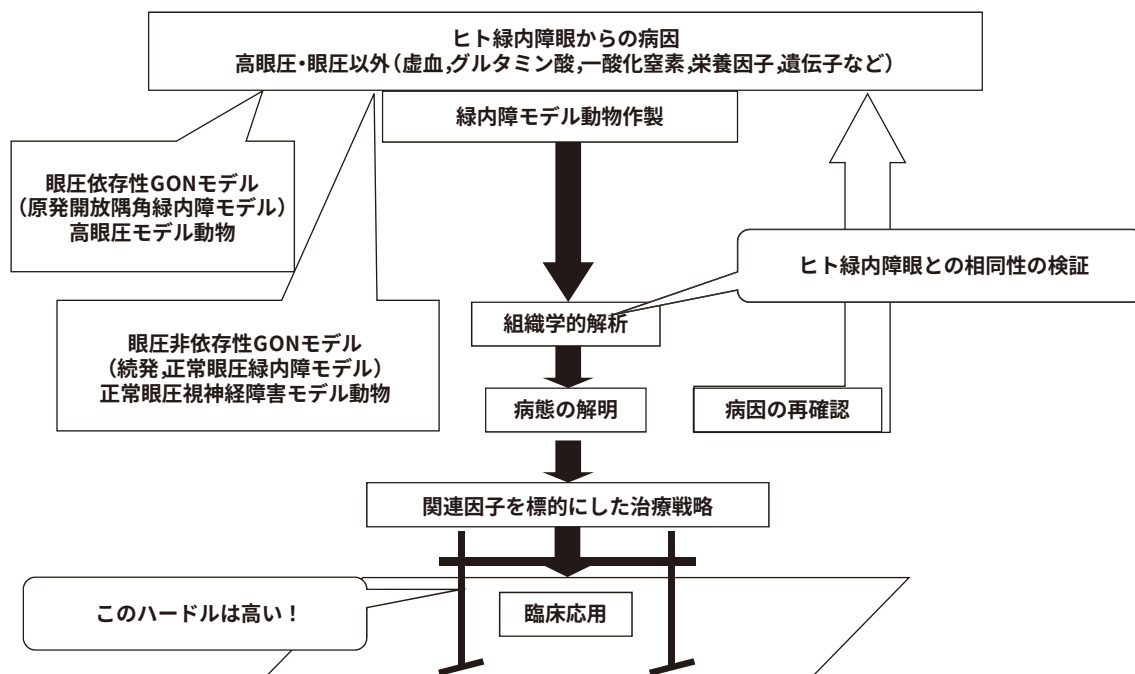


図 2 緑内障性視神経症の機序解明と動物モデル.

緑内障性視神経症(GON)の病因として考えられる高眼圧および眼圧非依存性因子を応用したモデル動物を用いて、各因子による障害を確認し、病態を明らかにすることで、新たな治療戦略を立てることができる。

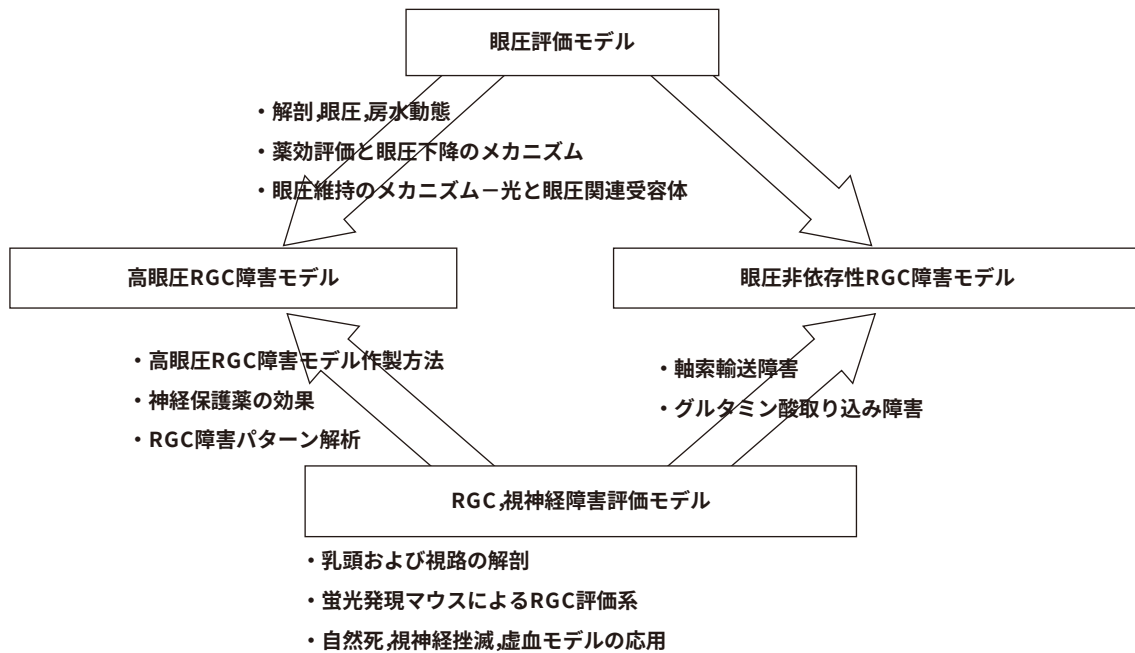


図3 緑内障研究へのマウスの応用の推移。

最初にマウス眼で眼圧を評価することができるか、そして網膜神経節細胞(RGC)や視神経の障害を評価できるか、を検証する必要がある。続いて、高眼圧モデルや眼圧非依存性因子によるモデルの作製とその解析が可能かを検証する。

理由は眼圧測定である。測定方法の限界により、ウサギ以上の大きさの動物しか使用できなかったことに加え、ウサギ眼は房水動態と隅角構造が特殊であること、最もヒトに近いサル眼は経済的負担が大きいことから、その研究応用には限界があった。その後、トノペン®を利用した眼圧測定を用いてラットが応用されはじめ、小動物での緑内障モデル作製が可能となり、サルに続いてラットの人為的高眼圧モデルが開発されるようになった。しかし、動物モデルとしては最も利用価値が高いマウスに至っては1997年にJackson LaboratoryのJohnらのグループが初めて眼圧測定方法を発表した²⁾のが最初の報告である。

マウスは飼育取り扱いの面で容易かつ経済的であること、系統分類がきわめて厳密で遺伝的背景が明確であること、環境因子を均一化することが容易であること、遺伝子解析が終了しヒトとの相同性が99%ときわめて高いこと、遺伝子改変が容易であること、多くの分子生物学的実験ツールが存在していること、などで有用な実験動物であり、疾患や薬物治療ターゲット遺伝子の探索またスクリーニング系としての地位を確立している。

2000年以降、我々のグループを中心にマウスの眼圧測定に関する報告が相次ぎ、マウス眼の緑内障モデルへの応用に向けて、まず眼圧に対する基礎的な情報が得られ、多くの眼圧制御機構があることが明らかになった。特に薬物による眼圧機構は、房水動態による分類すなわち房水産生と線維柱帯路およびぶどう膜強膜路という房水流出のバランスを捉える生理学的解析から、一歩進ん

で分子レベルまで解明されつつある。さらに、緑内障疾患モデルとして高眼圧マウスの作製とそれを用いた神経保護治療薬の開発が試みられてきている。残念ながら未だに理想的な人工的慢性高眼圧モデルの確立には至っておらず、現在の流れとしては自然発症慢性高眼圧モデルのDBA2Jマウスと我々が開発したレーザー高眼圧マウスの応用を中心にした研究が進められているのが現状である。本稿では眼圧制御とGONの本態である網膜神経節細胞(retinal ganglion cell: RGC)障害の機序を図1, 2の戦略図をもとにマウスモデルを用いて紐解くことにする。直径約3mmの小さい眼を有するマウスが眼圧評価モデルとして有用であるか、そしてRGC障害を評価することが可能かを検証し、そのうえで緑内障モデルとして高眼圧や眼圧非依存性因子によるRGC障害を確認し、ヒトとの相同性を踏まえたうえでRGC障害の機序に迫りたい(図3)。

II 眼圧評価モデルとしてのマウスと眼圧測定法

1. マウス眼とヒトとの解剖学的・生理学的相同性

1) マウスの隅角, 線維柱帯, 毛様体

マウスの隅角構造はヒトと類似しており線維柱帯, Schlemm管の存在, またトレーサー実験によるぶどう膜強膜路の存在が確かめられている^{3)~5)}。マウスの隅角構造は生後約6週間で発達が終了すると報告されているので、緑内障関連の実験にはそれ以降の週齢を用いるのが望ましいと考える。Schlemm管と集合管および上強

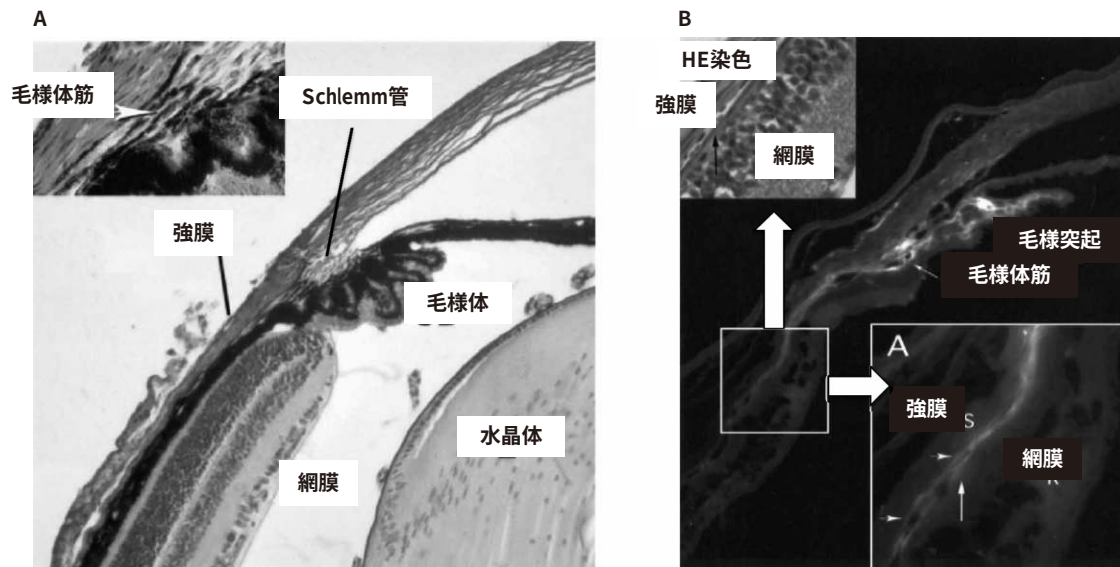


図 4 マウス前眼部の解剖学的同一性。

A：組織学的にヒトと同様な隅角，線維柱帯，Schlemm 管，毛様体の構造を有する。B：蛍光トレーサー Dextran 70 kDa による注入実験では 20 分後で網膜下脈絡膜に流れるトレーサー（矢印）により，ぶどう膜強膜路の存在も観察できる。HE 染色：ヘマトキシリン・エオジン染色。

（文献 3 から許可を得て転載，改変）

膜静脈の存在も確認できる⁶⁾。毛様体はヒトやサルと比べ小さいものの⁵⁾，色素細胞，無色素細胞層間に gap junction，無色素細胞間には tight junction があり血液房水柵が存在し，房水産生に重要な構造をしている^{7,8)}（図 4）。したがって，眼圧についてもヒトと同様な制御機構が存在する可能性が高く，マウスによる眼圧研究の有用性が裏付けられた。

2) マウスの眼圧と測定法

マウスの眼圧は 1997 年に John らのグループにより微小ガラス管によるマイクロニードルと圧トランスデューサーを用いて測定された²⁾。我々は麻酔や測定技術を改良し，精度高く測定できる方法を発表した⁹⁾（図 5）。眼圧に人種差があるように，マウス眼圧にも系統差があり 10 台前半から 20 台に及ぶ^{9,10)}。眼圧は不思議なことに測定された動物種では哺乳類間ではもちろん種差を越えて保存されているうに，類を越えて魚類でも鳥類でもほぼ同様であることが興味深い^{11,12)}。ヒトと同様に左右差，性差は認められない^{10,13)}。その他 survo null system を用いた電氣的な眼圧測定方法も開発されたが，特殊な器械を使用するため普及していない^{14,15)}。現在では，精度はマイクロニードル法に劣るが非侵襲的に測定できる反跳式眼圧計（トノラボ[®]）を用いた測定が多く用いられている¹⁶⁾。

3) マウスの房水動態

解剖学的にはヒトと同様な構造であることが判明したが，房水動態は異なる。Swiss White mouse で詳細に報告されたデータを表 1 に示す。房水産生は fluorophotometry の原理を用い，outflow facility は two constant

pressure 法を用いて測定した¹⁷⁾。マウスの上強膜静脈圧は眼内圧を減少させることに伴い，眼内圧が上強膜静脈圧と等しくなったときに Schlemm 管に集合管から血液が逆流することを利用し，顕微鏡下で確認するという小動物ならではの新しい測定法を開発し測定したところ 9.5 mmHg であった（図 6）。Goldmann 理論により算出したマウスの房水動態における線維柱帯路の寄与は 16%，ぶどう膜強膜路は 84% であり，ヒトよりぶどう膜強膜路の関与が高い^{17,18)}（表 1）。このことは以下に述べるプロスタグランジン (PG) 関連薬へのマウスの眼圧下降反応がきわめて良好であることにもつながる知見である。したがって，過去に多く眼圧測定に利用されていたが，ぶどう膜強膜路がほとんど存在せず，PG 関連薬などのぶどう膜強膜路流出改善薬への反応性が悪いウサギと比べ，マウスは実験動物として有用であることが理解できる（表 1）。

4) マウス眼圧の日内変動

マウス眼圧にも日内変動があり日中低く夜間高い^{10,13,19)}。この日内変動の二相性パターンは動物種を越えて保存されており，基本的に夜行性のマウスやラットは夜間に高い傾向，昼行性のサルやヒトは日中に高い傾向を持ち，特に明け方高いと報告されている^{20)~22)}。おそらく活動時間に上昇するように制御されていると考えられる。したがって，眼圧下降薬の評価判定には測定時間を一定にしておく必要がある。

このような日内変動には光が影響するのではないかと示唆されていたが，詳細は不明であった^{23)~25)}。我々は飼育条件を厳格化可能なマウスを用いて通常の 12 時間

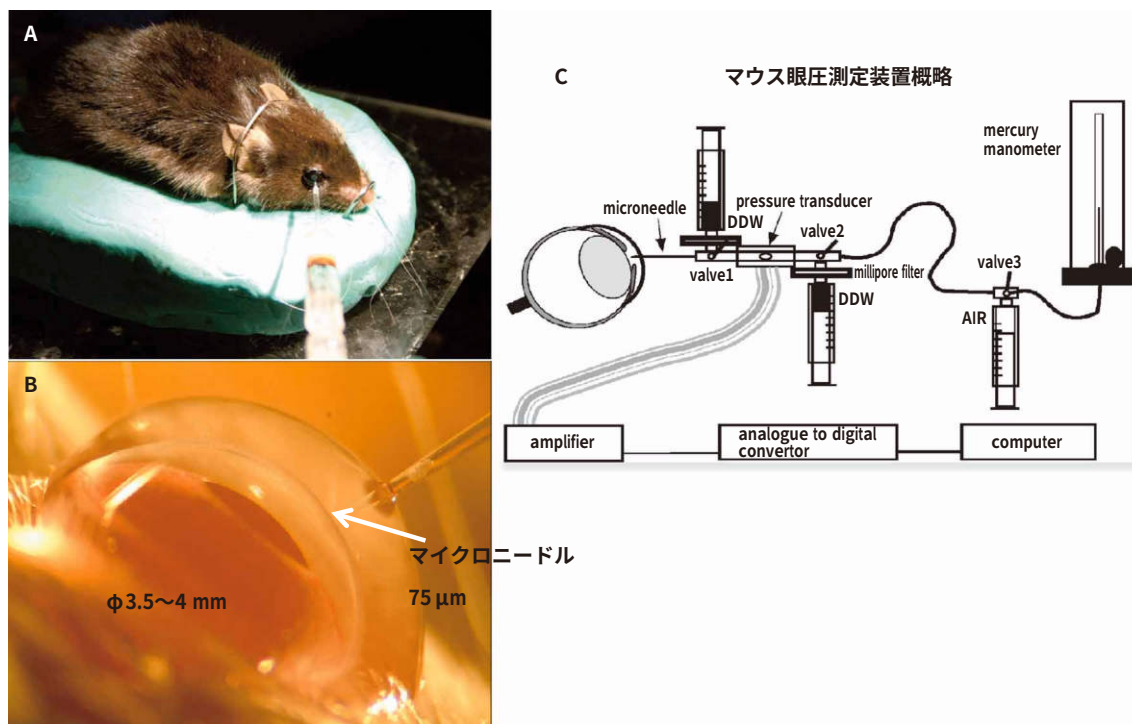


図 5 マイクロニードル法によるマウス眼圧測定.

A: マウス眼圧測定中写真. B: マイクロニードル挿入図. 顕微鏡下で観察しながら針を設置して測定する.
C: マイクロニードル法の装置概略図. マイクロニードルと圧トランスデューサーで実眼内圧を測定.

(文献 9 から許可を得て転載, 改変)

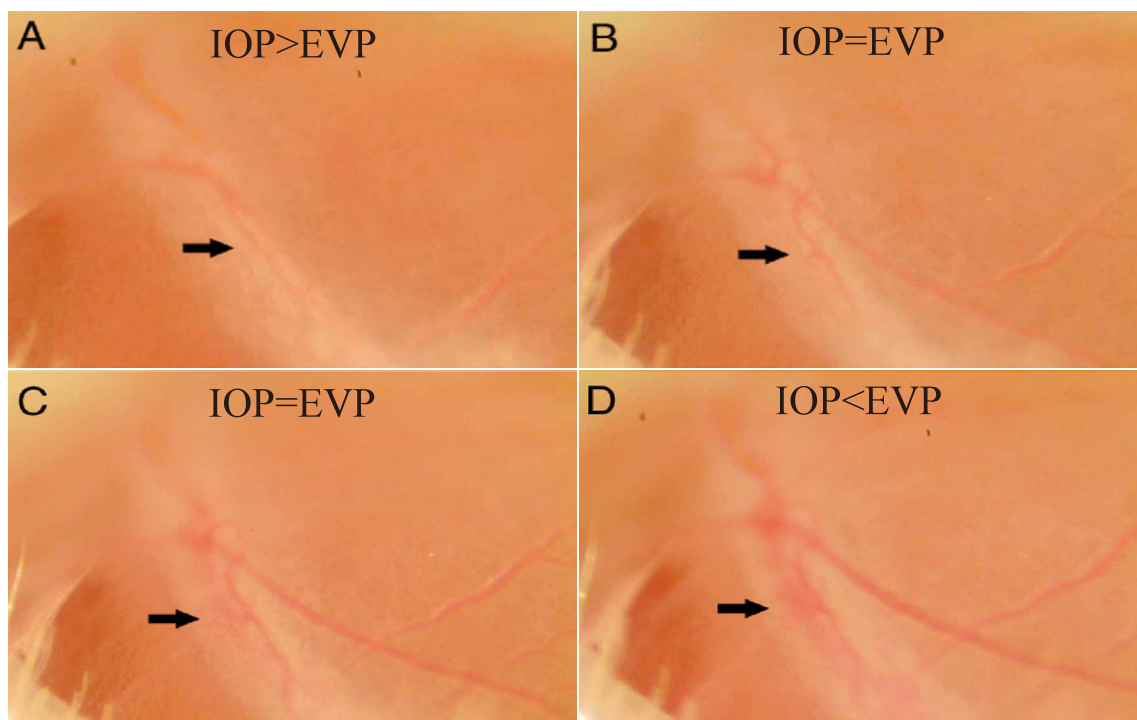


図 6 マウスの上強膜静脈圧測定.

房水動態測定には上強膜静脈圧(EVP)測定が必要である. 顕微鏡下で眼内圧を徐々に低下させ, Schlemm 管に集合管から血液が逆流する現象(矢印)をとらえることにより測定することに成功した. A: 眼内圧(IOP)がEVPより高い状態では集合管(矢印)には血液は観察されない. B, C: IOPがEVPと同じになると血液逆流が始まる. D: IOPがEVPより低いとSchlemm管内に血液が充満してくる.

(文献 6 から許可を得て転載, 改変)

表 1 ヒトとマウスの房水動態の比較

	ヒト ¹⁸⁾	マウス (ddY) ¹⁷⁾
眼圧 (mmHg)	14.8	15.7
上強膜静脈圧 (mmHg)	9.1	9.5
房水産生量 (μl/min)	2.9	0.18
outflow facility (μl/min/mmHg)	0.25	0.0051
線維柱帯路房水流出率 (%)	49	16
ぶどう膜強膜路房水流出率 (%)	51	84

光周期の他に、終日明室あるいは暗室での日内変動を測定し影響を調べたところ¹³⁾¹⁹⁾、終日暗室での眼圧上昇と日内変動の乱れが明らかであり、マウス眼圧も光周期により制御されていることが判明した(図 7)。

次に視交叉上核(SCN)には体内リズムを司っている 4 つの体内時計遺伝子が存在するが、Maeda らはそのうちの 1 つ Cry の欠損マウスを用いて野生型と眼圧日内変動を測定したところ、日内変動が消失した²⁶⁾。したがって、眼圧日内変動は網膜レベルでの光受容と連動した時計遺伝子の活動による体内リズムに制御されていることが判明した。このように環境因子を制御し、遺伝子改変することで日内変動の機序を解明できるマウスは眼圧制御機構を解明するうえで今後さらに期待できる動物モデルである。

5) マウス眼圧の体位変動

通常眼圧は座位で測定されているが、古くから体位変換により眼圧が変動することが知られており、同一体位での測定が必要である。実際には座位から仰臥位への変換で 4~5 mmHg の眼圧上昇がみられ、緑内障患者でも同様である²⁰⁾²⁷⁾。機序としては、眼と心臓の位置関係により上強膜静脈圧が体位変動によって変化することによって考えられ、実際にヒトでの 1 mmHg の眼圧変動に

より上強膜静脈圧は 0.83 ± 0.21 mmHg 変動することが知られていた²⁸⁾²⁹⁾。ただし、ヒトでの上強膜静脈圧測定は困難で精度が悪いため、同様な実験がマウスでも検討された。マウスは通常腹臥位で眼球は心臓よりやや高位に位置する。その状態から前傾姿勢をとり 30 度、60 度と変化させたところ、眼圧および上強膜静脈圧は図のように変化した⁶⁾(図 8)。マウスでも同様に眼圧は上強膜静脈圧と連動して体位により変化することが示され、ヒトでの仮説を裏付けることができた。視神経乳頭では眼圧とくも膜下腔の脳脊髄圧の差が重要と考えられるため、例えば臥位で生活していると緑内障の進行が強いとのエビデンスはなく、臥位による夜間の眼圧上昇は無視してよいと考えられる。脳脊髄圧の体位変動は動物モデルで測定し、眼圧との関係を検討することが必要であろう。

このようにマウスはヒトと同様な眼圧の生理機能を有する点は興味深く、ヒトでは実験不可能な眼圧生理機構を紐解くことができる。さらにマイクロニードル法は侵襲的であるが精度が高い測定方法であるため、眼圧下降効果を評価することに適している。隅角構造および房水動態が把握されている点は、点眼薬による眼圧下降機序とその効果を評価する際に重要な要素である。次項に薬剤反応性をマウスとヒトで比較してみる。

2. マウス眼とヒトとの眼圧下降の薬理学的相同性

1) マウスを用いた眼圧下降および作用機序の解明

1990 年代からさまざまな作用点を有する眼圧下降薬が開発されてきており、その進歩はめざましい。そして、眼圧下降薬の開発とその基礎となる作用機序の解明は、裏を返せば眼圧制御あるいは逆に眼圧上昇の機構を知ることにもつながるはずである。

マウス眼でも現在臨床的に使用されている眼圧下降薬

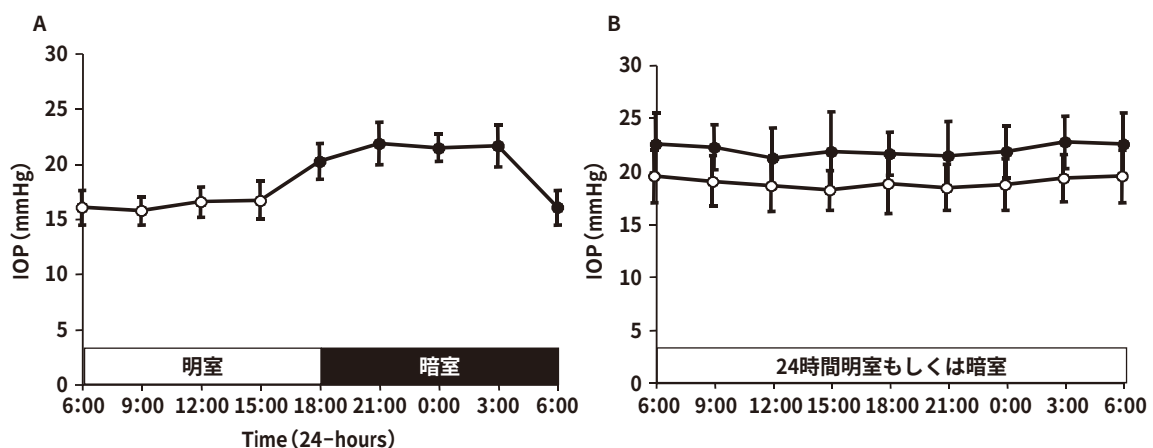


図 7 マウス眼圧日内変動と光周期による影響。

A : Swiss White mouse の 12 時間明暗サイクル条件下での日内変動の平均値 (n=11)。夜行性であるため夜間にかけて眼圧が上昇する。B : 24 時間明室(○)および暗室(●)条件下での日内変動の平均値。各個体の日内変動が同調しなくなり、平均では変動がなくなる。ただし、活動が活発な暗室条件の方が眼圧値が高くなる。

(文献 19 から許可を得て転載、改変)

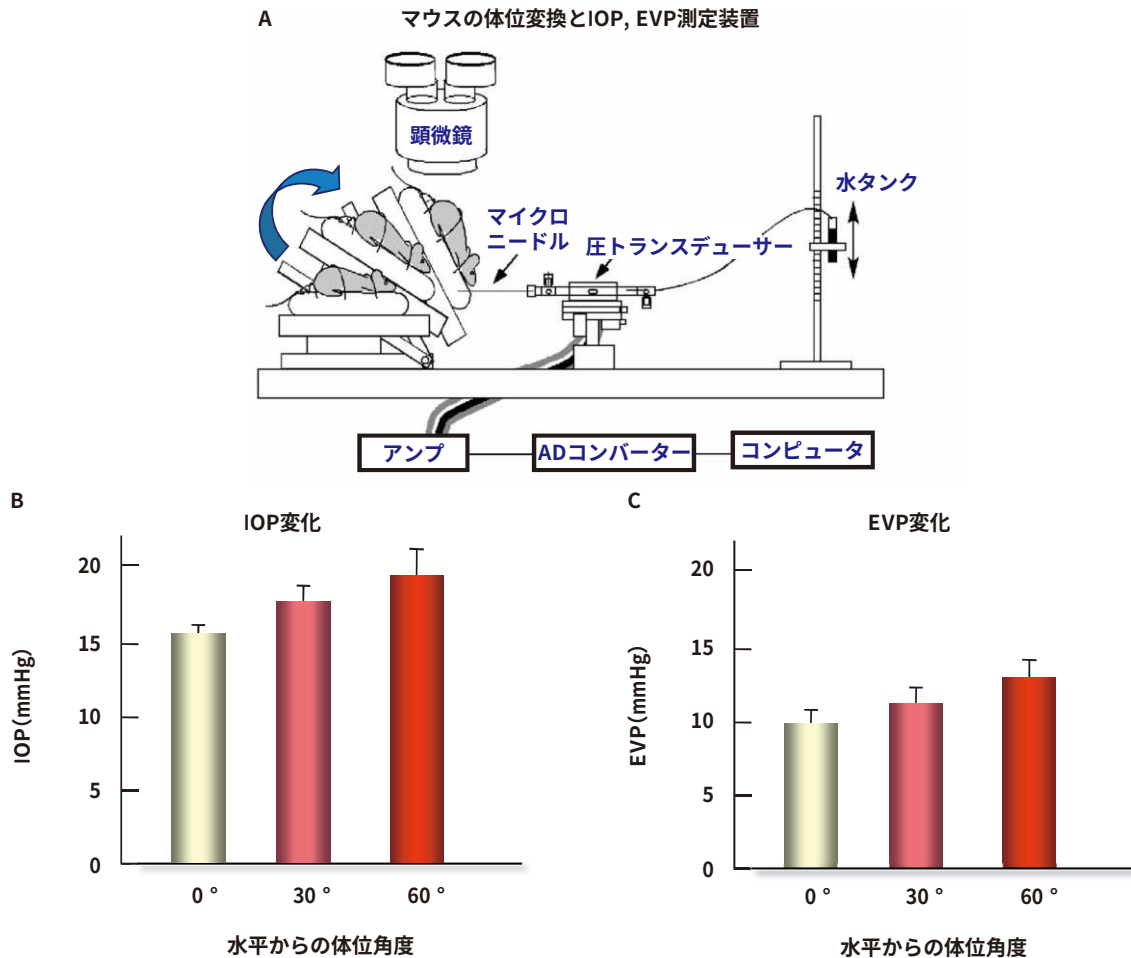


図 8 マウスの体位変換による眼圧および上強膜静脈圧の変化。

A: マウスの体位を水平から 30 度, 60 度前傾させ, それぞれマイクロニードル法で眼内圧 (IOP) および上強膜静脈圧 (EVP) を測定する. B: IOP は水平から, 30 度, 60 度前傾でそれぞれ 16.5 ± 0.6 , 18.2 ± 0.6 , 19.5 ± 1.8 mmHg に変化した (平均値 $\pm$ 標準偏差, $n=6$). C: EVP は水平から, 30 度, 60 度前傾でそれぞれ 9.6 ± 1.3 , 11.2 ± 1.3 , 13.3 ± 1.5 mmHg に変化した ($n=6$). 体位変換に伴い EVP が上昇し, 同調して眼圧も上昇することが分かる.

(文献 6 から許可を得て転載, 改変)

に対する反応が得られる. Survo-null system による眼圧測定では交感神経 β 遮断薬による眼圧下降効果が³⁰⁾, 我々のグループではマイクロニードル法を用いて交感神経 α_2 刺激薬プリモニジン³¹⁾, 世界で上市されている 5 種類の PG 関連薬や交感神経 α_1 ブロッカーによる眼圧下降効果が証明されている³²⁾. マウスは特に PG 関連眼圧下降薬に対する反応性に優れ³³⁾ (図 9), 例えばラタノプロストは 20% 以上の眼圧下降効果があり, 濃度依存性および時間経過も追うことができ, 薬理的な評価が十分に可能な動物モデルである⁹⁾.

2) PG 関連薬の作用機序

PG 関連薬の中でウノプロストンを除いたプロスト系薬剤は今や第一選択薬となり, 眼圧下降に必須の薬剤となった. プロスト系で最初に開発されたラタノプロストは, 眼圧下降が期待された PGF 2α の誘導体であるため (図 10), プロスタノイド (PG と トロンボキサンの総称)

の受容体の一つである FP 受容体を介して眼圧下降効果を呈すると予想され, 8 種類存在するプロスタノイド受容体結合実験でも特に FP 受容体に対する親和性が高い. したがって, 後発のトラボプロスト³⁴⁾, 国産のタフルプロスト³⁵⁾ もラタノプロストと同様に FP 受容体に対する親和性を向上させている (図 10). 一方, PG 関連薬では世界初のウノプロストンは, 構造が PGF 2α の代謝型であり, プロスタノイド受容体に対する親和性が低い薬物であり, プロスタノイド受容体以外では maxi-K チャネルに作用することが報告されているものの³⁶⁾, その眼圧下降機序は明確ではなかった. さらにプロスト系のビマトプロストは, ① 図のように C 末端がエチルアミド型であり, 膜脂質のフォスファチジルエタノールアミンから切り出されるアナンダマイドを経て合成されるプロスタマイド系統の薬剤であり, 他の薬剤の acid 型のようなプロスタノイド系統ではない. ② 他の 4 剤は

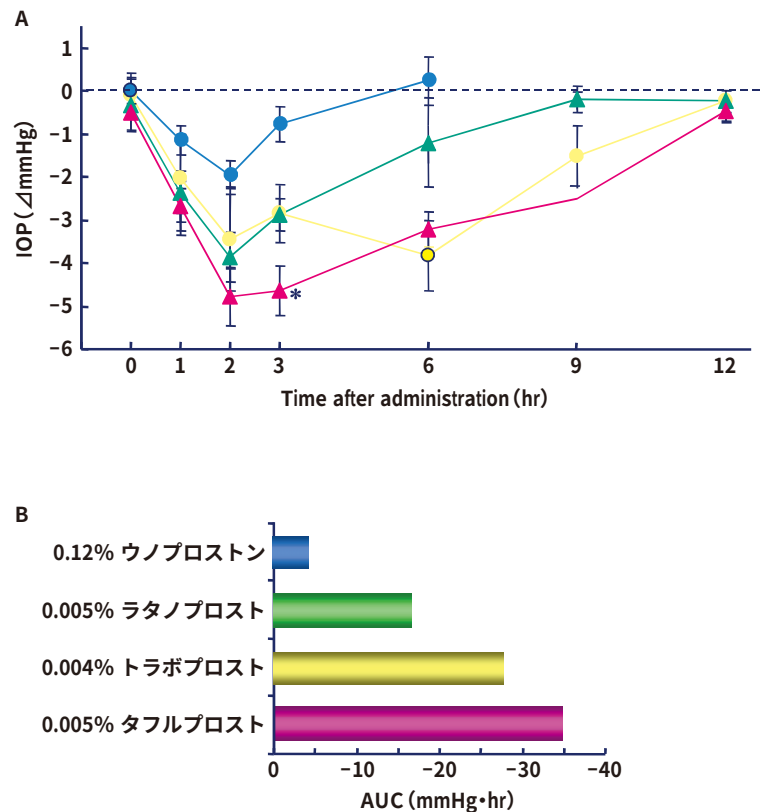


図 9 マウスのプロスタグランジン関連薬による眼圧下降効果。

現在日本で上市されている 4 種のプロスタグランジン関連薬、ウノプロストン、ラタノプロスト、トラボプロスト、タフルプロスト点眼後の対側眼眼圧を対照とした眼圧下降幅 (mmHg) の時間経過 (A) と眼圧下降幅と時間の積算から算出した area under the curve (AUC) 量の比較 (B)。ヒトと同様な傾向の眼圧下降効果がマウスでも観察できる。▲：0.005% タフルプロスト、▲：0.005% ラタノプロスト、●：0.004% トラボプロスト、●：0.12% ウノプロストン。

(文献 33 から許可を得て転載，改変)

すべて角膜のエステラーゼで C 末端のイソプロピルエステルが切断されて acid 型になるプロドラッグであり、FP 受容体に親和性が高い。ビマトプロストのエチルアミド結合も角膜のアミダーゼで切断可能で、その場合、PGF 2α と同様な構造となり FP 受容体に結合可能であるが、角膜のアミダーゼ活性が低いため、プロドラッグとしての効果は低い³⁷⁾。以上の二点で他の PG 関連薬 4 剤と異なるとされ、作用機序が不明であった。ラタノプロストではぶどう膜強膜路の流出改善が認められることと、組織内でマトリックスメタロプロテアーゼの活性上昇が惹起されることから、毛様体内での細胞外マトリックスの再構築により房水流出が促進され眼圧が下がる機序が示唆されている³⁸⁾。しかし、このような作用機序は生化学的に数日以上を有する組織構造の変化であり、即時的効果については説明できかねる。プロスト系 PG 関連薬のように、その強い眼圧下降効果から第一選択薬としての地位を確立し、次々と新薬が開発されていながら、作用機序が明確でない薬剤が存在するのは、医学的にもきわめて不十分であるといわざるを得ない。

そこで、我々は FP 受容体欠損マウスを用いて、5 種

の PG 関連薬の眼圧下降効果を検討したところ、すべての薬剤で眼圧下降効果が消失した³⁹⁾⁴⁰⁾ (図 11)。同じ結果が別グループからも発表され⁴¹⁾、既存の PG 関連薬は FP を介して眼圧下降を起こすことが判明した。さらに、他の EP 受容体欠損マウスでも同様な実験を行ったところ、EP 3 受容体欠損マウスでの眼圧下降効果が野生型と比較して減弱していた³⁹⁾⁴⁰⁾⁴²⁾ (図 12)。この傾向は 5 剤すべての薬剤でみられることから、FP 受容体刺激が眼圧下降の必要条件であるが、その下流シグナルに EP 3 受容体が関与している可能性が示唆される結果となった。FP 受容体刺激により内因性に cyclooxygenase 2 (COX 2) の誘導と PG 産生が報告されていることから、可能性としては二次的に産生された PG により EP 3 受容体が刺激されることが、FP 受容体単独の効果を増強させると考えられる。そこで、内因性の PG 産生を抑制しておくために非ステロイド性抗炎症薬であるジクロフェナックを前投与したうえで PG 関連薬を野生型マウスに投与したところ、EP 3 受容体を欠損したマウスと同様な眼圧下降効果の減弱が観察され、おそらく内因性の PG 産生と EP 3 受容体を介した FP 受容体刺激修飾

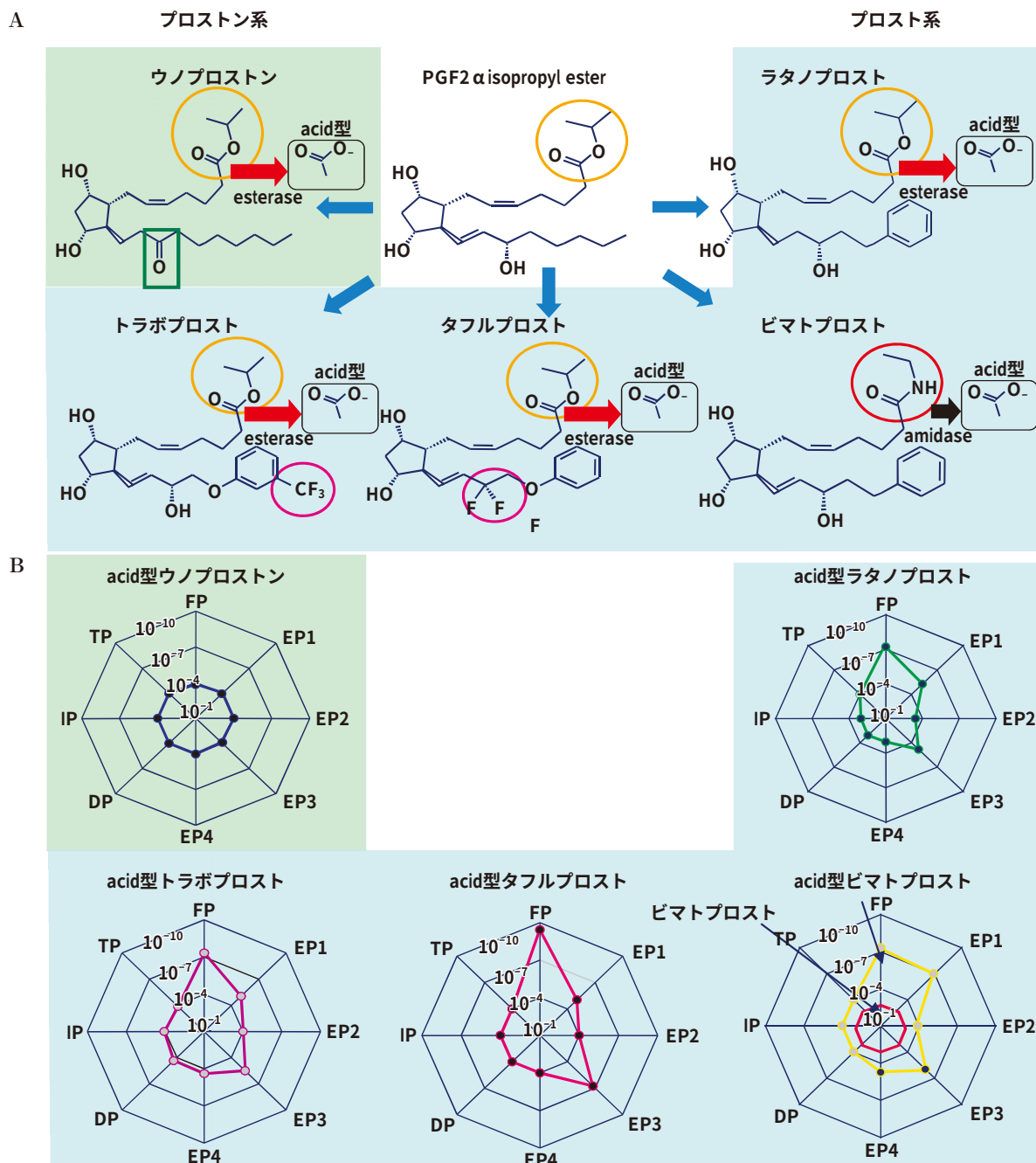


図 10 プロスタグランジン関連薬の構造式と acid 型の受容体親和性.

5 種のプロスタグランジン (PG) 関連薬の構造式を示す。A：プロスタグランジン関連薬のうちビマトプロスト以外は、プロスタノイド FP 受容体に結合する PGF2 α の C 末端カルボキシル基を isopropyl 基に変えたプロドラッグ isopropyl PGF2 α の誘導体である。角膜のエステラーゼで加水分解され acid 型となり FP 受容体に結合する。B：分解された acid 型の受容体親和性。プロスタノイド受容体は 8 種類あり、図はウェブの外側にあるほどその受容体に結合しやすいことを示す。ウノプロストンは PGF2 α の代謝型であり C15 の水酸基が ω 酸化を受けて FP をはじめどの受容体にも結合しにくい。プロスト系はすべて C15 水酸基が保存される、もしくはフッ化により安定化させて FP 受容体に結合しやすくしている。FP に結合しやすい化合物は EP3 にも結合しやすい傾向がある。ビマトプロストは特異で、C 末端はエチルアミド型となっており、角膜のアミダーゼで分解を受ければ、他のプロスト系 3 種と同様に FP に結合しやすくなるが、アミダーゼ活性が実際は少なく、ほとんどそのままの形 (プロスタマイド) で FP 単独には結合しないが、FP と FP の変異体の複合体には結合する。

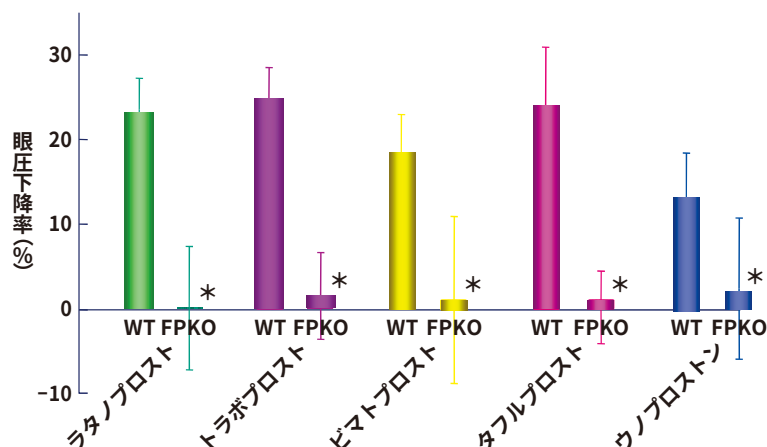


図 11 FP 受容体欠損マウスにおける PG 関連薬の眼圧下降効果.

プロスタノイド受容体 FP 受容体欠損 (FPKO) マウスと野生型 (WT) マウスの眼圧下降効果を夜間点眼後 3 時間で比較検討した (n=8). PG 関連薬 5 剤いずれでも FP 受容体欠損マウスでの眼圧下降効果が消失する. したがって, FP 受容体は現在の PG 関連薬の作用には必須であることが分かる. *: $p < 0.01$.

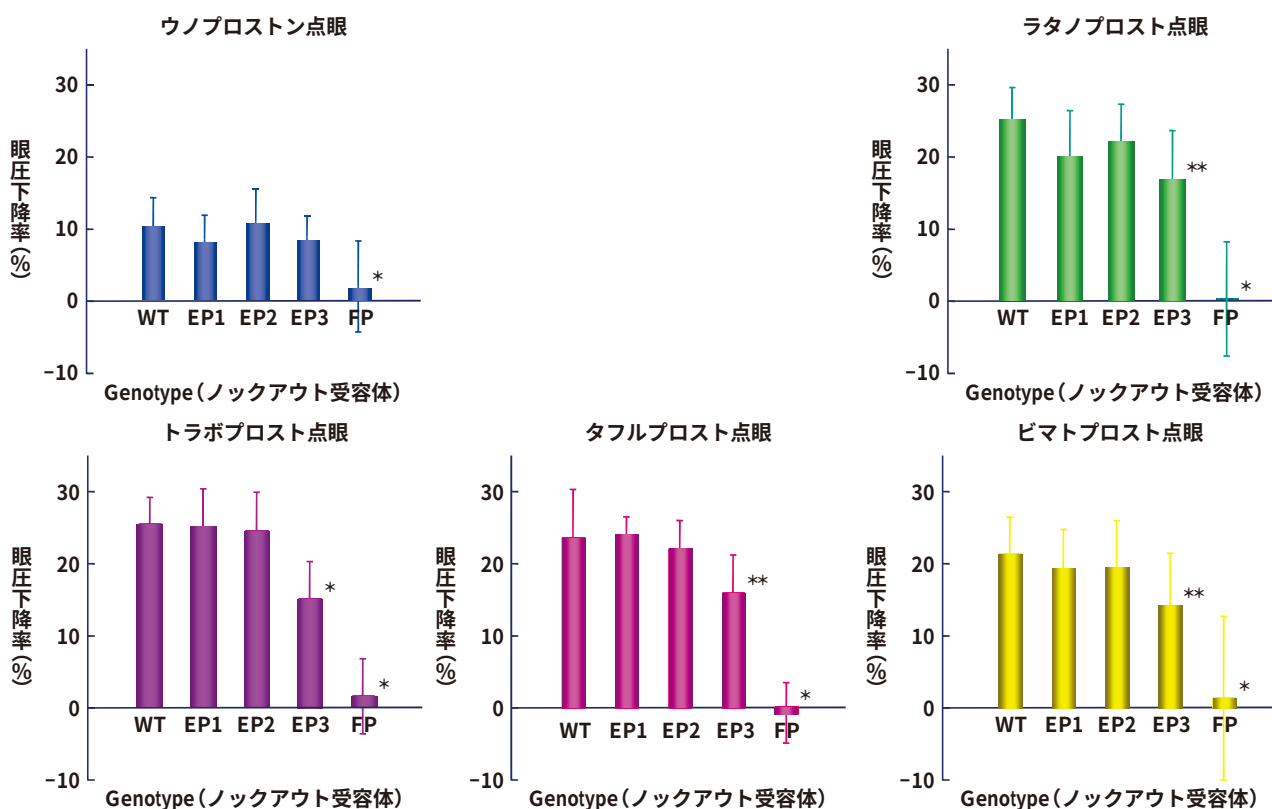


図 12 プロスタノイド受容体欠損マウスにおける PG 関連薬の眼圧下降効果.

プロスタノイド受容体 FP, EP1~3 受容体欠損マウスと野生型 (WT) マウスの眼圧下降効果を夜間点眼後 3 時間で比較検討した (n=8). PG 関連薬 5 剤いずれでも FP 受容体欠損マウスでの眼圧下降効果が消失する以外に, EP3 受容体欠損マウスでも眼圧下降効果が 20% 程度減弱する. したがって FP 受容体は現在の PG 関連薬の作用には必須であり, EP3 受容体は FP 受容体による眼圧下降効果を修飾していることが分かる. *: $p < 0.01$, **: $p < 0.05$.

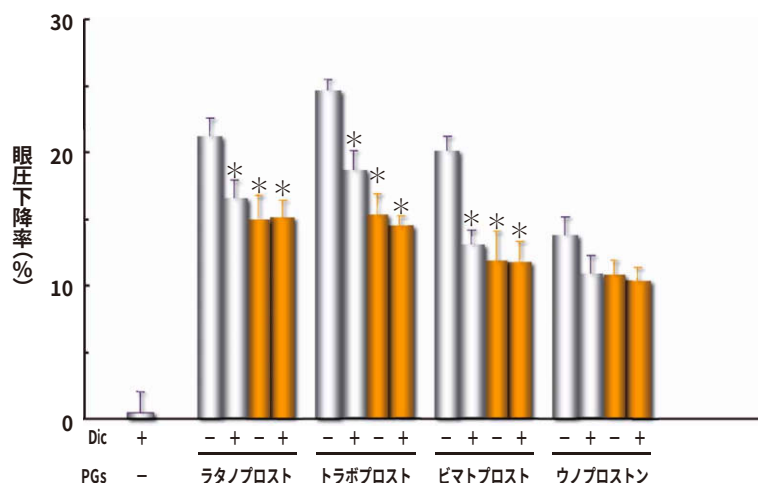


図 13 EP3 欠損マウスにおける PG 関連薬の眼圧下降効果と NSAID の影響。

プロスタノイド受容体 EP3 受容体欠損マウスと野生型 (WT) マウスの眼圧下降効果と非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID, ジクロフェナクナトリウム) の影響を夜間点眼後 3 時間で比較検討した。PG 関連薬 (PGs) 5 剤いずれの WT マウスでの眼圧下降効果は NSAID 前投与 (Dic+) で減弱するが、その程度は EP3 受容体欠損マウスでの眼圧下降効果と同様である。また、EP3 受容体欠損マウスに対して NSAID 前投与は影響がない。したがって、EP3 受容体は FP 受容体刺激により誘導される内因性 PG に反応する受容体であると考えられる。■：野生型マウス，■：EP3 受容体欠損マウス。平均値 ± 標準誤差 (n=9~17)。*：p < 0.05 vs WT (Steel's test)。

(文献 42 から許可を得て転載，改変)

機序が存在するものと考えられる⁴²⁾ (図 13)。さらに、ビマトプロストに関しては、それ自身プロスタミドとして、FP と FP の splice variant の複合体を受容体として結合することが判明した⁴³⁾。したがってプロスト系の中でビマトプロストは、主にプロスタミドとして FP 受容体複合体を介する作用と、アミダーゼで切断された acid 型のプロスタノイドとして FP 受容体に結合する作用の二つを併せもつ興味深い薬剤であったことが、上市されて 10 年余りで判明することとなった。PG 関連薬の現在の作用機序として、以降に述べるプロスタノイド EP 受容体の作用と合わせると、図 14 のようなシグナルが想定される。このように遺伝子改変マウスを用いることにより、より詳細な薬物作用機序が分子レベルで解明される。

3) 眼圧下降関連受容体による眼圧制御機構

上記のように点眼薬による眼圧下降機序に関しては、少なくとも受容体や細胞内酵素レベルでの作用機序は明らかにされるようになった。したがって、眼圧下降機序に関与するシグナルが、通常的眼圧値を制御している可能性が十分予想される。ところが実際は単純ではないことが最近の報告で窺い知ることができる。例えば、PG 関連眼圧下降薬による眼圧下降にはプロスタノイド FP 受容体が必須であることが判明しているが、遺伝子改変マウスで FP 受容体を欠損させても生理的な眼圧値も日内変動もまったく影響を受けない³⁹⁾⁴²⁾ (図 15 A)。また、1950 年代から炎症を惹起し眼圧をむしろ上昇させると認識されていた PG の PGE2 に対する受容体や⁴²⁾、また

PG とは眼圧下降作用点異なる交感神経 α_2 受容体を欠損させたマウスでも同様な結果が得られている³¹⁾ (図 15 B)。これらの結果から眼にとって重要な眼圧を維持する機構には多くの代償機構が関与しており、複雑なネットワークを形成していると考えざるを得ない。このように遺伝子改変マウスを用いて既存の点眼薬の眼圧下降作用機序を解明することができる一方、既に存在する遺伝子改変マウスや神経系あるいは循環系に関与する遺伝子の改変マウスも眼圧測定することにより、眼圧を修飾する遺伝子を発見できる可能性があり、それにより新たな眼圧制御機構ひいては薬物開発につなげることも夢ではない。

4) 眼圧下降薬開発モデルとしてのマウス

眼圧下降薬は他臓器にはない高度な房水動態という生理機構を修飾する点で特殊であり、*in vivo* での実験が必須であることから眼圧の維持機構、眼圧下降機序も未だに解明されていない点が多い。緑内障モデルとしてはサル眼が最も適しているが経済面、取り扱いの面で難点があり多くの実験が望めないが、マウスは上述のようにヒトと眼圧、房水動態、解剖の面で類似していることが判明しており、眼圧の生理機構の解明への実験系および眼圧下降の評価系として利用価値が高く、今後眼圧下降薬のスクリーニング系として有用であると考えられる。我々の行った一例を紹介する。プロスタノイド受容体 EP1~4 の特異的アゴニストを用いて眼圧下降効果が得られるかを検討した⁴⁴⁾。C57BL/6 野生型マウスでは、EP2 アゴニストである ONO-AE1-259-01 により濃度依

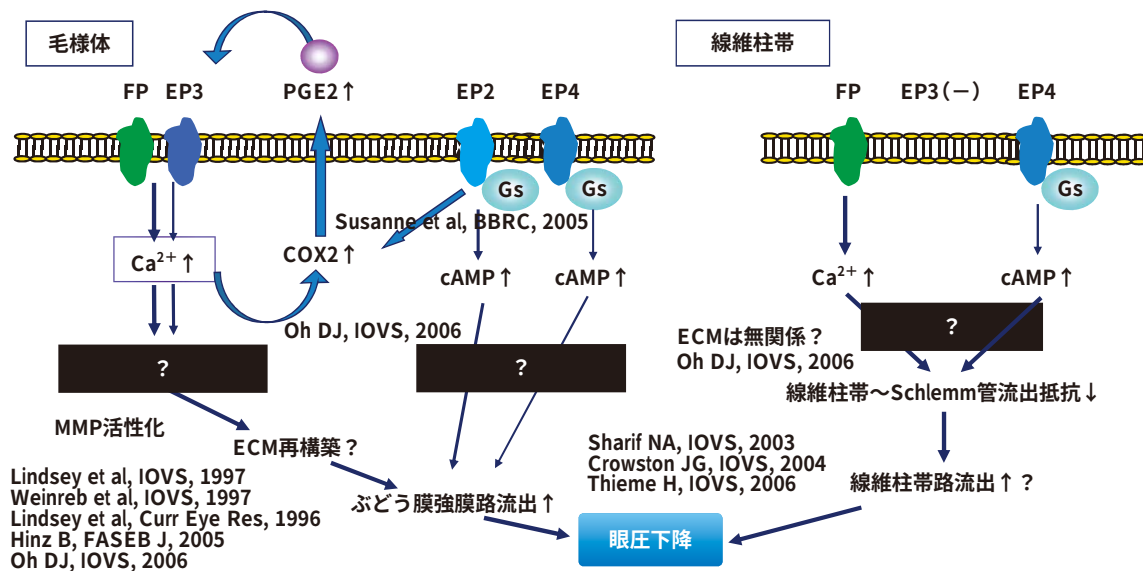


図 14 プロスタノイド受容体を介した眼圧下降作用(仮説)。

現在使用されている PG 関連薬の眼圧下降機序は、少なくとも FP 受容体を介する。さらに毛様体レベルでは FP 受容体刺激による内因性 PG 産生による EP 3 受容体を介したシグナルが PG 関連薬の眼圧下降効果を増強している可能性がある。線維柱帯レベルでも FP 受容体が存在するため何らかの房水流出促進の機序の可能性がある。一方、EP 2、EP 4 受容体も眼圧下降に関係があるが、現在使用されている薬剤はない。Gs: GTP 結合蛋白質, COX 2: cyclooxygenase 2, MMP: マトリックスメタロプロテアーゼ, ECM: 細胞外マトリックス。

存的に 2 時間後に最大眼圧下降効果が得られた。さらにその眼圧下降効果は EP 2 受容体欠損マウスで消失したため、受容体特異性のある眼圧下降効果であることが証明できた。同様な結果が EP 4 受容体アゴニスト ONO-AE1-329 でも得られている⁴⁴⁾(図 16)。したがって、プロスタノイド受容体は FP 受容体以外にも十分眼圧下降に寄与することができる可能性を秘めた受容体群であることが分かる。

マウスは飼育スペースが少なく経済的で同一環境下で 1 日で n=20 以上のデータが得られ、遺伝子改変マウスで作用機序も確認可能であることから、我々は他にも多くの薬剤のスクリーニング系として使用している。眼科領域の薬剤でマウスを利用して開発されてきた薬剤は現状では見当たらないが、その理由は他科との共通疾患である感染症、炎症に対する薬物は強い眼を使用する必要がないこと、一方で眼科特異的な疾患である緑内障についてはマウスでの眼圧をはじめとする基礎データがなかったことに起因する。今後は眼科特異疾患に対しマウスを用いた薬剤開発が推進されるものと期待する。

Ⅲ マウス緑内障モデルの評価方法

マウス後眼部のヒトとの解剖学的相同性と特徴を把握することは、GON モデルとして RGC 障害の機序を解明し、さらに障害に対する治療効果を評価するうえで重要である。マウスは直径 3 mm 程度の小眼球であり、その眼底評価は困難を有する。可能ならば、断片的に組織

学的な検討を行うより、経時的な評価方法が望ましい。

1. マウスの網膜、視神経乳頭

網膜はヒトと同様な層構造をしているが黄斑はなく、RGC 軸索は放射状に視神経乳頭に向かって走行する。視神経乳頭は乳頭面積に対して血管の割合が大きく、生理的陥凹が漏斗状に存在するため、眼底写真による乳頭の変化は評価することが難しいと思われる⁴⁵⁾(図 17)。また、マウスは確認された系統ではすべて篩板がないと報告されており、ヒトやサルと異なり興味深い^{45/46)}。中心動脈もヒトと同様に眼動脈の分枝であるが、乳頭血管は中心動脈の分枝であり、Zinn-Haller ring もなく毛様動脈系の血管支配がないのがヒトと異なっている⁴⁵⁾。網膜中心動脈は球後 300 μ m より前方で下方から視神経内に侵入し⁴⁷⁾、それに伴い軸索走行も変化する(一部投稿中)(図 18)。したがって、高眼圧による視神経障害パターンをマウスとヒトで比較することにより、視神経乳頭における特に篩板や血管を主とした構造と GON の関係を解明することが可能である。

2. 動物モデルでの RGC 障害の評価方法の現状

最近ではスペクトラル・ドメイン光干渉断層計(SD-OCT)の進歩により、ヒト、サルはもちろん、ラットでも網膜神経線維層欠損や視神経乳頭の画像評価が可能となってきたが⁴⁸⁾、経時的な観察への応用は臨床的にも未だ不十分である。特に小動物での評価方法として、以前は網膜スライス標本での RGC 層の細胞数カウントが行われていたが、標本の厚みを一定に薄くすることが困難

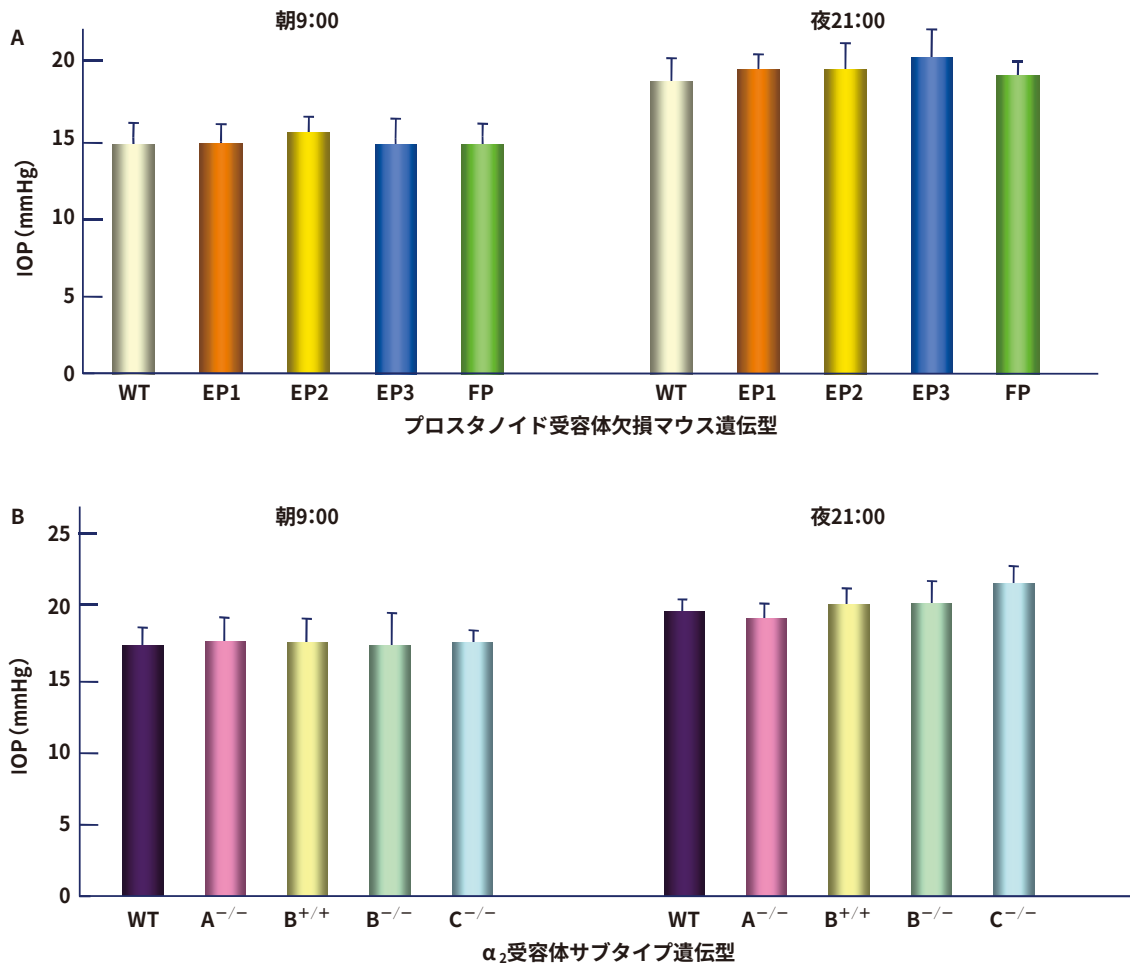


図 15 眼圧下降関連受容体と眼圧日内変動.

A: EP 1, EP 2, EP 3, FP 受容体は、眼圧下降に関係があるにもかかわらず、欠損マウスでは、眼圧ベースライン値および日内変動はまったく影響を受けない. B: 交感神経 α₂受容体のサブタイプ A, B, C を欠損したマウスでも眼圧ベースライン値および日内変動はまったく影響を受けない.

(文献 31, 39, 42 から許可を得て転載, 改変)

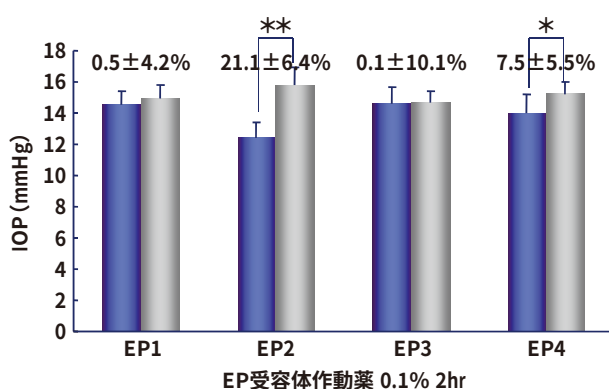


図 16 EP 受容体特異的アゴニストによる眼圧下降効果. C57BL/6 マウスにおける EP 1~4 各受容体特異的アゴニスト 0.1% を点眼後 2 時間の眼圧下降効果 (n=7~8). 少ないマウス数で容易に眼圧下降効果が評価でき、薬物スクリーニング動物として有用である. ■: 作動薬投与眼, ■: 溶媒投与眼. *: p<0.05, **: p<0.01, unpaired t test.

(文献 44 から許可を得て転載, 改変)

であり、評価領域がきわめて限局化され精度が劣る. また、視神経の電子顕微鏡写真により、軸索本数を計数する方法もあるが⁴⁷⁾⁴⁹⁾⁵⁰⁾、非常に時間と労力がかかるうえに、計数できる領域は 1 割にも満たない. 現在最も一般的な方法は、上丘から逆行性に蛍光色素を RGC 軸索内に取り込ませることにより、網膜フラットマウント標本での細胞数を計測する方法である. しかし、この方法でも脳内に侵襲的に色素を注入する煩雑さと、染色効率が必ずしも 100% にならないことが問題である. もちろん経時的な観察はできない. ラットではアポトーシスの初期シグナルを検出できる蛍光ラベルされた AnnexinV 硝子体注入法で *in vivo* でのアポトーシス細胞を検出できる画期的な方法が紹介されたが、侵襲的であり細胞数をカウントするほどの質の高い画像は得られていない⁵¹⁾. 当然ながら眼球が小さいマウスへの応用は困難であり、非侵襲的に RGC 障害を評価する系の開発が急務であった. 最近では RGC 障害を網膜電図による評価⁵²⁾、RGC に蛍光発現するマウスを用いて、視神経控減モデルにお

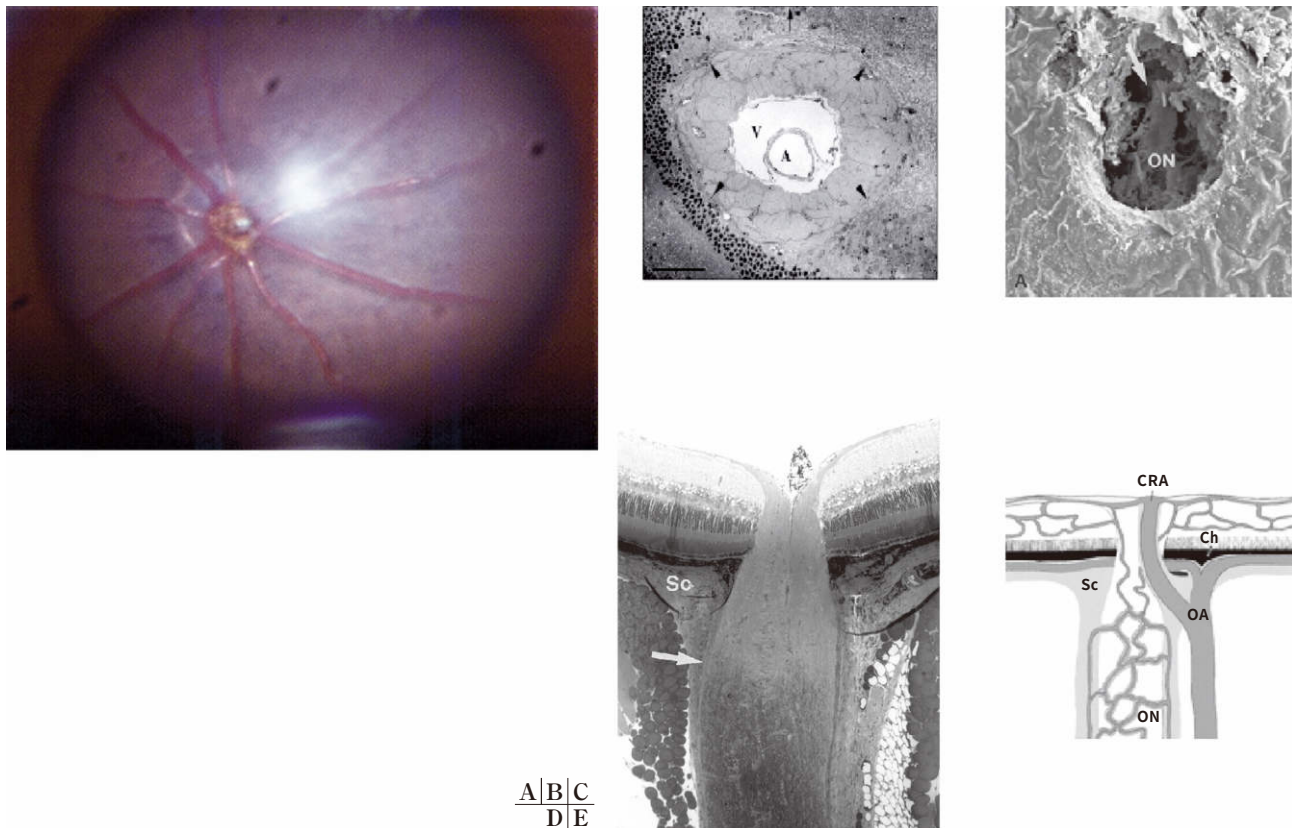


図 17 マウス視神経乳頭の構造.

- A : 眼底カメラで撮影したマウス眼底写真. 乳頭に比して中心動静脈が太いことが分かる. ヒトやサルのような乳頭変化の観察は困難である.
- B : 電子顕微鏡写真によるマウス視神経乳頭網膜レベルでの断面図. 網膜中心動脈(A), 静脈(V), および強膜リング(矢頭).
- C, D : 走査電子顕微鏡による視神経乳頭トリプシン消化標本(C)と光学顕微鏡による乳頭視神経のパラフィン切片縦断面(D). ヒト, サルと異なり篩板を形成するコラーゲン構造がないことが分かる.
- ON : 視神経, Sc : 強膜.
- E : 視神経乳頭および視神経の血管支配模式図. OA : 眼動脈, Ch : 脈絡膜, CRA : 中心動脈.

(B : 文献 47, C, D, E : 文献 45 から許可を得て転載, 改変)

ける経時的な RGC 障害を把握したり⁵³⁾, magnetic resonance imaging (MRI) による変性評価⁵⁴⁾, 視力, 学習, 記憶といった機能から RGC 障害を評価できることも興味深い⁵⁵⁾. しかし, いずれも RGC 細胞数を詳細に評価することはできない. そこで我々は, 以前から注目していた RGC 特異的に蛍光を発現する遺伝子改変マウス, B6. Cg-TgN(Thy1-CFP)23Jrs (CFP マウス) を用いて, 経時的に RGC 障害を評価することを試みた.

3. CFP マウスでの RGC 評価

B6. Cg-TgN(Thy1-CFP)23Jrs (以下 CFP マウス)⁵⁶⁾, Thy 1 プロモーター領域を利用して Thy 1 発現細胞に蛍光色素である cyan fluorescein 蛋白質を強制発現させた遺伝子改変マウスであり, この系統は特に RGC での発現率が高く, 一部アマクリン細胞にも発現がみられる. その発現を確認するために, 従来の逆行性染色法を用いて, 発現効率を確認したところ DiI 陽性 RGC のうち CFP 発現細胞は 73%, 逆に CFP 発現細胞中, DiI 陽性

RGC は 97% であり, 計数可能な CFP 発現細胞はほぼ RGC であると結論した(図 19). 図の 1 細胞を観察すると CFP 発現細胞は, 蛍光蛋白質が細胞体全体に発現するため細胞境界が鮮明であり, 重なっていても別細胞であることが確認できるが, 一方 DiI は顆粒状であり, 蛍光強度が弱く細胞によって取り込みが不均一である. さらに, 細胞体の境界が不鮮明であるために重なっている場合は, 単一か否かが判定できない. したがってこの CFP 発現マウスの RGC の評価は容易であり, 細胞計数に適している⁵⁷⁾.

続いて切片でも, 発現細胞の網膜内での位置を確認したところ, ほとんど網膜神経節細胞層に存在し, 一部内網状層にも存在していた⁵⁷⁾(図 19 D, E, F).

次に非侵襲的な評価方法として, 既存の臨床用の眼底カメラ (Topcon TRV50-IX) を改造し CFP 用のフィルターを装填して, 対物レンズに 40 D の球面レンズを追加し, マウス小眼球に対応できるようにした(図 20). 画

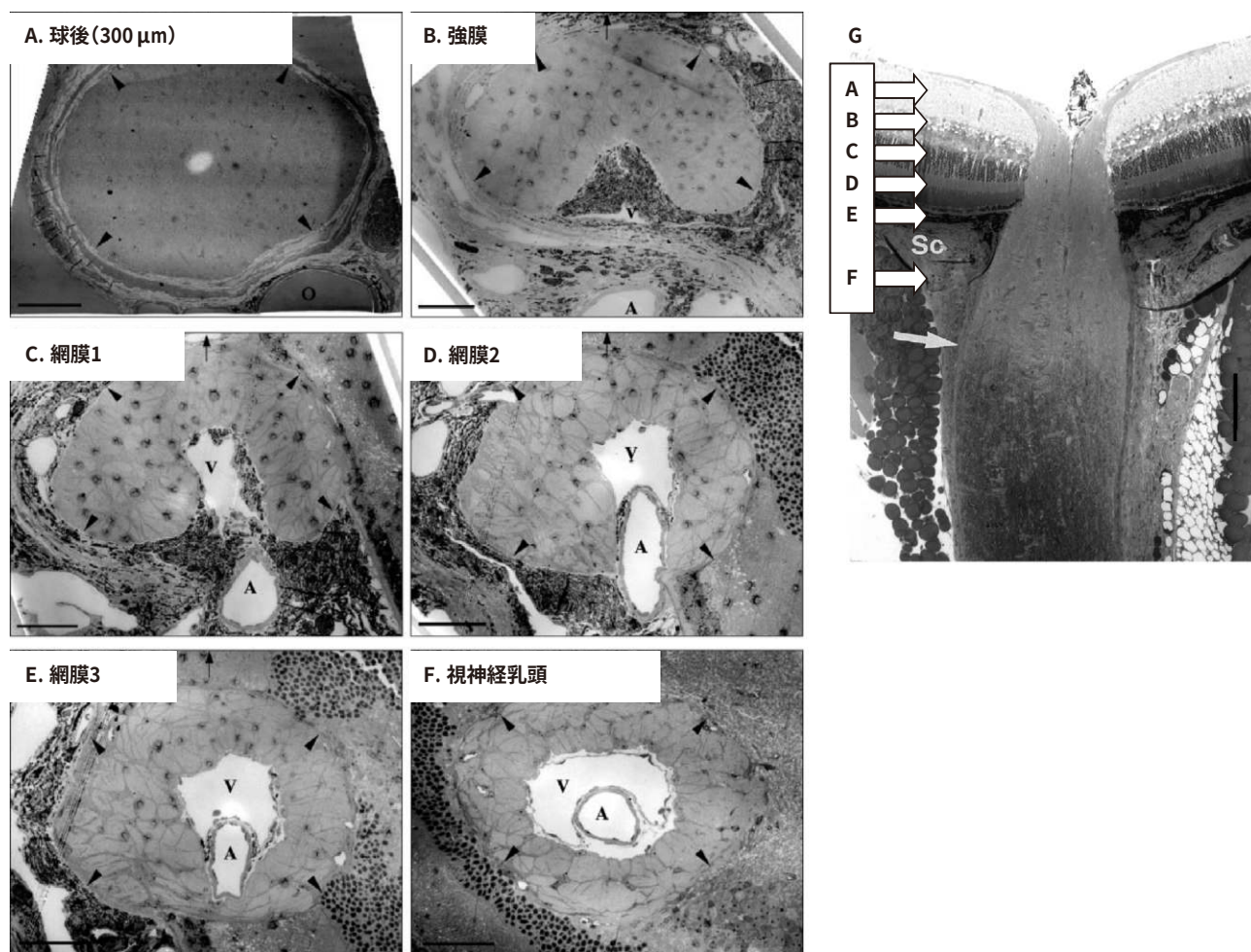


図 18 マウス視神経の構造.

G に示す視神経の各レベルに応じた切断面 A から F を示す. 図の下が視神経の下方を示す. 網膜中心動脈 (A), 静脈 (V), および強膜リング (矢頭) で示される視神経軸索および動静脈の走行が変化することが理解できる.

(文献 47, 文献 45 から許可を得て転載, 改変)

像処理を行い, 撮影した図を示す (図 21). 最周辺までの撮影は困難だが, 一度に 20 度の画角が撮影できるのは共焦点レーザー走査顕微鏡 (cSLO) と同様であり, しかも解像度は cSLO の 10 度撮影と同様である⁵⁷⁾. 図 21 の F と G の□を含んだ画像は, 同一眼の同一箇所を F では眼底カメラ, G ではその後フラットマウントにして蛍光顕微鏡下で撮影したものである. H, I は F, G の同一箇所の拡大であり, 対応する細胞はともに良好な蛍光を発し細胞 1 つとして数えられることが判明した. CFP マウスの RGC はきわめて安定して CFP を発現し, フラットマウントにしても新鮮であれば細胞から漏れることもなく, 細胞体一つひとつを鮮明にとらえることが可能である. このように解像度が高いことにより, 例えば 1 細胞の減少もとらえることができた (図 21 J, K). 図 J と K は 1 週間の間隔を置いて撮影されたものであるが, その再現性もさることながら, 矢印で示される単一細胞の消失が観察された. このように経時的に細胞 1 つの減少を確実にとらえられる方法は, 過去に報告がな

く, 我々の開発した眼底カメラを用いた経時的 RGC 障害評価方法は, 従来方法より精度が高いため, 短期間かつ少ない対象動物数で, 実験結果を示せるものと期待される.

4. CFP マウスを用いたマウス虚血再灌流モデル

緑内障モデルを模したものである. 虚血再灌流モデルがしばしば用いられている. 今回 CFP マウスを用いて, 経時的に RGC 障害をとらえることを試みた. 図 22 は既存の条件で 110 mmHg の高眼圧で 60 分間虚血にしたのち, 再灌流を行った後⁵⁸⁾, 毎週眼底撮影して経過を追ったものである. 上段の一部を拡大した下段を見れば, 1 週間での RGC の急激な減少に引き続き, その後は緩徐な減少に留まることが観察できる. 1 週間後から 1 週間ごとの減少率は $34.2 \pm 7.5\%$, $24.1 \pm 9.1\%$, $23.0 \pm 9.3\%$, $22.2 \pm 8.4\%$ (平均値 $\pm$ 標準偏差, $n=5$) であった. このような経時的な減少スピードも, 少数の対象で容易に評価できる点が本法の大きな利点である. さらに, 虚血再灌流 4 週間後の組織切片と DiI による逆行性染色を行っ

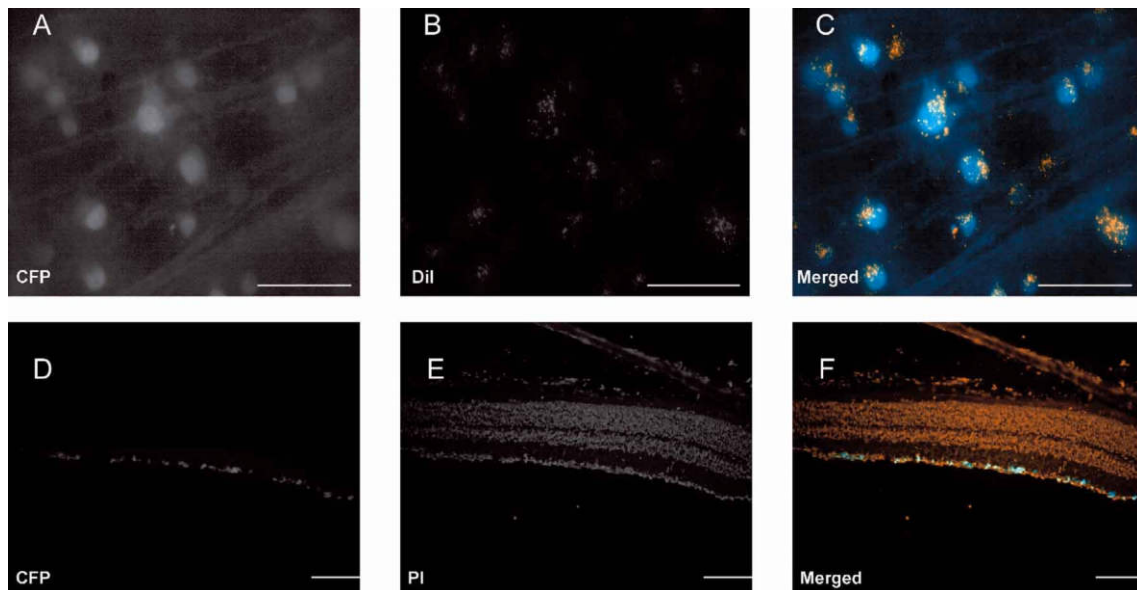


図 19 B6.Cg-TgN(Thy1-CFP)23 Jrs マウス(CFP マウス)の蛍光発現細胞の確認。

A, B, C : 同一部位のフラットマウント網膜拡大写真. A : CFP(cyan fluorescein 蛋白質)発現細胞, B : DiI による逆行性染色を用いた蛍光写真. C : A と B 画像の合成. CFP は細胞体全体に発現し容易に細胞が同定できるのに対し, びまん性に細胞内に取り込まれる DiI では細胞の境界が不明瞭である.

D, E, F : 同一部位の網膜凍結切片(下方が眼球内層). CFP は網膜最内層に発現していることが(D), Phospholine Iodide を用いた核染色(E)と比較すると(F: 合成)判明する.

(文献 57 から許可を得て転載, 改変)

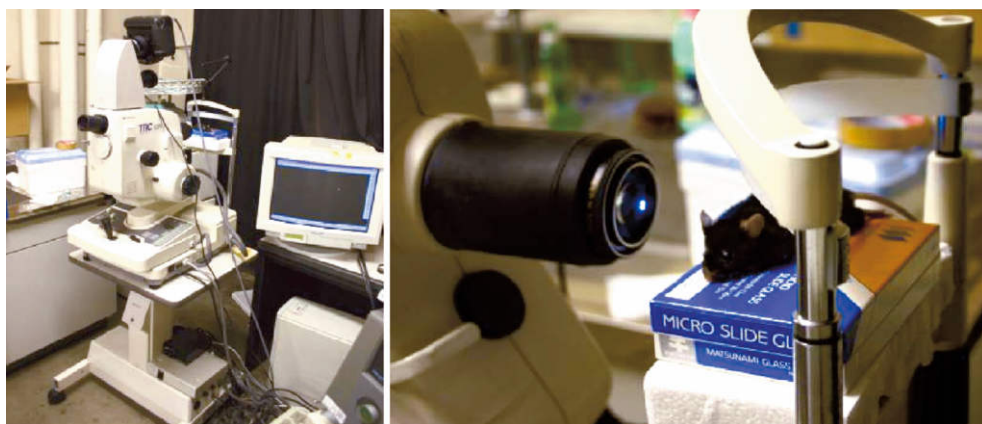


図 20 マウス蛍光眼底撮影装置。

従来臨床的に用いられている眼底カメラ(Topcon 社製: TRV50-IX)のフィルターを CFP 用に変更し, 接眼レンズに 40 D の球面レンズを装着したもの。

たところ(図 23), 虚血により内層を中心に網膜厚が減少することを確認したが, 興味深いことに, 残存した CFP 陽性細胞中 DiI 陽性細胞は 98% であり, 虚血モデル作製前の陽性率 97% と同様であったのに対し, DiI 陽性細胞中の CFP 陽性細胞は 59% しかなく, 虚血モデル作製前の陽性率 73% と比べ有意に減少していた($p < 0.03$). このことより, 従来の逆行性染色法では細胞が完全に消失した後も DiI などの蛍光色素が分解されにくく残存することで, ラットでの報告のように散逸するもののミクログリアに捕らえられ集積するようなことが起

こり, データ解析が困難になることと比べ, 本法では CFP は正常機能を保持した細胞で遺伝子発現から蛋白質合成を経て発現される生体機能指示マーカーであるから, DiI より早期に細胞体から消失することを意味する. つまり, 細胞死の際には構造障害より, 蛋白質合成などの細胞生体機能障害が先行することを利用した評価方法といえる. したがって, 本法は従来の方法と比較して, その細胞計数での精度の高さに加え, 細胞機能低下をより早期に検出できる優れた方法であると考えられる.

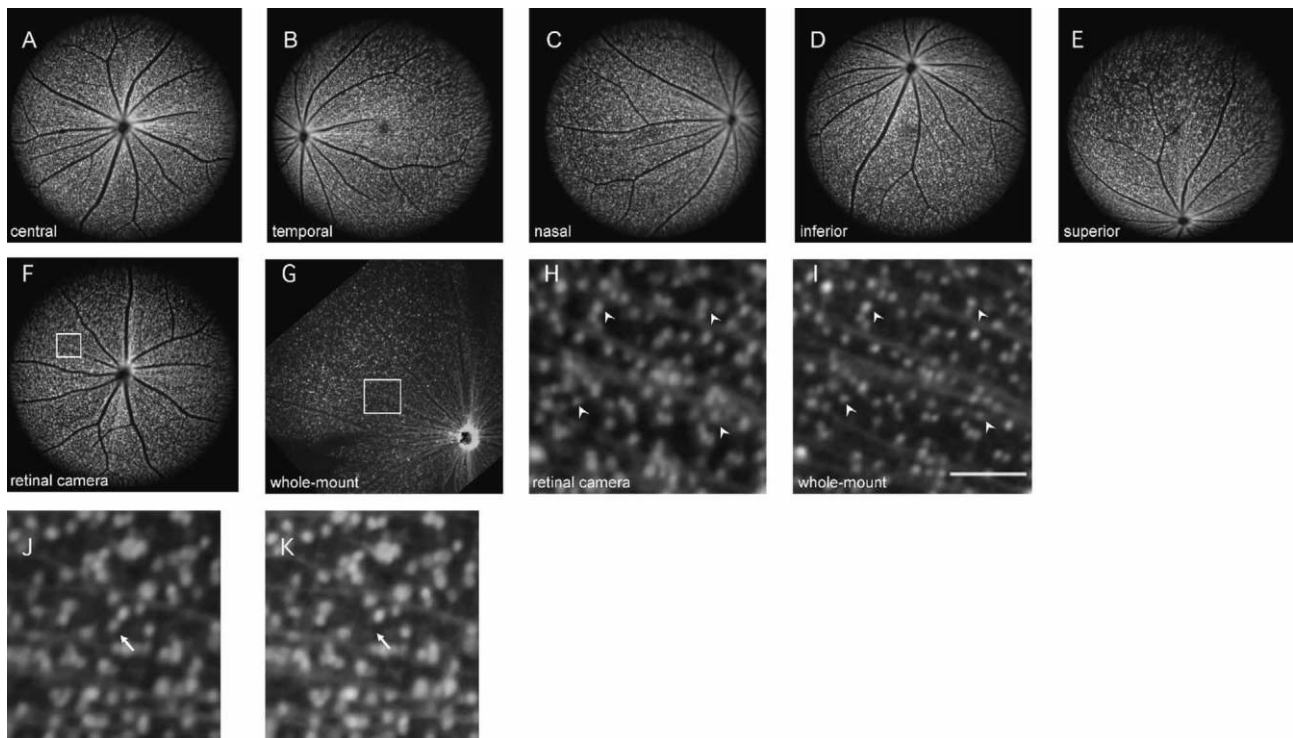


図 21 CFP マウスの眼底写真.

A~E: 蛍光眼底カメラによる CFP マウスの中心および上下耳鼻側 4 方向の眼底写真. F, G: 眼底カメラと同一眼のフラットマウントイメージ. H, I: 同一眼の同一箇所 (F, G 内の□) を拡大したもの. 矢頭は対応する 4 細胞を示す. 眼底カメラおよび網膜フラットマウント蛍光顕微鏡像ともに良好な解像度で RGC 1 つを検出可能である. Bar = 100 μ m. J, K: 1 週間の間隔を置いて撮影された同一眼同一部位. 矢印の細胞が自然に消失していることが分かる. 経時的に生体眼で RGC 1 個の消失が観察された実験系は初めてである. (一部を文献 57 から許可を得て転載, 改変)

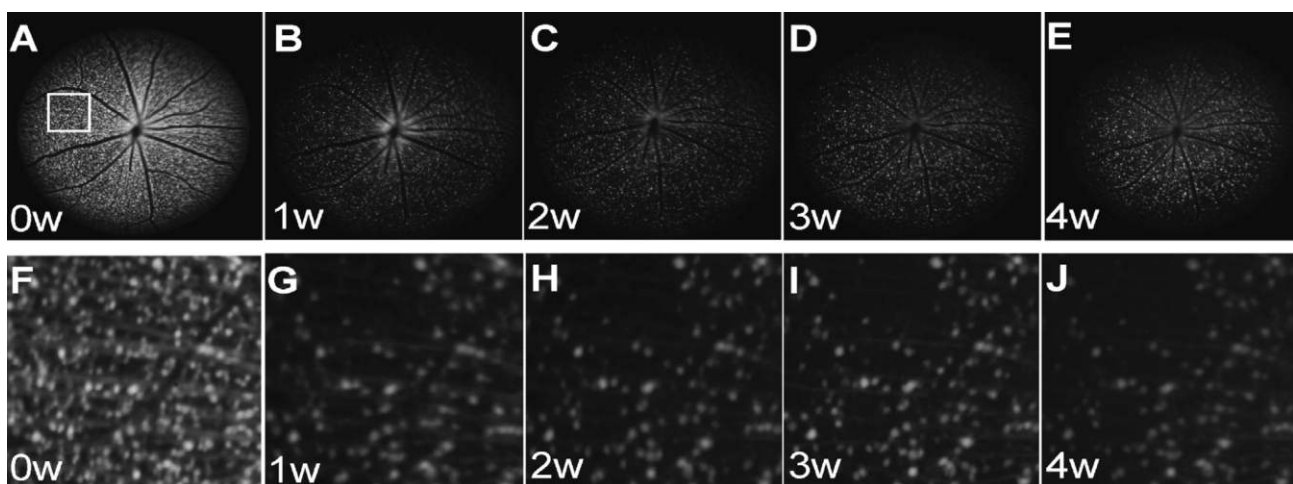


図 22 CFP マウス虚血再灌流モデルの RGC 障害の生体内評価.

上段は眼底写真弱拡大で下段に□の拡大図を示す. 毎週経時的に同一部位の細胞減少をカウントすることができる.

(文献 57 から許可を得て転載, 改変)

5. CFP マウスの RGC 障害モデルへの応用

以上のように CFP マウスの蛍光眼底写真を眼底カメラを用いて撮影することで, 非侵襲的に, 同一眼同一部位で RGC の経時的な変化をとらえることができる.

我々は, 視神経挫滅モデル, および高眼圧モデルマウスでも CFP マウスを評価し, 細胞障害パターンを評価することができた(投稿中). もちろん, 従来の逆行性染色による RGC 染色眼でも同様に撮影が可能である. 本法

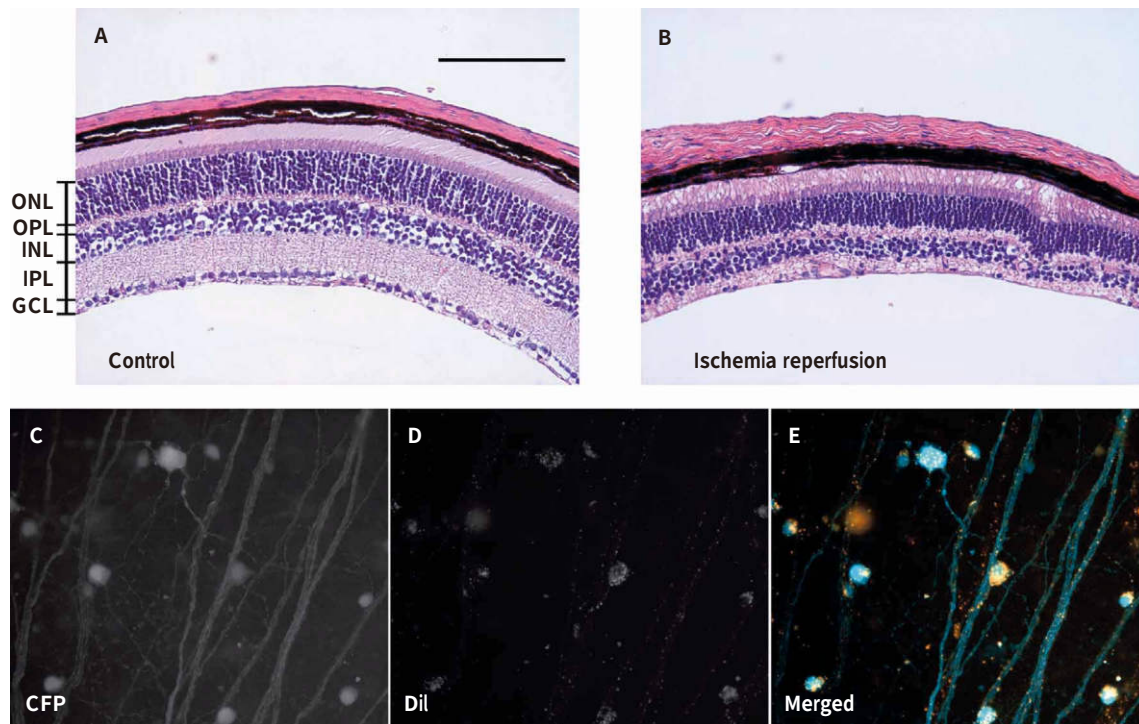


図 23 CFP マウス虚血再灌流モデルの RGC 障害の組織学的評価。

A, B: 虚血再灌流 4 週後の網膜 HE 染色凍結切片. A: 対照眼. Bar=100 μ m. B: 虚血再灌流処置眼. B では網膜全体が薄くなり, 特に RGC が減少していることが分かる. ONL: 外顆粒層, OPL: 外網状層, INL: 内顆粒層, IPL: 内網状層, GCL: 網膜神経節細胞層. C, D, E: 網膜フラットマウントでの RGC 障害評価. DiI による逆行性染色を行い, DiI 発現細胞と CFP 発現細胞を確認したところ (E), DiI のみ発現し CFP が消えている RGC が散見していることが分かる. DiI が細胞体から消失するよりも早く CFP の発現が障害されることが予想されるため, 細胞死の際は生体機能の方が構造よりも早期に障害されることを裏付けている.

(一部を文献 57 から許可を得て転載, 改変)

の欠点としては角膜, 中間透光体の混濁が生じている場合には撮影が不可能である点である. しかし, その場合でも, ある一定期間でのフラットマウントでの評価は従来どおり可能であり, 蛍光顕微鏡写真でも示したとおり, 細胞計測は従来の方法より容易である. 本モデルマウスは, 特に視神経構造が異なるマウスにおいて, 高眼圧によりどの場所から, どのような時間経過で RGC 障害が起きるかを評価するために重要なツールであると位置づけて解析を進めている. 将来的にマウスにおいて高眼圧による細胞障害パターンが判明すれば, ヒトとの相同性を十分に評価しながら GON の本態に迫ることができる知見が得られると信ずる.

IV マウス緑内障モデル

緑内障の最大の危険因子は眼圧である. 急性高眼圧, 慢性高眼圧, あるいは正常眼圧緑内障 (NTG) で考えられている健常眼圧による RGC 障害には視神経乳頭の構造が関係しているといわれている⁵⁹⁾ (図 24). 特にヒトやサルでは篩状板が存在し, その層板がずれたり remodeling が起こり, ひいては機械的に軸索流障害や血流障害が起きて視神経軸索障害が生じると考えられてい

る. ヒトでは典型的には上下耳側の軸索が障害されやすく, 特に篩状板の孔が大きいいためずれに弱く特異的障害が起きやすいのではないかと考えられている^{60)~63)}. また, 中心動脈の走行部位より離れたところが障害されやすいという説もある⁶⁴⁾. 未だヒトでの軸索障害機序は判明しないわけだが, 少なくとも篩状板と乳頭血管は大きな役割を果たしている. そこで, 篩状板がなく, 乳頭血流が毛様動脈系ではなく中心動脈系であるマウスの高眼圧モデルを作製し, どのような障害パターンが起きるかを追究することは, GON の発症機序に迫る知見が得られるはずである. さらに眼圧下降効果の検証や, GON に対する眼圧下降効果あるいは神経保護効果の検証にも, 高眼圧による緑内障モデルの開発が不可欠である. 既に眼圧測定が可能になったことから, 膨大な系統のマウスを保持しているアメリカの Jackson Laboratory では 1990 年代末からスクリーニングを開始し, 自然発症の 2 系統の高眼圧モデルマウスを見出すことに成功した. さらに人工的な高眼圧マウスもサルやラットでの手法を用いて開発されてきている.

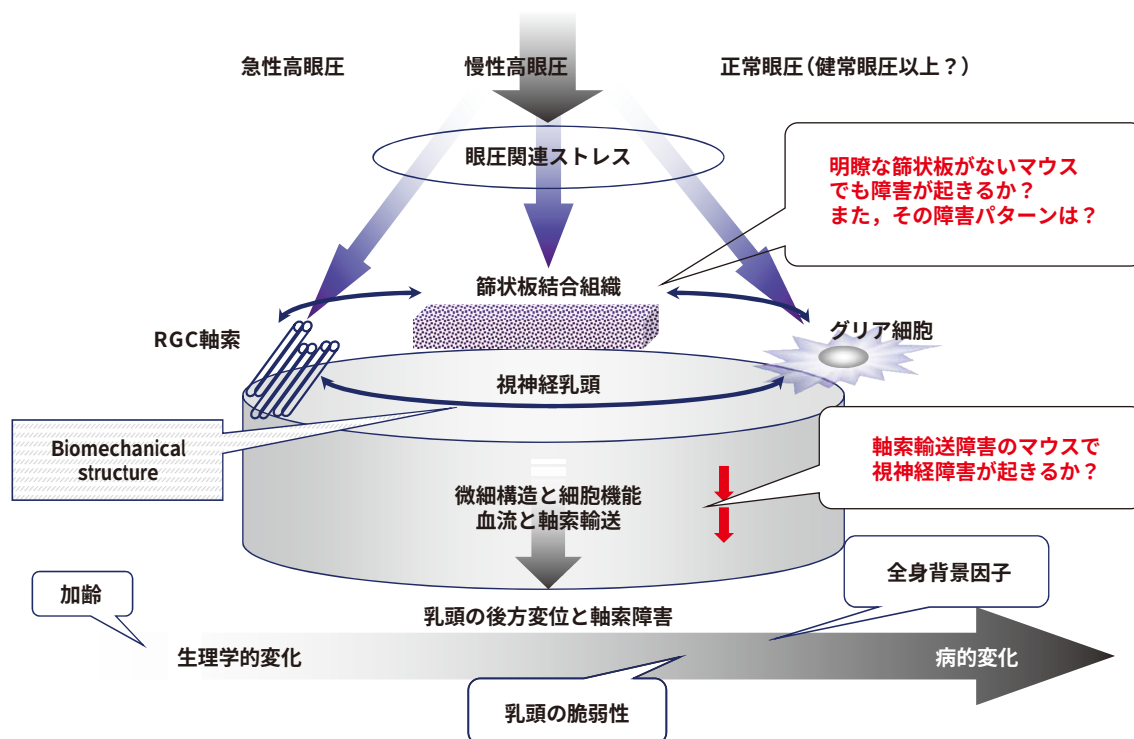


図 24 緑内障の視神経乳頭変化の機序とマウスモデルでの検証。

1. 高眼圧モデルマウス

1) 自然発症高眼圧モデルマウス

1998年にJackson Laboratoryのマウス系統のなかから眼圧が高いマウスとして報告されたのがDBA2Jマウスである⁶⁵⁾。このマウスは、成長とともに眼圧が半年ぐらいの間上昇し、色素散布による慢性高眼圧モデルとして近年よく利用されているが、解析が進んで高眼圧の原因といわれる2つの遺伝子異常以外に種々の問題も見出されており、次項に詳細にまとめた。また、閉塞隅角モデルマウスとしてDBA2NNiaマウスも報告されている⁶⁶⁾⁶⁷⁾。このマウスではRGCの減少も報告されているが⁶⁸⁾、眼圧に関する詳細な報告がなく、nNOS陽性のアマクリン細胞がRGC障害に関係があるとの報告や⁶⁹⁾、篩板がないにもかかわらず軸索障害、乳頭陥凹が起これ、網膜脈絡膜血管異常もないことから高眼圧によるRGC障害に篩板は無関係ではないかと示唆する報告がなされており⁷⁰⁾、高眼圧モデルとしては不確定要素が多く利用価値が低い。

2) DBA2J系統高眼圧マウス

DBA2Jマウスはiris stroma atrophyとiris pigment dispersionを起こす色素緑内障の病態を呈する系統である。月齢とともに前眼部に色素散布がみられ、それに伴い眼圧が上昇、約半年持続し緑内障性視神経萎縮を起こす⁶⁵⁾⁷¹⁾。

表2にDBA2Jマウスを用いた報告のサマリーを示す。当初は組織学的解析により、RGCの障害パターン

や遺伝子発現、グリア細胞の関与といった細胞障害の機序を解明する報告がなされた。例えば、マウスでもRGC障害は軸索から起これ細胞体は遅れて変性することから、高眼圧での細胞障害起点はやはり視神経乳頭にあることが証明された^{72)~74)}。続いて、点眼、レーザーなどの眼圧下降効果、遺伝子治療の試み、遺伝子改変マウスとの交配研究も行われさまざまな知見が得られている。詳細は表2を参照されたいが、雌の眼圧が高いこと、個体差が多く虹彩萎縮、瞳孔偏移などの前眼部異常のため、眼底が観察しにくいことなどの問題があり、また前房関連免疫偏倚(ACAID)が障害されていることも判明している点に留意されたい⁷⁵⁾。また、最近の報告ではこのマウスの高眼圧原因遺伝子の一つ、Gpnmb遺伝子異常を正常化したところ、高眼圧にもかかわらず細胞死がみられなくなったということも指摘されている⁷⁶⁾。したがって、高眼圧は事実であるが、自然発症モデルとしての欠点すなわち未知の遺伝子変異が背景として存在するため、高眼圧性のRGC障害機序が修飾されている可能性がある。また、実験としては対照系統すなわち、これらの遺伝子異常がない正常マウスが必要だが、自然発症なので既知の遺伝子異常以外の背景因子は不明であり、現状では近い系統を用いるしかない。以上のように、高眼圧モデルとして利用されているが、実は別の因子による細胞死をみている可能性もあり今後の報告に注目したい。

2) 人工作製高眼圧マウス

手術手技を用いる人工的高眼圧モデルマウスとしてレ

表 2 マウス緑内障モデル

分類	自然発症モデル		人工作製モデル	
種類	DBA2NNia	DBA2J	レーザーによる誘導	129-Colal ^{tm1jae}
機序	隅角閉塞	色素緑内障	隅角閉塞	流出抵抗上昇?
遺伝子異常・変異	不明	Gpnmb, Tyrp 1	無関係	Colla1
眼圧	<20 mmHg 測定が不正確	最高値<20 mmHg 30% 上昇	30 mmHg 台から下降	20~25 mmHg 30% 上昇
眼圧の個体差	大	大, 前眼部異常に依存	大	小
持続	月齢 8~12 か月の期間上昇, その後正常	徐々に上昇, 維持	2 か月で下降, 正常値となる	徐々に上昇, 6 か月以降 継続
視神経異常	15 か月以降 個体差大	22 か月までに発病	3 か月以降, 障害が強い	1 年で 30% 障害, 緩徐 な障害
その他	明確な対照系統がない	虹彩変異, 萎縮, 白内障, ACAID 消失, 新生血管		

ACAID: 前房関連免疫偏倚

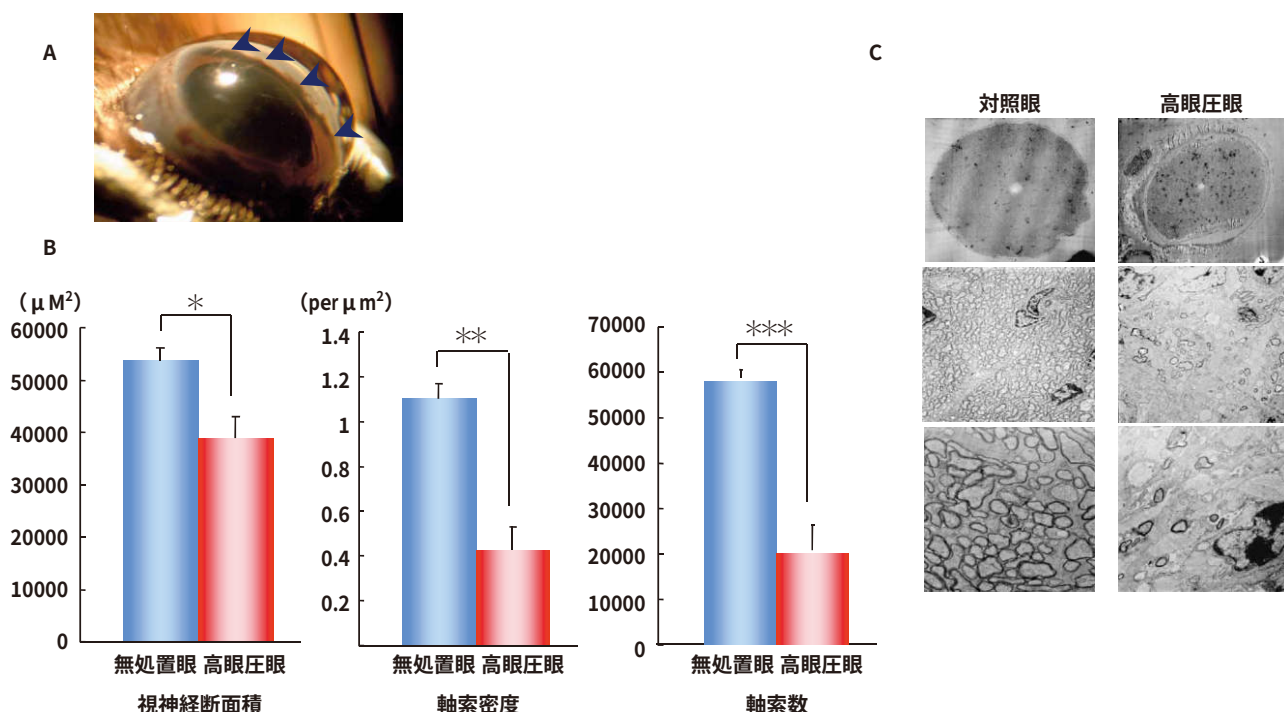


図 25 レーザー高眼圧モデルマウスと軸索障害.

A: レーザー高眼圧による隅角閉塞(矢頭). B: 高眼圧後 12 週までの視神経断面面積, 軸索密度, 軸索数の変化. いずれも高眼圧眼で有意に減少している. *: $p=0.0012$, **: $p=0.0005$, ***: $p<0.0001$. C: 高眼圧後 12 週の視神経断面の電子顕微鏡像. 高眼圧により有意な軸索障害が起きている.

(一部を文献 49 から許可を得て転載, 改変)

レーザーによる隅角閉塞 2 法と上強膜静脈結紮法が報告されている^{47)49)77)~79)}. レーザーにより隅角閉塞を作製して眼圧を上昇させるモデルは, 前房水を抜いて狭隅角にした後にレーザー照射する方法と⁷⁷⁾, 前房内にインドシアニングリーンを注入した後に照射する方法⁷⁸⁾だが, いずれもレーザーによる侵襲と手技の煩雑さ, 高眼圧期間が 8 週間ほどであること, 一方, 上強膜静脈結紮によるモデルも高眼圧期間が 3 週間程度であることから, 慢性高眼圧モデルとしては 3 法とも欠点がある. 我々の開発し

たレーザー高眼圧モデルは平均 1.3 倍の高眼圧により 12 週までに, 視神経断面面積減少 $28.5 \pm 23.4\%$, 軸索密度減少 $57.8 \pm 37.8\%$, 軸索数減少 $63.1 \pm 38.1\%$ といった結果が得られる⁴⁹⁾(図 25). 短期間で結果が得られるものの早期の一過性高眼圧や炎症も生じることを念頭に置きたい. 軸索障害パターンとしては正常眼と高眼圧眼との比較でも(図 26), また高眼圧眼の同一神経内での比較でも(図 27)視神経上方からが障害されやすいのは興味深い⁴⁷⁾. 図 18 のように, 視神経上方線維は網膜中

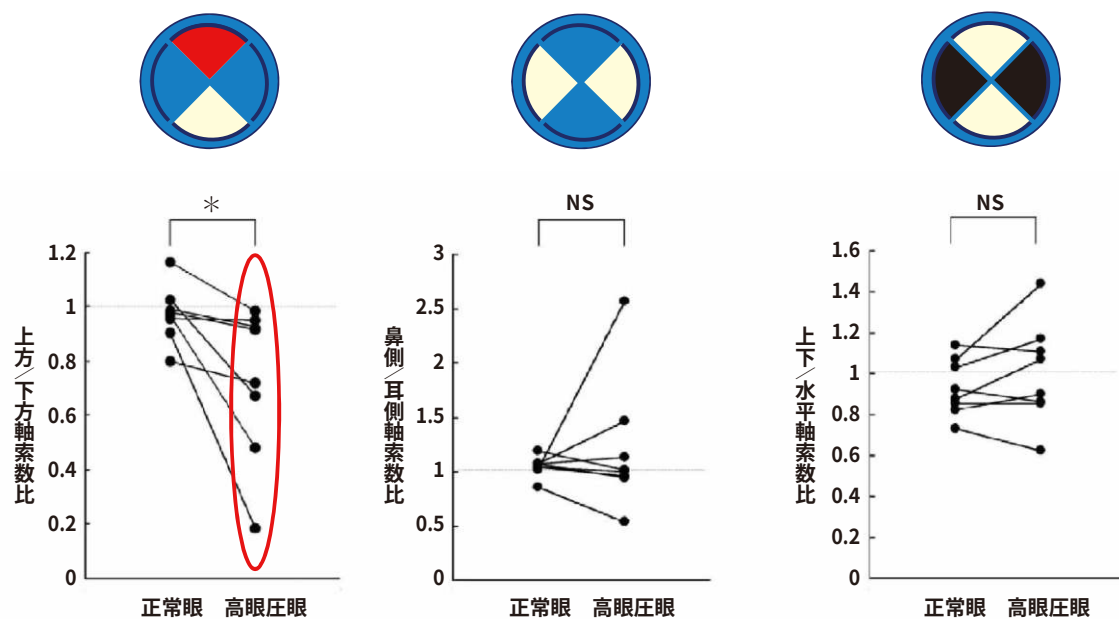


図 26 高眼圧マウスにおける視神経の部位別障害パターン。

高眼圧マウスの視神経軸索数による部位別障害を高眼圧眼と対側の正常眼で比較したところ、上方線維がより障害されやすいことが判明した。上部の添付図は比較した視神経断面 4 象限を示す。* : $p=0.012$, NS : 有意差なし。

(文献 47 から許可を得て転載, 改変)

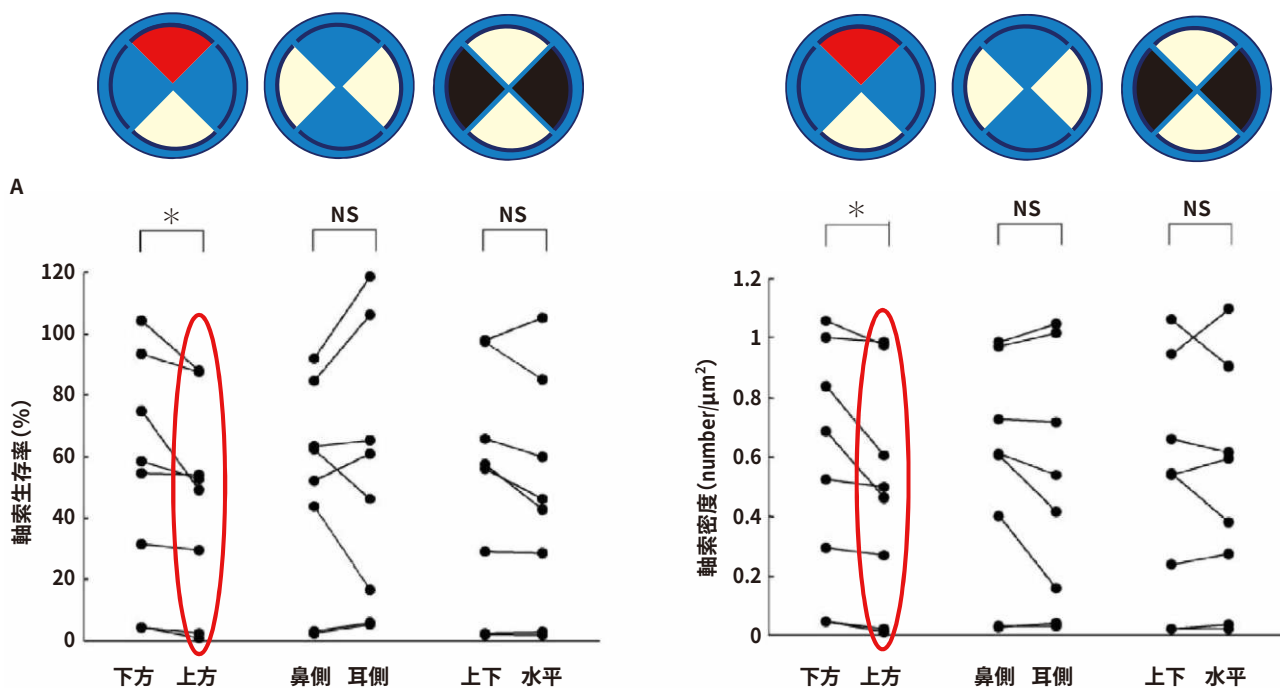


図 27 高眼圧マウスにおける視神経の部位別障害パターン。

高眼圧マウスの同一視神経内での軸索生存数および軸索密度の部位別比較。上方線維がより障害されやすいことが判明した。上部の添付図は比較した視神経断面 4 象限を示す。* : $p=0.012$, NS : 有意差なし。

(文献 47 から許可を得て転載, 改変)

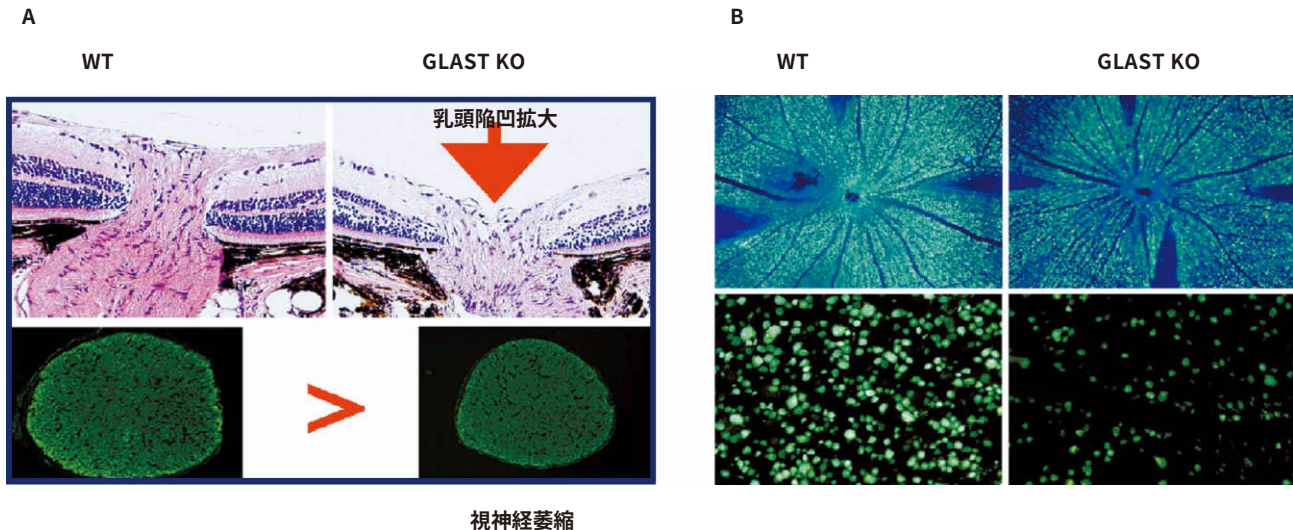


図 28 Müller 細胞グルタミン酸トランスポーター GLAST 欠損マウスにおける RGC 障害。

A: マウス乳頭 HE 染色切片および視神経乳頭断面。左(WT)は野生型で、右(GLAST KO)は GLAST 欠損マウス。GLAST 欠損マウスでは網膜神経線維層の菲薄化と乳頭陥凹拡大、さらに視神経の萎縮が著明である。B: マウス網膜フラットマウントの蛍光顕微鏡画像。左は野生型で、右は GLAST 欠損マウス。上方は弱拡大で下方は強拡大。RGC 減少による乳頭陥凹と視神経萎縮が著明である。

(文献 91 から許可を得て転載、改変)

心動静脈に対して離れている。マウスは篩板構造がなく、乳頭血管も中心動脈栄養なので、マウスでの障害は乳頭血流障害で血管から遠位の神経ほど障害されやすいのかもしれない。篩板構造がないマウスでの軸索障害は篩板が発達しているヒト乳頭との比較により、興味深い知見が得られる可能性がある。

ラットも同様な手技で高眼圧モデルが作製されているが、サル以外の慢性高眼圧モデルとしては数か月持続するような理想的なモデルが少ないのが現状であり、今後の発展が期待される。

3) 遺伝子組換え緑内障モデルマウス

i) myocilin 遺伝子関連マウスモデル

ヒトの原発開放隅角緑内障(POAG)関連遺伝子として見出された myocilin であるが、マウスの myocilin の同定、発現が確認されたが⁽⁸⁰⁾⁽⁸¹⁾、マウス myocilin にヒトで認められる遺伝子変異を起こしても高眼圧には至らなかった⁽⁸²⁾。ところが、ヒトの変異 myocilin をマウスに発現させると高眼圧になり⁽⁸³⁾、またその機序には PTS1R という結合蛋白質が関与することが判明した⁽⁸⁴⁾。ヒトで認められた遺伝子異常を用いて初めて高眼圧マウスが作製されたことは今後の実験ツールとして有望である。欠点としては、RGC 障害が緩徐で 1 年で周辺部の RGC が 20% 減少するだけであるため、実験には時間を要する。

ii) その他の遺伝子組換えモデルマウス

古くは cMyc 遺伝子発現マウスが先天緑内障様な眼病を呈するという報告がある⁽⁸⁵⁾。また遺伝子改変マウスの高眼圧モデルとしては、コラーゲン I の遺伝子変異マウス B6, 129-*Col1^{tm1Jae}* (*Col1a1^{tr}*)がある⁽⁵⁰⁾⁽⁸⁶⁾。コラーゲ

ン I の α_1 フィラメントのマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)による切断部位が代謝されない変異マウスで、加齢とともにコラーゲン I が蓄積し、眼圧が上昇する。*Col1a1^{tr}* は非侵襲的な状態で慢性的に安定して眼圧が上昇し、1 年で約 30% の軸索数が減少するため、緑内障モデルとして理想的であったが、残念ながら日本のコロニーでは眼圧が上昇せず眼圧上昇が確認できない。また、PITX2 強制発現により Axenfeld Rieger 症候群類似で角膜厚が薄くなる先天緑内障モデルマウスの報告が近年 3 報ある^{(87)~(89)}。また、毛様体に adrenomedullin 受容体過剰発現により閉塞隅角緑内障を呈するという興味深い報告もある⁽⁹⁰⁾。

2. 眼圧非依存性網膜神経節細胞障害モデル

日本人には NTG が多いことから、眼圧以外の RGC 障害因子として、虚血による低酸素、酸化ストレスや、遺伝子異常など多くの因子が推定されている。そのうち、神経伝達物質として必須のグルタミン酸は組織内濃度が過剰であると、アポトーシスを惹起することが実験的に証明されており、網膜内でも同様な病態が引き起こされている可能性がある。実際に網膜内では RGC および Müller 細胞にグルタミン酸トランスポーターが存在しグルタミン酸濃度調節機構が働いている。我々は細胞膜に存在するグルタミン酸トランスポーターに着目し、それらが欠損したマウスでは正常眼圧にもかかわらず RGC が障害されることを示した⁽⁹¹⁾(図 28)。図 29 のように、このマウスの細胞減少は生後 8 週まで急速であるがその後は安定する特徴がある。これは、早期に RGC が急激に減少することで、組織内のグルタミン酸濃度のバ

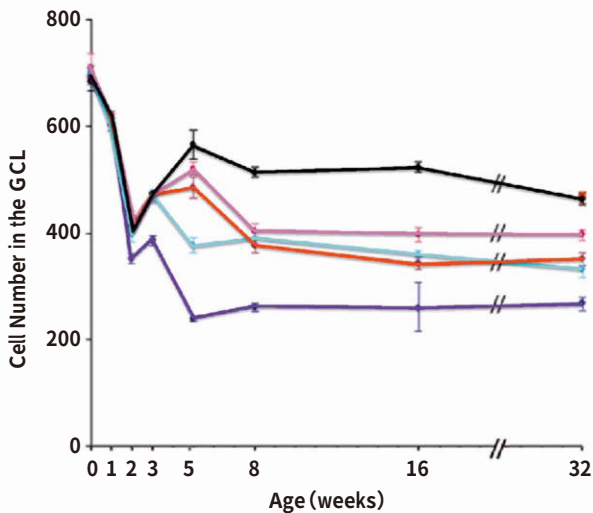


図 29 グルタミン酸トランスポーター欠損マウスの RGC 減少の時間経過.

いずれの遺伝子型でも生後 2 週目で一過性の細胞数減少とその後の増加がみられるが、8 週以降の細胞減少がみられないことが特徴である。発生早期のみの障害であることが興味深い。—●—: 野生型, —◻—: EAAC1^{+/+}, —▲—: EAAC1^{-/-}, —◆—: GLAST^{+/+}, —▼—: GLAST^{-/-}.

(文献 91 から許可を得て転載, 改変)

ランスが良くなり細胞死が惹起されなくなっている可能性がある。グルタミン酸トランスポーターの異常はてんかんを惹起することから⁹²⁾、ヒトでもてんかんがある患者の視神経において RGC の障害が一過性に起きている可能性もある。実際にヒト NTG 眼で、過剰な組織内グルタミン酸の存在やトランスポーターの異常が確認されていないため、本モデルは NTG モデルとはいえず、眼圧非依存性の RGC 障害モデルといわざるを得ない。しかし、NTG の一部の症例での主因である可能性や、主因とはいえないまでも RGC 障害に伴い二次的にグルタミン酸が増加する病態は存在する可能性があり、今後グルタミン酸濃度調節異常が NTG で証明されることを期待したい。また、我々は軸索輸送障害にも着目し、軸索輸送関連蛋白質を障害することで慢性進行性の視神経障害が惹起されることをマウスで確認している⁹³⁾。多因子性で眼圧非依存性の要因も多いと考えられるヒトの NTG に対するモデルマウスは、ヒト NTG の原因が一つでも判明した際に、同様なモデルを作製し治療法を見出すアプローチ、ある遺伝子異常により正常眼圧 RGC 障害モデルマウスが見出された際に、臨床像と整合性を探るアプローチ、あるいはその両面からのアプローチを進めていくことになる。

3. 神経保護薬開発モデルとしてのマウス

GON は最終的に RGC とその軸索からなる視神経が障害される神経変性疾患であり、神経変性を抑制する神経保護薬の対象疾患とみなすことができる。現在では眼

圧下降治療しか行われていないが、現実には眼圧下降にも抵抗性の進行する GON が存在すること、日本に多い NTG の多くは眼圧下降が有効とはいえ、本態に眼圧がどの程度寄与しているかは不明であることから、将来的には眼圧下降治療に加え、神経保護治療を模索する必要がある。中枢神経を含め神経保護薬はいくつかの薬剤が上市されているが、脳神経に対する神経保護薬の開発は困難を極める。理由としては、脳は複雑な出力系を有し客観的な機能評価が困難であること、また詳細な構造変化の把握が困難であることが考えられる。その点、視機能という 1 出力系である視神経障害である GON は、視野計により再現性よく解析する機能的解析方法と、写真やレーザー検眼鏡による客観的な構造解析方法を確立してきている。したがって、GON は複雑な脳内病変よりも単純な神経障害として評価しやすい疾患であり、GON を対象に神経保護薬開発を推進することは、脳疾患にも応用可能な薬剤の開発に多大な貢献を有すると考えられる。そのためにも GON モデルとしてマウスは、大量のモデル動物を短いライフスパンで評価する対象として適しており、本稿で述べたマウス緑内障モデルを応用することは十分将来性のあることと考える(表 3)。現在我々はレーザー高眼圧モデルを CFP 発現マウスに作製することで、短期間に少ない数の実験動物を用いて神経保護薬の効果をスクリーニングする系を立ち上げ、実際に薬物投与の効果を検証中である。

V 結 語

マウスによる眼圧測定および緑内障モデルの作製と解析は、眼圧の複雑な制御機構を紐解く足掛かりになることはもちろん、高眼圧を呈する機序、ヒトとの比較による高眼圧による RGC 障害の機序、また治療手段の開発に有用なモデルになることが期待される。緑内障の高い疾病率、quality of life の維持への期待を考えれば、研究の対象として眼圧や GON に関する一層の基礎研究の推進が望まれる。本稿にまとめたこの 10 年のマウスモデルを用いた研究の進歩は、必ずや緑内障病態解明と治療につながると信じ、眼疾患動物モデルの礎となることを期待したい。

本総説は第 113 回日本眼科学会総会評議員会指名講演の内容に基づいて執筆いたしました。講演内容の一部は現在投稿中であり、本稿から割愛させていただきましたことをお詫び申し上げます。そして、稿を終えるにあたり、評議員会指名講演の機会を与えていただきました日本眼科学会評議員各位、第 113 回日本眼科学会総会会長澤 充日本大学教授に厚く御礼申し上げます。また、長年に亘りご指導賜り、また発表にあたり座長の労をお執りいただきました新家 眞東京大学教授に心より御礼申し上げます。ご支援賜りました東京大学眼科学教室同窓会の諸先生方、長年ご指導いただきました

表 3 マウス緑内障モデル研究

モデルタイプ	実験目的	内容	文献
Coll1a1 遺伝子改変	組織学的障害解析	軸索障害パターン	50)
Coll1a1 遺伝子改変	高眼圧モデル	眼圧上昇経過	86)
DBA2J	障害評価手段	MRI	54)
DBA2J	障害評価手段	体位変換, 高浸透薬投与による眼圧変化	94)
DBA2J	障害評価手段	網膜電図による評価	52)
DBA2J	障害評価手段	annexin V 染色	95)
DBA2J	障害評価手段	網膜電図による評価	96)
DBA2J	障害評価手段	視力, 学習機能低下	55)
DBA2J	組織学的障害解析	ミクログリア活性	97)
DBA2J	組織学的障害解析	軸索障害が細胞体障害に先行	72)
DBA2J	組織学的障害解析	加齢と高眼圧による細胞障害	98)
DBA2J	組織学的障害解析	グリア細胞の活性化	99)
DBA2J	組織学的障害解析	細胞特異性の検討, 乳頭から網膜へ障害	100)
DBA2J	組織学的障害解析	RGC とアマクリン障害	101)
DBA2J	組織学的障害解析	軸索障害が細胞体障害に先行	73)
DBA2J	組織学的障害解析	眼圧非依存性細胞障害	76)
DBA2J	組織学的障害解析	RGC 障害パターン	102)
DBA2J	組織学的障害解析	乳頭障害が細胞体障害に先行	103)
DBA2J	組織学的障害解析	加齢による RGC 減少	104)
DBA2J	治療手段	骨髄移植とガンマ線照射による障害抑制	105)
DBA2J	治療手段	毛様体光凝固の有用性	106)
DBA2J	治療手段	チモロールメマンチンが効果的	107)
DBA2J	治療手段	GDNF microsphere 注入による神経保護	108)
DBA2J	治療手段	erythropoietin	109)
DBA2J	治療手段	エストロゲン	110)
DBA2J	分子生物学的解析	mGluR 増加	111)
DBA2J	分子生物学的解析	HSP 27 の関与	112)
DBA2J	分子生物学的解析	neogenin の誘導	113)
DBA2J	分子生物学的解析	ceruloplasmin の関与	114)
DBA2J	分子生物学的解析	遺伝子発現	115)
DBA2J	分子生物学的解析	補体の活性化	116)
DBA2J	分子生物学的解析	IL 18 増加, 炎症の関与	75)
DBA2J	モデル作製方法	DBA2J マウスの初報	65)
DBA2J × BAX ^{-/-}	組織学的障害解析	乳頭が先に障害される	74)
DBA2J × NOS 2 ^{-/-}	分子生物学的解析	一酸化窒素産生は無関係	117)
DBA2NNia	組織学的障害解析	RGC 障害の確認	66)
DBA2NNia	組織学的障害解析	篩板がないが細胞は障害される	118)
DBA2NNia	分子生物学的解析	nNOS 陽性アマクリンが緑内障に関与	69)
EAAC 1, GLAST 遺伝子欠損	分子生物学的解析	正常眼圧での細胞死	91)
myocilin transgenic	組織学的障害解析	RGC 障害パターン	83)
上強膜静脈閉塞高眼圧	組織学的障害解析	2 週間～4 週間の	79)
上強膜静脈閉塞高眼圧	分子生物学的解析	カスベース 3 の話	119)
上強膜静脈閉塞高眼圧	分子生物学的解析	ELAM 1 が線維柱帯で増加	120)
上強膜静脈閉塞高眼圧	モデル作製方法	高眼圧モデル	121)
レーザー高眼圧	組織学的障害解析	ミクログリア活性上昇	122)
レーザー高眼圧	モデル作製方法	水晶体から輪部焼灼	77)
レーザー高眼圧	モデル作製方法	水晶体から輪部焼灼	78)
レーザー高眼圧	組織学的障害解析	高眼圧による RGC 障害パターン	49)
レーザー高眼圧	組織学的障害解析	視神経軸索障害パターン解析	47)

小澤哲磨横浜逋信病院名誉院長, 白土城照しらと四谷眼科院長, 清水孝雄東京大学生化学分子生物学細胞情報部門教授兼医学部長に, 厚く御礼申し上げます。本研究にあたり, 小野薬品工業, 参天製薬, わかもと製薬に薬物等ご提供いただき, この場を借りて感謝申し上げます。本研究は, 厚生労働科学研究補助金, 文部科学省科学研究費補助金などにより行

われました。

文 献

- 1) Iwase A, Suzuki Y, Araie M, Yamamoto T, Abe H, Shirato S, et al : The prevalence of primary open-angle glaucoma in Japanese : the Tajimi

- Study. *Ophthalmology* 111 : 1641—1648, 2004.
- 2) **John SW, Hagaman JR, MacTaggart TE, Peng L, Smithes O** : Intraocular pressure in inbred mouse strains. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38 : 249—253, 1997.
 - 3) **Lindsey JD, Weinreb RN** : Identification of the mouse uveoscleral outflow pathway using fluorescent dextran. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43 : 2201—2205, 2002.
 - 4) **Smith RS, Zabaleta A, Savinova OV, John SW** : The mouse anterior chamber angle and trabecular meshwork develop without cell death. *BMC Dev Biol* 1 : 3, 2001.
 - 5) **Tamm ER** : Myocilin and glaucoma : facts and ideas. *Prog Retin Eye Res* 21 : 395—428, 2002.
 - 6) **Aihara M, Lindsey JD, Weinreb RN** : Episcleral venous pressure of mouse eye and effect of body position. *Curr Eye Res* 27 : 355—362, 2003.
 - 7) **Calera MR, Wang Z, Sanchez-Olea R, Paul DL, Civan MM, Goodenough DA** : Depression of intraocular pressure following inactivation of connexin 43 in the nonpigmented epithelium of the ciliary body. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50 : 2185—2193, 2009.
 - 8) **Calera MR, Topley HL, Liao Y, Duling BR, Paul DL, Goodenough DA** : Connexin 43 is required for production of the aqueous humor in the murine eye. *J Cell Sci* 119 : 4510—4519, 2006.
 - 9) **Aihara M, Lindsey JD, Weinreb RN** : Reduction of intraocular pressure in mouse eyes treated with latanoprost. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43 : 146—150, 2002.
 - 10) **Savinova OV, Sugiyama F, Martin JE, Tomarev SI, Paigen BJ, Smith RS, et al** : Intraocular pressure in genetically distinct mice : an update and strain survey. *BMC Genet* 2 : 12, 2001.
 - 11) **Link BA, Gray MP, Smith RS, John SW** : Intraocular pressure in zebrafish : comparison of inbred strains and identification of a reduced melanin mutant with raised IOP. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 : 4415—4422, 2004.
 - 12) **Prashar A, Guggenheim JA, Erichsen JT, Hocking PM, Morgan JE** : Measurement of intraocular pressure (IOP) in chickens using a rebound tonometer : quantitative evaluation of variance due to position inaccuracies. *Exp Eye Res* 85 : 563—571, 2007.
 - 13) **Aihara M, Lindsey JD, Weinreb RN** : Twenty-four-hour pattern of mouse intraocular pressure. *Exp Eye Res* 77 : 681—686, 2003.
 - 14) **Cohan BE, Bohr DF** : Goldmann applanation tonometry in the conscious rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42 : 340—342, 2001.
 - 15) **Cohan BE, Bohr DF** : Measurement of intraocular pressure in awake mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42 : 2560—2562, 2001.
 - 16) **Danias J, Kontiola AI, Filippopoulos T, Mittag T** : Method for the noninvasive measurement of intraocular pressure in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 1138—1141, 2003.
 - 17) **Aihara M, Lindsey JD, Weinreb RN** : Aqueous humor dynamics in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 5168—5173, 2003.
 - 18) **Toris CB, Yablonski ME, Wang YL, Camras CB** : Aqueous humor dynamics in the aging human eye. *Am J Ophthalmol* 127 : 407—412, 1999.
 - 19) **Sugimoto E, Aihara M, Ota T, Araie M** : Effect of light cycle on 24-hour pattern of mouse intraocular pressure. *J Glaucoma* 15 : 505—511, 2006.
 - 20) **Liu JH, Kripke DF, Hoffman RE, Twa MD, Loving RT, Rex KM, et al** : Nocturnal elevation of intraocular pressure in young adults. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39 : 2707—2712, 1998.
 - 21) **Liu JH, Kripke DF, Hoffman RE, Twa MD, Loving RT, Rex KM, et al** : Elevation of human intraocular pressure at night under moderate illumination. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 : 2439—2442, 1999.
 - 22) **Liu JH, Kripke DF, Twa MD, Hoffman RE, Mansberger SL, Rex KM, et al** : Twenty-four-hour pattern of intraocular pressure in the aging population. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 : 2912—2917, 1999.
 - 23) **Liu JH, Lindsey JD, Weinreb RN** : Physiological factors in the circadian rhythm of protein concentration in aqueous humor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39 : 553—558, 1998.
 - 24) **Liu JH, Shieh BE** : Suprachiasmatic nucleus in the neural circuitry for the circadian elevation of intraocular pressure in rabbits. *J Ocul Pharmacol Ther* 11 : 379—388, 1995.
 - 25) **Liu JH, Shieh BE, Alston CS** : Short-wavelength light reduces circadian elevation of intraocular pressure in rabbits. *Neurosci Lett* 180 : 96—100, 1994.
 - 26) **Maeda A, Tsujiya S, Higashide T, Toida K, Todo T, Ueyama T, et al** : Circadian intraocular pressure rhythm is generated by clock genes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47 : 4050—4052, 2006.
 - 27) **Liu JH, Sit AJ, Weinreb RN** : Variation of 24-hour intraocular pressure in healthy individuals : right eye versus left eye. *Ophthalmology* 112 : 1670—1675, 2005.
 - 28) **Friberg TR, Sanborn G, Weinreb RN** : Intraocular and episcleral venous pressure increase during inverted posture. *Am J Ophthalmol* 103 : 523—526, 1987.
 - 29) **Carlson KH, McLaren JW, Topper JE, Brubaker RF** : Effect of body position on intraocular pressure and aqueous flow. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28 : 1346—1352, 1987.
 - 30) **Avila MY, Carré DA, Stone RA, Civan MM** :

- Reliable measurement of mouse intraocular pressure by a servo-null micropipette system. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42 : 1841—1846, 2001.
- 31) **Aihara M, Lindsey JD, Weinreb RN** : Effect on diurnal intraocular pressure variation of eliminating the α -2 adrenergic receptor subtypes in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49 : 929—933, 2008.
 - 32) **Avila MY, Munera A, Guzman A, Do CW, Wang Z, Stone RA**, et al : Noninvasive intraocular pressure measurements in mice by pneumotonometry. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46 : 3274—3280, 2005.
 - 33) **Ota T, Murata H, Sugimoto E, Aihara M, Araie M** : Prostaglandin analogues and mouse intraocular pressure : effects of tafluprost, latanoprost, travoprost, and unoprostone, considering 24-hour variation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46 : 2006—2011, 2005.
 - 34) **Hellberg MR, Sallee VL, McLaughlin MA, Sharif NA, Desantis L, Dean TR**, et al : Preclinical efficacy of travoprost, a potent and selective FP prostaglandin receptor agonist. *J Ocul Pharmacol Ther* 17 : 421—432, 2001.
 - 35) **Takagi Y, Nakajima T, Shimazaki A, Kageyama M, Matsugi T, Matsumura Y**, et al : Pharmacological characteristics of AFP-168 (tafluprost), a new prostanoid FP receptor agonist, as an ocular hypotensive drug. *Exp Eye Res* 78 : 767—776, 2004.
 - 36) **Thieme H, Stumpff F, Ottlecz A, Percicot CL, Lambrou GN, Wiederholt M** : Mechanisms of action of unoprostone on trabecular meshwork contractility. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42 : 3193—3201, 2001.
 - 37) **Woodward DF, Krauss AH, Chen J, Lai RK, Spada CS, Burk RM**, et al : The pharmacology of bimatoprost (Lumigan). *Surv Ophthalmol* 45 : S 337—345, 2001.
 - 38) **Lindsey JD, Kashiwagi K, Kashiwagi F, Weinreb RN** : Prostaglandin action on ciliary smooth muscle extracellular matrix metabolism : implications for uveoscleral outflow. *Surv Ophthalmol* 41 : S 53—59, 1997.
 - 39) **Ota T, Aihara M, Narumiya S, Araie M** : The effects of prostaglandin analogues on IOP in prostanoid FP-receptor-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46 : 4159—4163, 2005.
 - 40) **Ota T, Aihara M, Saeki T, Narumiya S, Araie M** : The IOP-lowering effects and mechanism of action of tafluprost in prostanoid receptor-deficient mice. *Br J Ophthalmol* 91 : 673—676, 2007.
 - 41) **Crowston JG, Lindsey JD, Morris CA, Wheeler L, Medeiros FA, Weinreb RN** : Effect of bimatoprost on intraocular pressure in prostaglandin FP receptor knockout mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46 : 4571—4577, 2005.
 - 42) **Ota T, Aihara M, Saeki T, Narumiya S, Araie M**, et al : The effects of prostaglandin analogues on prostanoid EP 1, EP 2, and EP 3 receptor-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47 : 3395—3399, 2006.
 - 43) **Liang Y, Woodward DF, Guzman VM, Li C, Scott DF, Wang JW**, et al : Identification and pharmacological characterization of the prostaglandin FP receptor and FP receptor variant complexes. *Br J Pharmacol* 154 : 1079—1093, 2008.
 - 44) **Saeki T, Ota T, Aihara M, Araie M** : Effects of prostanoid EP agonists on mouse intraocular pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50 : 2201—2208, 2009.
 - 45) **May CA, Lutjen-Drecoll E** : Morphology of the murine optic nerve. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43 : 2206—2212, 2002.
 - 46) **Fujita Y, Imagawa T, Uehara M** : Comparative study of the lamina cribrosa and the pial septa in the vertebrate optic nerve and their relationship to the myelinated axons. *Tissue Cell* 32 : 293—301, 2000.
 - 47) **Mabuchi F, Aihara M, Mackey MR, Lindsey JD, Weinreb RN** : Regional optic nerve damage in experimental mouse glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 : 4352—4358, 2004.
 - 48) **Nagata A, Higashide T, Ohkubo S, Takeda H, Sugiyama K** : *In vivo* quantitative evaluation of the rat retinal nerve fiber layer with optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50 : 2809—2815, 2009.
 - 49) **Mabuchi F, Aihara M, Mackey MR, Lindsey JD, Weinreb RN** : Optic nerve damage in experimental mouse ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 4321—4330, 2003.
 - 50) **Mabuchi F, Lindsey JD, Aihara M, Mackey MR, Weinreb RN** : Optic nerve damage in mice with a targeted type I collagen mutation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 : 1841—1845, 2004.
 - 51) **Cordeiro MF, Guo L, Luong V, Harding G, Wang W, Jones HE**, et al : Real-time imaging of single nerve cell apoptosis in retinal neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 101 : 13352—13356, 2004.
 - 52) **Porciatti V, Saleh M, Nagaraju M** : The pattern electroretinogram as a tool to monitor progressive retinal ganglion cell dysfunction in the DBA/2J mouse model of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48 : 745—751, 2007.
 - 53) **Leung CK, Lindsey JD, Crowston JG, Ju WK, Liu Q, Bartsch DU**, et al : *In vivo* imaging of murine retinal ganglion cells. *J Neurosci Methods* 168 : 475—478, 2008.
 - 54) **Calkins DJ, Horner PJ, Roberts R, Gadianu M, Berkowitz BA** : Manganese-enhanced MRI of the DBA/2J mouse model of hereditary glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49 : 5083—5088, 2008.
 - 55) **Wong AA, Brown RE** : Age-related changes in

- visual acuity, learning and memory in C57BL/6J and DBA/2J mice. *Neurobiol Aging* 28 : 1577—1593, 2007.
- 56) **Feng G, Mellor RH, Bernstein M, Keller-Peck C, Nguyen QT, Wallace M, et al** : Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron* 28 : 41—51, 2000.
 - 57) **Murata H, Aihara M, Chen YN, Ota T, Numaga J, Araie M** : Imaging mouse retinal ganglion cells and their loss *in vivo* by a fundus camera in the normal and ischemia-reperfusion model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49 : 5546—5552, 2008.
 - 58) **Lam TT, Abler AS, Tso MO** : Apoptosis and caspases after ischemia-reperfusion injury in rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 : 967—975, 1999.
 - 59) **Aihara M, Tomita G** : Optic nerve head and glaucoma. In : Tombran-Tink J, et al(eds), *Mechanisms of the glaucomas*. Humana Press, Totowa, 517—526, 2008.
 - 60) **Quigley HA** : Experimental glaucoma damage mechanism. *Arch Ophthalmol* 101 : 1301—1302, 1983.
 - 61) **Quigley HA, Flower RW, Addicks EM, McLeod DS** : The mechanism of optic nerve damage in experimental acute intraocular pressure elevation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19 : 505—517, 1980.
 - 62) **Quigley HA, Green WR** : The histology of human glaucoma cupping and optic nerve damage : clinicopathologic correlation in 21 eyes. *Ophthalmology* 86 : 1803—1830, 1979.
 - 63) **Burgoyne CF, Downs JC, Bellezza AJ, Suh JK, Hart RT** : The optic nerve head as a biomechanical structure : a new paradigm for understanding the role of IOP-related stress and strain in the pathophysiology of glaucomatous optic nerve head damage. *Prog Retin Eye Res* 24 : 39—73, 2005.
 - 64) **Jonas JB, Fernandez MC** : Shape of the neuroretinal rim and position of the central retinal vessels in glaucoma. *Br J Ophthalmol* 78 : 99—102, 1994.
 - 65) **John SW, Smith RS, Savinova OV, Hawes NL, Chang B, Turnbull D, et al** : Essential iris atrophy, pigment dispersion, and glaucoma in DBA/2J mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39 : 951—962, 1998.
 - 66) **Bayer AU, Neuhardt T, May AC, Martus P, Maag KP, Brodie S, et al** : Retinal morphology and ERG response in the DBA/2NNia mouse model of angle-closure glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42 : 1258—1265, 2001.
 - 67) **Sheldon WG, Warbritton AR, Bucci TJ, Turturro A** : Glaucoma in food-restricted and ad libitum-fed DBA/2NNia mice. *Lab Anim Sci* 45 : 508—518, 1995.
 - 68) **Danias J, Lee KC, Zamora MF, Chen B, Shen F, Filippopoulos T, et al** : Quantitative analysis of retinal ganglion cell (RGC) loss in aging DBA/2NNia glaucomatous mice : comparison with RGC loss in aging C57/BL6 mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 5151—5162, 2003.
 - 69) **May CA, Mittag T** : Neuronal nitric oxide synthase (nNOS) positive retinal amacrine cells are altered in the DBA/2NNia mouse, a murine model for angle-closure glaucoma. *J Glaucoma* 13 : 496—499, 2004.
 - 70) **May CA, Mittag T** : Optic nerve degeneration in the DBA/2NNia mouse : is the lamina cribrosa important in the development of glaucomatous optic neuropathy? *Acta Neuropathol* 111 : 158—167, 2006.
 - 71) **Anderson MG, Smith RS, Hawes NL, Zabaleta A, Chang B, Wiggs JL, et al** : Mutations in genes encoding melanosomal proteins cause pigmentary glaucoma in DBA/2J mice. *Nat Genet* 30 : 81—85, 2002.
 - 72) **Buckingham BP, Inman DM, Lambert W, Oglesby E, Calkins DJ, Steele MR, et al** : Progressive ganglion cell degeneration precedes neuronal loss in a mouse model of glaucoma. *J Neurosci* 28 : 2735—2744, 2008.
 - 73) **Schlamp CL, Li Y, Dietz JA, Janssen KT, Nickells RW** : Progressive ganglion cell loss and optic nerve degeneration in DBA/2J mice is variable and asymmetric. *BMC Neurosci* 7 : 66, 2006.
 - 74) **Howell GR, Libby RT, Jakobs TC, Smith RS, Phalan FC, Barter JW, et al** : Axons of retinal ganglion cells are insulted in the optic nerve early in DBA/2J glaucoma. *J Cell Biol* 179 : 1523—1537, 2007.
 - 75) **Zhou X, Li F, Kong L, Tomita H, Li C, Cao W** : Involvement of inflammation, degradation, and apoptosis in a mouse model of glaucoma. *J Biol Chem* 280 : 31240—31248, 2005.
 - 76) **Scholz M, Buder T, Seeber S, Adamek E, Becker CM, Lütjen-Drecoll E** : Dependency of intraocular pressure elevation and glaucomatous changes in DBA/2J and DBA/2J-Rj mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49 : 613—621, 2008.
 - 77) **Aihara M, Lindsey JD, Weinreb RN** : Experimental mouse ocular hypertension : establishment of the model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 4314—4320, 2003.
 - 78) **Grozdanic SD, Betts DM, Sakaguchi DS, Allbaugh RA, Kwon YH, Kardon RH** : Laser-induced mouse model of chronic ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 4337—4346, 2003.
 - 79) **Ruiz-Ederra J, Verkman AS** : Mouse model of sustained elevation in intraocular pressure produced by episcleral vein occlusion. *Exp Eye Res* 82 : 879—884, 2006.
 - 80) **Fingert JH, Clark AF, Craig JE, Alward WL, Snibson GR, McLaughlin M, et al** : Evaluation of

- the myocilin (MYOC) glaucoma gene in monkey and human steroid-induced ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42 : 145—152, 2001.
- 81) **Tomarev SI, Tamm ER, Chang B** : Characterization of the mouse *Myoc/Tigr* gene. *Biochem Biophys Res Commun* 245 : 887—893, 1998.
 - 82) **Senatorov V, Malyukova I, Fariss R, Wawrousek EF, Swaminathan S, Sharan SK, et al** : Expression of mutated mouse myocilin induces open-angle glaucoma in transgenic mice. *J Neurosci* 26 : 11903—11914, 2006.
 - 83) **Zhou Y, Grinchuk O, Tomarev SI** : Transgenic mice expressing the Tyr437His mutant of human myocilin protein develop glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49 : 1932—1939, 2008.
 - 84) **Shepard AR, Jacobson N, Millar JC, Pang IH, Steely HT, Searby CC, et al** : Glaucoma-causing myocilin mutants require the Peroxisomal targeting signal-1 receptor (PTS1R) to elevate intraocular pressure. *Hum Mol Genet* 16 : 609—617, 2007.
 - 85) **Ishibashi K, Yamamoto H, Hatano M, Koizumi T, Yamamoto M, Tokuhisa T** : Enlargement of the globe with ocular malformations in c-Myc transgenic mice. *Jpn J Ophthalmol* 43 : 201—208, 1999.
 - 86) **Aihara M, Lindsey JD, Weinreb RN** : Ocular hypertension in mice with a targeted type I collagen mutation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 1581—1585, 2003.
 - 87) **Holmberg J, Liu CY, Hjalt TA** : PITX 2 gain-of-function in Rieger syndrome eye model. *Am J Pathol* 165 : 1633—1641, 2004.
 - 88) **Evans AL, Gage PJ** : Expression of the homeobox gene *Pitx 2* in neural crest is required for optic stalk and ocular anterior segment development. *Hum Mol Genet* 14 : 3347—3359, 2005.
 - 89) **Asai-Coakwell M, Backhouse C, Casey RJ, Gage PJ, Lehmann OJ** : Reduced human and murine corneal thickness in an Axenfeld-Rieger syndrome subtype. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47 : 4905—4909, 2006.
 - 90) **Ittner LM, Schwerdtfeger K, Kunz TH, Muff R, Husmann K, Grimm C, et al** : Transgenic mice with ocular overexpression of an adrenomedullin receptor reflect human acute angle-closure glaucoma. *Clin Sci (Lond)* 114 : 49—58, 2008.
 - 91) **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* 117 : 1763—1770, 2007.
 - 92) **Meldrum BS, Akbar MT, Chapman AG** : Glutamate receptors and transporters in genetic and acquired models of epilepsy. *Epilepsy Res* 36 : 189—204, 1999.
 - 93) **Terada S, Kinjo M, Aihara M, Takei Y, Hirokawa N** : Kinesin-1/Hsc70 dependent mechanism of slow axonal transport and its relation to fast axonal transport. *EMBO J* 2010(in press).
 - 94) **Nagaraju M, Saleh M, Porciatti V** : IOP-dependent retinal ganglion cell dysfunction in glaucomatous DBA/2J mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48 : 4573—4579, 2007.
 - 95) **Reichstein D, Ren L, Filippopoulos T, Mittag T, Danias J** : Apoptotic retinal ganglion cell death in the DBA/2 mouse model of glaucoma. *Exp Eye Res* 84 : 13—21, 2007.
 - 96) **Saleh M, Nagaraju M, Porciatti V** : Longitudinal evaluation of retinal ganglion cell function and IOP in the DBA/2J mouse model of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48 : 4564—4572, 2007.
 - 97) **Bosco A, Inman DM, Steele MR, Wu G, Soto I, Marsh-Armstrong N, et al** : Reduced retina microglial activation and improved optic nerve integrity with minocycline treatment in the DBA/2 J mouse model of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49 : 1437—1446, 2008.
 - 98) **Inman DM, Sappington RM, Horner PJ, Calkins DJ** : Quantitative correlation of optic nerve pathology with ocular pressure and corneal thickness in the DBA/2 mouse model of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47 : 986—996, 2006.
 - 99) **Inman DM, Horner PJ** : Reactive nonproliferative gliosis predominates in a chronic mouse model of glaucoma. *Glia* 55 : 942—953, 2007.
 - 100) **Jakobs TC, Libby RT, Ben Y, John SW, Masland RH** : Retinal ganglion cell degeneration is topological but not cell type specific in DBA/2J mice. *J Cell Biol* 171 : 313—325, 2005.
 - 101) **Moon JI, Kim IB, Gwon JS, Park MH, Kang TH, Lim EJ, et al** : Changes in retinal neuronal populations in the DBA/2J mouse. *Cell Tissue Res* 320 : 51—59, 2005.
 - 102) **Schuettauf F, Rejdak R, Walski M, Frontczak-Baniewicz M, Voelker M, Blatsios G, et al** : Retinal neurodegeneration in the DBA/2J mouse-a model for ocular hypertension. *Acta Neuropathol (Berl)* 107 : 352—358, 2004.
 - 103) **Soto I, Oglesby E, Buckingham BP, Son JL, Roberson ED, Steele MR, et al** : Retinal ganglion cells downregulate gene expression and lose their axons within the optic nerve head in a mouse glaucoma model. *J Neurosci* 28 : 548—561, 2008.
 - 104) **Zhang X, Zhang M, Avila MY, Ge J, Laties AM** : Time course of age-dependent changes in intraocular pressure and retinal ganglion cell death in DBA/2J mouse. *Yan Ke Xue Bao* 22 : 184—189, 194, 2006.
 - 105) **Anderson MG, Libby RT, Gould DB, Smith RS, John SW** : High-dose radiation with bone marrow transfer prevents neurodegeneration in an inherited glaucoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 102 : 4566—4571, 2005.
 - 106) **Matsubara A, Nakazawa T, Husain D, Iliaki E,**

- Connolly E, Michaud NA, et al** : Investigating the effect of ciliary body photodynamic therapy in a glaucoma mouse model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47 : 2498—2507, 2006.
- 107) **Schuettauf F, Quinto K, Naskar R, Zurakowski D** : Effects of anti-glaucoma medications on ganglion cell survival : the DBA/2J mouse model. *Vision Res* 42 : 2333—2337, 2002.
- 108) **Ward MS, Khoobehi A, Lavik EB, Langer R, Young MJ** : Neuroprotection of retinal ganglion cells in DBA/2J mice with GDNF-loaded biodegradable microspheres. *J Pharm Sci* 96 : 558—568, 2007.
- 109) **Zhong L, Bradley J, Schubert W, Ahmed E, Adamis AP, Shima DT, et al** : Erythropoietin promotes survival of retinal ganglion cells in DBA/2J glaucoma mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48 : 1212—1218, 2007.
- 110) **Zhou X, Li F, Ge J, Sarkisian SR Jr, Tomita H, Zaharia A, et al** : Retinal ganglion cell protection by 17- β -estradiol in a mouse model of inherited glaucoma. *Dev Neurobiol* 67 : 603—616, 2007.
- 111) **Dyka FM, May CA, Enz R** : Metabotropic glutamate receptors are differentially regulated under elevated intraocular pressure. *J Neurochem* 90 : 190—202, 2004.
- 112) **Huang W, Fileta JB, Filippopoulos T, Ray A, Dobberfuhr A, Grosskreutz CL** : Hsp 27 phosphorylation in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48 : 4129—4135, 2007.
- 113) **Schnichels S, Conrad S, Warstat K, Henke-Fahle S, Skutella T, Schraermeyer U, et al** : Gene expression of the repulsive guidance molecules/neogenin in the developing and mature mouse visual system : C57BL/6J vs. the glaucoma model DBA/2J. *Gene Expr Patterns* 8 : 1—11, 2007.
- 114) **Stasi K, Nagel D, Yang X, Ren L, Mittag T, Danias J** : Ceruloplasmin upregulation in retina of murine and human glaucomatous eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48 : 727—732, 2007.
- 115) **Steele MR, Inman DM, Calkins DJ, Horner PJ, Vetter ML** : Microarray analysis of retinal gene expression in the DBA/2J model of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47 : 977—985, 2006.
- 116) **Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE, Howell GR, Christopherson KS, Nouri N, et al** : The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell* 131 : 1164—1178, 2007.
- 117) **Libby RT, Howell GR, Pang IH, Savinova OV, Mehalow AK, Barter JW, et al** : Inducible nitric oxide synthase, Nos 2, does not mediate optic neuropathy and retinopathy in the DBA/2J glaucoma model. *BMC Neurosci* 8 : 108, 2007.
- 118) **May CA, Mittag T** : Vascular changes in the posterior eye segment of secondary angle-closure glaucoma : cause or consequence? *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 244 : 1505—1511, 2006.
- 119) **Ji J, Chang P, Pennesi ME, Yang Z, Zhang J, Li D, et al** : Effects of elevated intraocular pressure on mouse retinal ganglion cells. *Vision Res* 45 : 169—179, 2005.
- 120) **Suarez T, Vecino E** : Expression of endothelial leukocyte adhesion molecule 1 in the aqueous outflow pathway of porcine eyes with induced glaucoma. *Mol Vis* 12 : 1467—1472, 2006.
- 121) **Gross RL, Ji J, Chang P, Pennesi ME, Yang Z, Zhang J, et al** : A mouse model of elevated intraocular pressure : retina and optic nerve findings. *Trans Am Ophthalmol Soc* 101 : 163—169 ; discussion 169—171, 2003.
- 122) **Nakazawa T, Nakazawa C, Matsubara A, Noda K, Hisatomi T, She H, et al** : Tumor necrosis factor- α mediates oligodendrocyte death and delayed retinal ganglion cell loss in a mouse model of glaucoma. *J Neurosci* 26 : 12633—12641, 2006.

Comment : 北澤 克明

東京大学相原 一講師の評議員会指名講演は“緑内障研究へのマウスの応用—眼圧および網膜神経節細胞障害機序の解明を目指して—”であった。緑内障は特に我が国の成人で有病率が高く視覚障害の原因の第 1 位を占め、その本体である緑内障性視神経症(GON)の病態解明と治療法の開発は現在の眼科臨床の一大課題の一つといっても過言ではない。本講演ではマウスを用いた眼圧制御機序ならびに GON の病態の解明のうえで演者とその研究グループの挙げた成果について述べた。

内容は多岐にわたるが、ヒト眼圧制御機構の解明に向けたマウスの応用とマウスモデルを用いた網膜神経節細胞(RGC)障害機序の解明とその臨床へのフィードバックの二点に集約される。主な研究成果を記す。

1. マウスの隅角、房水産生、流出系はヒトと類似し、ヒトと同様な眼圧制御機構が存在する可能性が高い。
2. マウスの房水流出への線維柱帯路の寄与は 16%、ぶどう膜強膜路のそれは 84% で、ヒトに比して後者の関与が高く、主としてこの経路に作用するプロスタグランジン(PG)関連薬の評価に有用である。
3. FP あるいは EP 受容体欠損マウスの実験により、臨床使用されている 5 種類の PG 関連薬の眼圧下降には FP 受容体刺激が必要条件であるが、その下流シグナルには EP 3 受容体が関与している。
4. マウス眼圧には日内変動があり、日中低く夜間高い二相性パターンを示す。日内変動は網膜レベルの光受容体と連動した時計遺伝子の活動により制御されている。
5. RGC 特異的に蛍光を発現する遺伝子改変マウス〔cyan fluorescent protein(CFP)マウス〕を用いて RGC 障害の眼底カメラによる経時的観察法を評価し、CFP マウス RGC は安定した CFP を発現し、その減少を経時的に細胞単位でとらえることが可能である。
6. CFP マウスの虚血再灌流、視神経挫滅、高眼圧モデルでの実験により、RGC 細胞死を評価するうえで、CFP を指標にすることにより DiI を用いる逆行性染色に比して、より高精度の細胞数評価と機能低下の検出が可能である。
7. グルタミン酸トランスポーター欠損(GLAST KO)マウスは正常眼圧下で RGC が障害される眼圧非依存性の RGC 障害モデルである。
8. CFP 発現マウスを用いた高眼圧モデルは神経保護薬の効果をスクリーニングする系として利用できる可能性がある。

本報告は、著者の現時点での研究成果の集大成というべきであろう。マウスを用いることにより、ヒト眼圧日内変動の成因、眼圧制御メカニズム、緑内障治療の柱である PG 製剤の作用機序を理解するうえで新たな光が投げられた。また、遺伝子改変マウスを用い RGC 障害のより厳密な評価が可能となった意義はきわめて大きい。しかしながら、著者も述べているように現在のマウス緑内障モデルのヒト緑内障との相同性は限られており、残された課題も大きい。著者の今後の研究の進展を期待したい。