

(論文内容の要旨)

網膜神経節細胞 (RGC) は網膜から視神経を経て外側膝状体および上丘へと視覚情報を伝達する重要な細胞群である。RGCの細胞死は緑内障をはじめとする網膜変性疾患における視覚障害の主因となる。グルタミン酸は中枢神経系および網膜における主要な興奮性神経伝達物質であるが、緑内障や網膜虚血などの病的条件下において、グルタミン酸神経系の制御異常による興奮毒性が病態形成に関与することが示唆されている。したがって、RGCにおける興奮毒性の特徴を明らかにすることは、神経保護に重点を置いた網膜疾患治療法の確立に有用であると考えられる。本研究において著者は、興奮毒性によるRGC障害におけるグリシンおよびD-セリンによる調節機構、およびRGCにおける興奮毒性のイオン依存性を中心とした発現機序に関する検討を行い、以下の新知見を得た。

第一章 内在性グリシン結合部位アゴニストによる NMDA 誘発網膜障害の制御

興奮性神経毒性の発現に重要なNMDA型グルタミン酸受容体は、その活性化にグリシン結合部位の刺激が必要である。そこで、in vivoでのNMDA硝子体内投与により誘発されるRGCの脱落におけるグリシン結合部位アゴニストの役割について検討した。NMDAにより誘発される成体ラット網膜のRGC数の減少および網膜内層の組織障害は、グリシン結合部位遮断薬である5,7-dichlorokynurenic acidの同時投与によりほぼ完全に抑制された。NMDAにより誘発されるRGC数の減少は、グリシン結合部位アゴニストであるグリシンやD-セリンの同時投与、あるいはグリシントランスポータ阻害薬であるsarcosineの前投与により増悪する一方、D-セリン分解酵素であるD-amino acid oxidaseの前投与により部分的に抑制された。以上の結果より、興奮毒性による網膜障害はグリシンおよびD-セリンの両者のレベルに依存することが示唆された。さらに、内在性のD-セリンが網膜におけるNMDA毒性の発現に寄与することが示された。

第二章 細胞外 Cl⁻に依存した急性興奮毒性による網膜神経節細胞死

RGCにおける興奮毒性の機序については、適切なin vitro実験系が存在しないため不明な点が多く、興奮毒性がRGCの細胞死に直接関与するか否かについて懐疑的な報告さえある。そこで、成体ラット網膜組織を用いた新たな細胞死評価系を確立し、急性興奮毒性によるRGC死の機序を解析した。摘出網膜組織標本へのNMDAあるいはnon-NMDA型グルタミン酸受容体アゴニストであるカイニン酸の適用は、有意なRGCの死細胞数の増加を引き起こした。NMDAとカイニン酸により誘発されるRGC死は、NMDA受容体遮断薬であるMK-801とnon-NMDA受容体遮断薬である1,2,3,4-tetrahydro-6-nitro-2,3-dioxobenzof[f]quinoxaline-7-sulfonamide (NBQX) により、それぞれほぼ完全に抑制された。NMDAとカイニン酸により誘

発される RGC 死は細胞外 Na^+ を置換すると部分的に抑制され、細胞外 Cl^- を置換すると顕著に抑制された。グリシン受容体遮断薬であるストリキニーネは NMDA により誘発される RGC 死を部分的に抑制した。さらに、 Cl^- チャネル遮断薬である niflumic acid によって、NMDA とカイニン酸により誘発される RGC 死は有意に抑制された。以上の結果より、興奮毒性によって急性に誘発される RGC 死には細胞外 Ca^{2+} の関与は少なく、むしろ細胞外 Cl^- が重要な役割を担っていること、および niflumic acid 感受性 Cl^- チャネルを介した Cl^- 流入が RGC 死の誘導に寄与することが示された。

第三章 網膜神経節細胞における遅延性興奮毒性媒介因子としての p53 の発現機序

遅延性に誘導される RGC のアポトーシス様細胞死が、慢性網膜変性疾患における視機能障害に寄与することが示唆されている。そこで、アポトーシス誘導時に動員されることが示されている p53 に着目し、興奮毒性に伴って RGC に誘導されるアポトーシス性細胞死を評価するための新たな *in vitro* 実験系を確立した。カイニン酸の適用は有意な p53 陽性 RGC 数の増加を引き起こし、その増加は NBQX によりほぼ完全に抑制された。カイニン酸により誘発される p53 陽性 RGC 数の増加は、カルパイン阻害薬である MDL 28170 を適用することによって顕著に抑制された。以上の結果より、興奮毒性によって遅延性に誘発される RGC 死は p53 発現増加を伴い、その機序として細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇により引き起こされるカルパインの活性化が関与することが示唆された。

以上、著者は、NMDA により誘発される RGC の障害に内在性の D-セリンが関与することを明らかにし、興奮毒性による RGC 死の誘導機序として、急性興奮毒性による RGC 死が細胞外の Ca^{2+} よりむしろ Cl^- に強く依存するのに対して、遅延性のアポトーシス性 RGC 死が Ca^{2+} 依存性プロテアーゼであるカルパインに依存していることを明らかにした。本研究の成果は、RGC における興奮毒性の発現機序およびその調節機構の一端を明らかにしたものであり、網膜変性疾患に対する神経保護に重点を置いた治療薬を開発する上で重要な基礎的資料を提供するものである。

(論文審査の結果の要旨)

網膜神経節細胞 (RGC) は網膜から視神経を経て外側膝状体および上丘へと視覚情報を伝達する重要な細胞群である。RGC の細胞死は緑内障をはじめとする網膜変性疾患における視覚障害の主因となる。グルタミン酸は中枢神経系および網膜における主要な興奮性神経伝達物質であるが、緑内障や網膜虚血などの病的条件下において、グルタミン酸神経系の制御異常による興奮毒性が病態形成に関与することが示唆されている。したがって、RGC における興奮毒性の特徴を明らかにすることは、神経保護に重点を置いた網膜疾患治療法の確立に有用であると考えられる。本研究において申請者は、興奮毒性による RGC 障害におけるグリシンおよび D-セリンによる調節機構、および RGC における興奮毒性のイオン依存性を中心とした発現機序に関する検討を行い、以下の新知見を得た。

第一章 内在性グリシン結合部位アゴニストによる NMDA 誘発網膜障害の制御

興奮性神経毒性の発現に重要な NMDA 型グルタミン酸受容体は、その活性化にグリシン結合部位の刺激が必要である。そこで、in vivo での NMDA 硝子体内投与により誘発される RGC の脱落におけるグリシン結合部位アゴニストの役割について検討した。NMDA により誘発される成体ラット網膜の RGC 数の減少および網膜内層の組織障害は、グリシン結合部位遮断薬である 5,7-dichlorokynurenic acid の同時投与によりほぼ完全に抑制された。NMDA により誘発される RGC 数の減少は、グリシン結合部位アゴニストであるグリシンや D-セリンの同時投与、あるいはグリシントランスポータ阻害薬である sarcosine の前投与により増悪する一方、D-セリン分解酵素である D-amino acid oxidase の前投与により部分的に抑制された。以上の結果より、興奮毒性による網膜障害はグリシンおよび D-セリンの両者のレベルに依存することが示唆された。さらに、内在性の D-セリンが網膜における NMDA 毒性の発現に寄与することが示された。

第二章 細胞外 Cl⁻に依存した急性興奮毒性による網膜神経節細胞死

成体ラット網膜組織を用いた新たな細胞死評価系を確立し、急性興奮毒性による RGC 死の機序を解析した。摘出網膜組織標本への NMDA あるいは non-NMDA 型グルタミン酸受容体アゴニストであるカイニン酸の適用は、有意な RGC の死細胞数の増加を引き起こした。NMDA とカイニン酸により誘発される RGC 死は、NMDA 受容体遮断薬である MK-801 と non-NMDA 受容体遮断薬により、それぞれほぼ完全に抑制された。NMDA とカイニン酸により誘発される RGC 死は細胞外 Na⁺を置換すると部分的に抑制され、細胞外 Cl⁻を置換すると顕著に抑制された。グリシン受容体

遮断薬は NMDA により誘発される RGC 死を部分的に抑制した。さらに、Cl⁻チャネル遮断薬である niflumic acid によって、NMDA とカイニン酸により誘発される RGC 死は有意に抑制された。以上の結果より、興奮毒性によって急性に誘発される RGC 死には細胞外 Ca²⁺の関与は少なく、むしろ細胞外 Cl⁻が重要な役割を担っていること、および niflumic acid 感受性 Cl⁻チャネルを介した Cl⁻流入が RGC 死の誘導に寄与することが示された。

第三章 網膜神経節細胞における遅延性興奮毒性媒介因子としての p53 の発現機序

遅延性に誘導される RGC のアポトーシス様細胞死が、慢性網膜変性疾患における視機能障害に寄与することが示唆されている。そこで、アポトーシス誘導時に動員されることが示されている p53 に着目し、興奮毒性に伴って RGC に誘導されるアポトーシス性細胞死を評価するための新たな *in vitro* 実験系を確立した。カイニン酸の適用は有意な p53 陽性 RGC 数の増加を引き起こし、その増加は NBQX によりほぼ完全に抑制された。カイニン酸により誘発される p53 陽性 RGC 数の増加は、カルパイン阻害薬である MDL 28170 を適用することによって顕著に抑制された。以上の結果より、興奮毒性によって遅延性に誘発される RGC 死は p53 発現増加を伴い、その機序として細胞内 Ca²⁺濃度の上昇により引き起こされるカルパインの活性化が関与することが示唆された。

以上、申請者は、NMDA により誘発される RGC の障害に内在性の D-セリンが関与することを明らかにし、興奮毒性による RGC 死の誘導機序として、急性興奮毒性による RGC 死が細胞外の Ca²⁺よりはむしろ Cl⁻に強く依存するのに対して、遅延性的アポトーシス性 RGC 死が Ca²⁺依存性プロテアーゼであるカルパインに依存していることを明らかにした。本研究の成果は、RGC における興奮毒性の発現機序およびその調節機構の一端を明らかにしたものであり、網膜変性疾患に対する神経保護に重点を置いた治療薬を開発する上で重要な基礎的資料を提供するものである。

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成 21 年 2 月 23 日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。