

氏名	いけ だ かず ひと 池 田 和 仁
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	論 薬 博 第 721 号
学位授与の日付	平 成 17 年 1 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	脳由来神経栄養因子および毛様体神経栄養因子の網膜保護作用に関する薬理学的研究
論文調査委員	(主 査) 教 授 赤 池 昭 紀 教 授 伊 藤 信 行 教 授 金 子 周 司

論 文 内 容 の 要 旨

脳由来神経栄養因子 brain-derived neurotrophic factor (BDNF) および毛様体神経栄養因子 ciliary neurotrophic factor (CNTF) は、中枢神経系の様々なニューロンの生存・分化を制御することが示唆されてきた。網膜は系統発生的に中枢神経系に属しており、種々の神経栄養因子、サイトカイン類の発現が報告されている。これらの栄養因子・サイトカインの中でも BDNF と CNTF が網膜で高い発現を示すことが知られているが、機能の詳細については未だに不明の点が多い。そこで本研究では、BDNF および CNTF の網膜障害に対する保護作用を明らかにする目的で、光障害、KCN 障害および初代網膜培養細胞の生存に対する作用を解析し、以下の新知見を得た。

第一章 光照射障害に対する BDNF および CNTF の保護作用

色素上皮系の障害である網膜色素変性症や老人性黄斑変性症における危険因子の一つとして、光による網膜障害が指摘されている。そこで、白色ラットに48時間以上連続的に強い光照射(2000ルクス)することにより誘発される網膜障害を網膜電図により解析したところ、視細胞機能を示す a 波と内顆粒層細胞機能を示す b 波の振幅がともに減少した。光照射48時間前に BDNF あるいは CNTF を硝子体内に単回投与することにより、光照射誘発障害は異なる様式により抑制された。すなわち、BDNF では、b 波振幅の減少が改善されたが、a 波振幅の減少には影響を与えなかった。また、強い光照射環境から通常の光環境(<50ルクス)に戻した時に生じる b 波振幅の部分的な回復も、BDNF の硝子体内投与により促進された。一方、CNTF では、連続的光照射により誘発される a 波および b 波の振幅の減少がともに改善された。CNTF による網膜保護作用は、phosphoinositide-3 kinase (PI3 キナーゼ) 阻害薬である LY294002 の硝子体内投与によって抑制された。以上の結果より、連続的光照射により誘発される網膜障害に対して BDNF は主として内顆粒層細胞を保護すること、一方、CNTF は視細胞および内顆粒層細胞の両者を保護し、その作用には PI3 キナーゼ系が関与することが明らかになった。

第二章 KCN 誘発網膜障害に対する BDNF の保護作用

BDNF が光照射障害モデルにおいて網膜内層に対する保護作用を発現したことから、網膜内層に選択的な障害を惹起する虚血性網膜障害モデルの一つである KCN 障害に対する作用を検討した。成熟ラットの摘出眼球を 37°C のクレブス・リンゲル液中に 1~3 時間静置することにより網膜を組織学的に正常な状態で維持することができることを見出し、摘出眼球を用いた網膜障害評価の実験方法を確立した。クレブスリンゲル液への KCN 添加により内顆粒層に特異的に細胞膨潤および細胞脱落が生じ、このような KCN 誘発網膜障害はインキュベート液中の Ca^{2+} を除去することにより抑制された。次いで、AMPA/kinate 受容体遮断薬 1,2,3,4-tetrahydro-6-nitro-2,3-dioxo-benzo[f]quinoxaline-7-sulfonamide (NBQX) および NMDA 受容体遮断薬 MK-801 の作用を検討したところ、NBQX が KCN 誘発網膜障害を抑制したのに対して、MK-801 は影響を及ぼさなかった。BDNF を *in vivo* において硝子体内投与し、投与 2 日目に眼球を摘出し、30分間の KCN 処置を行うと、BDNF は濃度依存性に KCN 誘発網膜障害を抑制した。さらに、BDNF は KCN により誘発される硝子体内グルタミン酸量の上昇を抑制した。網膜に特異的に発現するカルシウム結合タンパクである calretinin に注目して免疫組織化学的検討を行ったところ、BDNF は内顆粒層細胞における calretinin 陽性細胞数を増加した。以上の結果より、摘出眼の

KCN 処置において、グルタミン酸遊離に伴う AMPA/kinate 受容体の過剰刺激により Ca^{2+} の過剰流入が生じ、網膜内顆粒層細胞の障害が生じることが示唆された。BDNF は細胞内 Ca^{2+} 制御機構を亢進することにより網膜内層の保護作用を発現すると推定される。

第三章 CNTF の培養網膜細胞生存促進作用

視細胞は網膜における光受容細胞として重要な役割を果たしており、老人性黄斑変性症などの多くの網膜疾患で障害を受けるが、その変性を阻止する薬物は見出されていない。CNTF の視細胞に対する保護作用を解析する目的で、初代網膜培養細胞における CNTF の細胞生存維持作用及びシグナル伝達経路の解析を行った。生後 7 日目の新生仔ラットから摘出・単離した網膜細胞を培養することにより、約 50% がロドプシン陽性細胞により構成される視細胞を主とした初代培養系を確立することができた。このような培養網膜細胞は、培養中に生存率が漸減し、初期の 3 日間でアポトーシス様の細胞死により生存率が低下した。視細胞を主とした培養網膜細胞の生存率の低下は、播種時から CNTF を投与することにより著明に抑制された。CNTF の網膜細胞生存促進作用は、PI3 キナーゼ阻害薬 LY294002 および mitogen-activated protein kinase (MAPKK) 阻害薬 PD98059 により抑制された。以上の結果より、CNTF は視細胞のアポトーシスを抑制することにより網膜外層の生存を促進し、その作用には PI3 キナーゼシグナル経路が関与することが示唆された。

以上、著者は、網膜における主要な神経成長因子、サイトカインである BDNF、CNTF の作用を検討し、BDNF は細胞内 Ca^{2+} 制御系の機能を亢進することによりアマクリン細胞などの内顆粒細胞群の生存を促進するのに対して、CNTF は PI3K シグナル経路を介して視細胞の生存を促進することを示した。本研究の成果は、網膜における神経栄養因子、サイトカインの作用機構の解明に有用な知見となるとともに、網膜色素変性症、老人性黄斑変性症などの網膜疾患の予防・治療において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

脳由来神経栄養因子 brain-derived neurotrophic factor (BDNF) および毛様体由来神経栄養因子 ciliary neurotrophic factor (CNTF) は、中枢神経系の様々なニューロンの生存・分化を制御する。網膜は系統発生的に中枢神経系に属しており、BDNF、CNTF を含む種々の神経栄養因子の発現が確認されているが、その機能の詳細については不明の点が多い。そこで、網膜障害に対する BDNF および CNTF の作用を明らかにする目的で、*in vivo* および *in vitro* の光障害、虚血性障害モデルにおける BDNF および CNTF の作用に関する研究を行った。

第一章 光照射障害に対する BDNF および CNTF の保護作用

色素上皮系の障害である網膜色素変性症や老人性黄斑変性症における危険因子の一つとして、光による網膜障害が指摘されている。そこで、白色ラットに 48 時間以上連続的に強い光照射することにより誘発される網膜障害を網膜電図により検討したところ、視細胞機能を示す a 波と内顆粒層細胞の機能を示す b 波の振幅がともに減少することが明らかになった。このような光照射誘発障害は、光照射前に BDNF、CNTF を硝子体内に単回投与することにより抑制された。BDNF では、b 波の振幅値の減少は改善され、a 波振幅値の減少へは影響を与えなかった。また、強い光照射環境から、通常の光環境で飼育した時、自然に b 波振幅値が部分的に回復するが、BDNF の硝子体内投与により、この機能回復を促進した。一方、CNTF では、a 波および b 波の減少がともに改善された。CNTF による網膜保護作用は、phosphoinositide-3 kinase (PI3 キナーゼ) 阻害薬の硝子体内投与により抑制された。以上の結果より、光連続照射障害に対し、BDNF は主として内顆粒層細胞を保護するのに対し、CNTF は視細胞および内顆粒層細胞の両者を保護し、その作用には PI3 キナーゼ系が関与することが明らかになった。

第二章 KCN 誘発網膜障害に対する BDNF の細胞保護作用

虚血性網膜障害に対する BDNF の作用を解析する目的で、ラット摘出眼球を用いて、KCN 誘発障害を検討した。成熟ラットの摘出眼球を、眼球状態のまま、37°C、クレブスリンゲル液中に 1~3 時間静置することにより、組織学的に正常な状態で維持され、KCN 添加により内顆粒層細胞の細胞群に特異的な膨潤あるいは細胞脱落が生じた。KCN 誘発障害は Ca^{2+} キレーターおよび AMPA 受容体遮断薬により抑制されることなどの知見により、摘出眼球の KCN 障害における内顆粒層細胞群の脱落には AMPA/kinate 受容体を介した Ca^{2+} 障害が関与すると結論された。次いで、BDNF の KCN

誘発障害に対する作用を検討した結果、事前に *in vivo* において BDNF を硝子体内投与することにより、KCN 誘発障害が著明に抑制されることが明らかになった。KCN 誘発障害には Ca^{2+} が重要な役割を果たすことから網膜に特異的に発現する Ca^{2+} 結合タンパク質である calretinin に注目して BDNF の作用機序の解析を行い、BDNF は細胞内 Ca^{2+} 量の制御機構を賦活化することにより KCN 処置により過剰遊離されたグルタミン酸による細胞毒性に対する保護作用を発現することを明らかにした。

第三章 CNTF の網膜培養細胞に対する保護作用

CNTF の視細胞に対する保護作用を解析する目的で、初代網膜培養細胞における CNTF の細胞生存維持作用及びシグナル伝達経路の解析を行った。生後 7 日目の新生児ラットから調整した網膜初代培養は、約 50% ロドプシン陽性細胞であり、培養 3 日間にアポトーシス様の細胞死を引き起こした。播種時より CNTF を添加することにより視細胞系のアポトーシスが抑制された。CNTF の生存維持作用に関わるシグナル伝達経路に関する薬理学的解析を行った結果、CNTF は PI3 キナーゼシグナル経路を介して視細胞の生存を維持することが示された。

以上の研究は、網膜において、BDNF は細胞内 Ca^{2+} 制御系の機能を亢進することによりアマクリン細胞などの内顆粒細胞群の生存を促進するのに対して、CNTF は PI3 キナーゼシグナル経路を介して視細胞の生存を促進することを明らかにした。本研究成果は、網膜における神経栄養因子の作用機構の有用な知見となるとともに、網膜色素変性症、老人性黄斑変性症などの網膜疾患の予防・治療において、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）の論文として価値あるものとして認める。

更に、平成 16 年 11 月 22 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。