TITLE:

Divergent NMDA signals leading to
proapoptotic and antiapoptotic pathways in
the rat retina(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Manabe, Shinichi

CITATION:

Manabe, Shinichi. Divergent NMDA signals leading to proapoptotic and antiapoptotic pathways in the rat retina. 京都大学, 2003, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2003-03-24

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/148688>

RIGHT:

氏 名	ま 真 鍋 しん 伸 いち 一
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2565 号
学位授与の日付	平 成 15 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 外 科 系 専 攻
学位論文題目	Divergent NMDA Signals Leading to Proapoptotic and Antiapoptotic Pathways in the Rat Retina (ラット網膜における NMDA 誘発アポトーシス及び抗アポトーシス細胞内情報伝達経路の活性化)
論文調査委員	(主 査) 教 授 中 西 重 忠 教 授 影 山 龍 一 郎 教 授 本 田 孔 士

論 文 内 容 の 要 旨

グルタミン酸は網膜興奮性神経伝達物質であるが、過剰遊離により網膜内層神経細胞に毒性を示す。実際に、緑内障、虚血性疾患、視神経症などの眼疾患においてグルタミン酸毒性が関与しているとの報告がある。グルタミン酸レセプターの中でも NMDA レセプターが主として細胞死に関与することが知られている。反対に、NMDA レセプターのアゴニスト NMDA は細胞種によっては神経保護作用があることも報告されている。

p38 は Mitogen-activated protein kinase (MAPK) ファミリーの 1 つで、種々の細胞外刺激で活性化されアポトーシスを介在することが報告されている。また、初代培養神経細胞を用いた実験で、MAPK の活性化が NMDA レセプターを介するグルタミン酸神経毒性に関与するとの報告や、眼科領域ではラット視神経切断網膜神経節細胞 (RGC) 死モデルで、p38 が細胞死に関与しているとの報告がある。

一方、各種神経栄養因子、IGF-1 などによる神経保護作用が phosphatidylinositol-3kinase (PI-3K) 細胞内情報伝達経路を介することが報告されているが、NMDA による神経保護作用との関連については報告がない。

本研究の目的は、ラット NMDA 誘発網膜神経細胞死モデルにおいて、p38 が関与しているのか、NMDA が神経保護作用を示しそれに PI-3K が関与しているのかを明らかにすることである。

方法は、対側上丘への蛍光色素注入による RGC 逆行性標識の 4 日後、ラット硝子体に NMDA (2-200 nmol) を注入して網膜神経細胞死を誘発した。3 時間—7 日後に RGC 数をカウントして RGC 死を定量的に評価した。組織学的検討では、TUNEL 染色でアポトーシスの検出を、また免疫染色法で活性型 p38 と PI-3K の下流分子である Akt の局在を検索した。Western blotting にて活性型 p38 と Akt を検出し、更に p38 と Akt のキナーゼ活性を測定した。

RGC 死は 10nmol 以上の NMDA 硝子体注入で濃度依存性に観察された。TUNEL 染色では RGC、及び内顆粒層の細胞に陽性細胞が観察された。Western blotting により、活性型 p38 は致死量 NMDA (10nmol 以上) により濃度依存性に注入後 1 時間から観察され、3—6 時間後にピークに達した。p38 インヒビター、SB203580 の同時投与により、RGC 死が有意に抑制され、p38 キナーゼ活性も特異的に抑制された。

一方、Western blotting で活性型 Akt が NMDA 注入後 1 時間から観察され、6 時間後にピークに達した。Akt の活性化も NMDA 濃度依存性を示したが、p38 とは異なり致死量以下の NMDA でも活性化を認めた。PI-3K インヒビター、LY294002 により 10nmol NMDA 注入時の RGC 細胞死が促進され、Akt キナーゼ活性は特異的に抑制された。活性型 p38 も活性型 Akt も RGC 及び内顆粒層に局在を示し、細胞によっては両者が同時に活性化されていた。

これらの結果は、ある条件下で NMDA がアポトーシス促進性情報伝達経路と同時に抑制性経路を活性化することを示している。最近、NMDA レセプターのブロッカー、Memantine が緑内障などの神経変性疾患に臨床応用されているが、本研究はこういった興奮毒性の上流での抑制という戦略が、神経保護作用をも抑制してしまう可能性を示すものであり、より有効な細胞死制御には細胞死に至る情報伝達路をより詳細に検索し、下流分子の特異的制御の必要があることを示すものであ

る。

論文審査の結果の要旨

失明原因疾患第二位である緑内障はじめ、虚血性疾患、視神経症などの眼疾患において、網膜興奮性神経伝達物質グルタミン酸の神経毒性が関与しているとの報告がある。中枢神経系の一部である網膜神経細胞は再生しないため、これらの疾患では未然に細胞死を防ぐことが重要な治療戦略となる。

本論文では、まずグルタミン酸のレセプターアゴニスト、NMDA のラット硝子体注入により網膜神経細胞死が惹起されることを確認した。さらに、NMDA 投与後に p38 MAP キナーゼがリン酸化（活性化）されること、p38 阻害剤の投与で細胞死が抑制されることを示した。一方、PI-3K 細胞内情報伝達系の下流分子である Akt も活性化されたが、p38 とは異なり、PI-3K 阻害剤の投与では細胞死が促進されることを示した。

これらの結果は、ある条件下で NMDA がアポトーシス促進性情報伝達経路と同時に抑制性経路を活性化することを示している。最近、NMDA レセプターのブロックが緑内障などの神経変性疾患に臨床応用されているが、本研究はこの様な興奮毒性の上流での抑制が、神経保護作用をも抑制する可能性があり、より有効な細胞死制御の達成には、より詳細に細胞死に至る情報伝達シグナルを解析し、下流分子を特異的に制御する必要があることを示している。

以上の研究は興奮性網膜神経細胞死のメカニズム解明に貢献し、網膜神経変性疾患の治療戦略確立に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値のあるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成15年1月14日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。