

京都大学	博士 ( 医 学 )	氏 名	日 下 真 実
論文題目	<b>Involvement of endothelins in neuroprotection of valosin-containing protein modulators against retinal ganglion cell damage.</b> (網膜神経節細胞障害に対するバロシン含有タンパク質モジュレーターによる神経保護におけるエンドセリン系の関与)		
(論文内容の要旨) 高齢化社会において、緑内障や加齢黄斑変性による視力障害は世界的に増加の一途をたどると予想されている。現在確立されている治療法としては、例えば緑内障では眼圧下降があるが、現行の治療を行っても視力障害が進行するケースが多々見られ、これらの眼疾患に対して網膜神経細胞の保護をすることができる新たな治療が求められている。 これまでに、京都大学医学部附属病院眼科学教室では、細胞内に多く存在する可溶性 ATPase であるバロシン含有タンパク質 (VCP) の ATPase 活性を調節する新規の物質 Kyoto University Substance (KUS) が、ストレス条件下で細胞を保護することを明らかにしてきた。KUS は緑内障、網膜色素変性、黄斑変性、網膜動脈閉塞症の動物モデルにおいて、神経細胞死・変性を抑制し、病気の進行を抑制することを示している。さらに、ヒトにおいても KUS の一つである KUS121 が臨床試験にて網膜中心動脈閉塞症患者の視力を改善し、網膜神経節細胞保護作用を持つことを明らかにした。このように KUS は様々な神経変性疾患の治療において有用である可能性が期待されているが、その一方 KUS の細胞保護のメカニズムは完全には解明されていない。 本研究では、KUS の細胞保護メカニズムの解明を進めるため、N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) による急性網膜神経節細胞傷害モデルマウスを用いた検討を行なった。網膜神経節細胞において NMDA により発現が上昇している遺伝子転写物 387 個のうち、KUS121、187 投与により発現が低下するものの中から、既報で眼疾患との関連が指摘されている 2 つの遺伝子、エンドセリン-1 (Edn1) とエンドセリン受容体 B 型 (Ednrb) に着目した。 まず、上記の急性網膜神経節細胞傷害モデルマウスの神経網膜から抽出した cDNA を用いた realtime-PCR、神経網膜から抽出したタンパクを用いたウエスタンブロット、眼球組織切片を用いた免疫染色によって Edn1 と Ednrb の発現が NMDA の硝子体注射によって上昇し、KUS121 投与下ではそれが抑制されることを確認した。in vitro でも同様に、ラットより抽出した Primary RGC において NMDA 投与下での Edn1 の発現は KUS121 によって抑制されていた。 次に、エンドセリンシグナル伝達と KUS がどのように関連して細胞生存率に影響を及ぼしているのか明らかにするため、マウスの網膜腫瘍由来で、網膜神経節前駆体様細胞株であることが報告されている 661W 網膜細胞株を用いて、ストレス条件下でのエンドセリンのアンタゴニストまたはアゴニストの投与有無および KUS121 の投与有無による生細胞数を調べた。その結果、グルコースを含まない培地での培養 (グルコース飢餓) 下およびツニカマイシンを用いた糖付加阻害による小胞体ストレス惹起下で KUS121 を加えると細胞数減少が有意に抑制された。この保護効果は、グルコース飢餓下では、エンドセリン拮抗薬または作動薬の存在下で部分的に減弱した。また、細胞表面に Ednrb を発現し、カルシウム応答によって蛍光が励起される CHO 細胞を用いて、機能アッセイを行った。その結果 Ednrb のシグナルはグルコース飢餓下で増強され、KUS121 添加にて抑制されることが示唆された。さらに、エンドセリン系で Ednrb の下流で活性化することが知られている extracellular signal-regulated kinase (ERK) はグルコース飢餓下で活性化が促進され、KUS121 で抑制された。 これらの結果から、KUS121 による細胞保護には、ストレス条件下で上昇したエンドセリンシグナル伝達の抑制を介する機序があることが示唆された。			

エンドセリン系に関しては眼疾患以外での分野で研究が進み、すでにそのアンタゴニストには治療薬として用いられているものもある。KUS とエンドセリン系の関係が示唆された今回の結果は、今後の KUS の臨床応用を推進する上で有用であるのみならず、あらたな神経保護治療ターゲットの開発にも役立つと考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

バロシン含有タンパク質の ATPase 活性を調節する新規物質 Kyoto University Substance (KUS) は、ストレス条件下で細胞を保護し、様々な網膜疾患の動物モデルにて神経細胞死とその病状進行を抑制するが、その細胞保護のメカニズムは完全には解明されていない。

本研究では、N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA) による急性網膜神経節細胞傷害モデルマウスとラット初代培養網膜神経節細胞を用いて、ストレス下で上昇するエンドセリン-1(Edn1)とエンドセリン受容体 B 型(Ednrb)の発現が KUS121 投与にて抑制されることを確認した。また、グルコース飢餓下の 661w 網膜細胞に KUS121 を加えると細胞数減少が有意に抑制されたが、この保護効果はエンドセリン拮抗薬または作動薬の存在下で部分的に減弱した。さらに、Ednrb の下流で活性化する extracellular signal-regulated kinase はグルコース飢餓下で活性化が促進され、KUS121 投与で抑制された。

これらの結果から、KUS121 の細胞保護作用にはストレス条件下で上昇したエンドセリンシグナル伝達を抑制する作用が関与していることが示唆された。

以上の研究は KUS の細胞保護機序の解明に貢献し、今後の臨床応用の推進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あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、令和 5 年 12 月 13 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。

要旨公開可能日： 年 月 日以降