

氏 名	やま うち とも おさ 山 内 知 房
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2626 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	Mitochondrial ATP-sensitive potassium channel: A novel site for neuroprotection (ミトコンドリア ATP 依存性カリウムチャンネル：神経保護のための新たな標的)
論文調査委員	(主 査) 教 授 福 田 和 彦 教 授 中 西 重 忠 教 授 本 田 孔 士

論 文 内 容 の 要 旨

網膜虚血における神経細胞死の本質は NMDA 受容体を介したグルタミン酸毒性である。この研究の目的は、以前に明らかになった、ブラジキニンのグルタミン酸毒性に対する保護作用の機構を解明することである。

実験にはラット胎児の初代網膜培養細胞を用いた。グルタミン酸毒性の評価は、培養細胞に 1mM のグルタミン酸を 10 分間投与した後、グルタミン酸を含まない培養液中に 1 時間おいた後、トリバンプルー染色法により行った。またミトコンドリア膜電位の測定を蛍光色素 JC-1 を用いて行った。

グルタミン酸投与により、培養網膜神経細胞の生存率は 80-90% から、20-40% に低下した。ブラジキニンをグルタミン酸と同時に投与することにより、この生存率低下は抑制された。またこのブラジキニンの作用は、ブラジキニンと同時にミトコンドリア ATP 依存性カリウムチャンネルの阻害剤である、5-HD またはグリベンクラミドを投与することにより阻害された。5-HD、グリベンクラミドは単独では培養細胞の生存率には影響せず、またグルタミン酸と同時に投与しても、グルタミン酸による生存率減少に影響しなかった。さらに、ミトコンドリア ATP 依存性カリウムチャンネルを活性化するディアゾキシドも、ブラジキニン同様、グルタミン酸投与に伴う培養細胞の生存率の低下を抑制し、この作用は 5-HD またはグリベンクラミドを同時に投与することにより阻害された。これらの結果はブラジキニンがミトコンドリア ATP 依存性カリウムチャンネルを介して、グルタミン酸毒性に対する保護作用を発揮し、またミトコンドリア ATP 依存性カリウムチャンネルを活性化することが、培養網膜神経細胞の保護につながることを示唆している。

ディアゾキシドは NO 生成試薬である SNP 投与に伴う、培養網膜神経細胞の生存率減少を抑制した。しかし、NO と O_2^- を同時に生成する SIN-1 投与に伴う生存率減少に対しては抑制効果を示さなかった。神経細胞のグルタミン酸毒性においては、NO および O_2^- が生成され毒性を媒介することが知られており、また今回実験に使用した系においては NO と O_2^- が反応して生成されるペルオキシ亜硝酸が毒性を発揮することが以前の研究で明らかになっている。これらのことから、ディアゾキシドが O_2^- 生成の上流に作用していることが示唆される。以前の研究からブラジキニンがやはり O_2^- 生成を抑制することが示唆されており、ミトコンドリア ATP 依存性カリウムチャンネルを活性化することにより、神経細胞の主要な O_2^- 生成の場であるミトコンドリアにおける O_2^- 生成が抑制されと考えられる。

JC-1 を用いたミトコンドリア膜電位測定により、ブラジキニンおよびディアゾキシドがグルタミン酸により誘発されるミトコンドリア膜電位の脱分極を抑制し、この作用が 5HD により阻害されることが明らかになった。グルタミン酸投与に伴うミトコンドリア膜の脱分極はミトコンドリア内へのカルシウム流入を反映しているので、ミトコンドリア ATP 依存性カリウムチャンネルを活性化することにより、グルタミン酸投与に伴うミトコンドリア内へのカルシウム流入が抑制されたことが示唆される。

以上の結果から、ブラジキニンがミトコンドリア ATP 依存性カリウムチャンネルを活性化することにより、グルタミン酸毒性から培養網膜神経細胞を保護することが明らかになった。この保護作用はグルタミン酸投与に伴う O_2^- 生成抑制に

よるものであることが示唆され、またその機序として、グルタミン酸投与に伴うミトコンドリア内へのカルシウム流入の抑制が示唆された。

論文審査の結果の要旨

グルタミン酸は、虚血性眼疾患において興奮性神経毒性を示すことが知られている。本研究の目的は、網膜でのグルタミン酸毒性に対する神経保護におけるミトコンドリア ATP 依存性カリウムチャンネル（以下 Mt K_{ATP}）の関与機構を解明することである。ラット胎児網膜の初代培養細胞を用いた実験系で以下の結果を得た。グルタミン酸毒性に対するブラジキニンの保護作用が、Mt K_{ATP} 阻害剤の 5HD により抑制された。また、Mt K_{ATP} を開くディアゾキシドがグルタミン酸毒性に対して保護作用を示した。ブラジキニン、ディアゾキシドはグルタミン酸投与に伴うミトコンドリア膜電位の脱分極を抑制した。さらにディアゾキシドは、NO 生成試薬である SNP による毒性に対して保護作用を示す一方、NO と活性酸素の生成試薬である SIN-1 による毒性に対しては保護作用を示さなかった。以上の結果から、Mt K_{ATP} を開くことによりグルタミン酸投与に伴うミトコンドリア内へのカルシウム流入が抑制され、その結果ミトコンドリアにおける活性酸素の生成が抑制され、そのことが保護作用につながることを示唆された。Mt K_{ATP} を介した神経保護は、グルタミン酸の生理的機能を阻害することなく神経毒性だけを抑制できる点が臨床応用において有用である。

以上の研究は虚血性眼疾患における、新たな神経保護の機構の解明に貢献し、その治療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、平成15年3月3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。