

氏 名	かね だ かつ ゆき 金 田 勝 幸
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	薬 博 第 423 号
学位授与の日付	平成 11 年 3 月 23 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	薬 学 研 究 科 薬 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	虚血性網膜神経細胞死の機序に関する分子薬理学的研究

(主査)

論文調査委員 教授 赤池昭紀 教授 佐藤公道 教授 川 寄 敏 祐

論 文 内 容 の 要 旨

網膜を含む中枢神経系の神経細胞は虚血障害に対して非常に脆弱であり、緑内障、糖尿病性網膜症や網膜血管閉塞症などの眼疾患に虚血性網膜神経細胞死の関与することが指摘されてきている。大脳皮質や海馬などの終脳諸部位における虚血性神経細胞死はグルタミン酸の興奮性神経毒性を含むいくつかの要因により引き起こされるが、網膜における神経細胞死の機序には不明の点が多い。さらに、ネクローシスが主体であると考えられてきた脳虚血後の遅延性神経細胞死において、アポトーシスの関与することが示唆されてきた。そこで、著者は、虚血性網膜神経細胞死の機序を明らかにする目的で、*in vitro* 初代培養網膜細胞系および*in vivo*一過性網膜虚血モデルを用いた研究を行い、以下の新知見を得た。

第1章 培養網膜神経細胞におけるグルタミン酸神経毒性の機序およびB群ビタミンの保護作用

ラット胎仔由来培養網膜細胞を高濃度のグルタミン酸で短時間処置することにより、遅延性神経細胞死が誘発された。このグルタミン酸神経毒性は*N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体アンタゴニストのMK-801およびnon-NMDA受容体アンタゴニストのCNQXにより拮抗され、実験培地中からのCa²⁺除去により著明に抑制された。カルシウムイオノフォアのイオノマイシンもグルタミン酸と同様の神経毒性を発現した。一酸化窒素(NO)合成酵素阻害薬の*N*^ω-nitro-L-arginine (N-Arg) およびNO捕捉剤のヘモグロビンはグルタミン酸およびイオノマイシン神経毒性を抑制した。また、NOドナーのsodiumnitroprussideおよび*N*-nitrosocysteineもグルタミン酸に類似した遅延性神経細胞死を誘発した。NOドナーによる神経毒性はヘモグロビンの投与により減弱したが、培地中からのCa²⁺除去あるいはMK-801投与によっては影響を受けなかった。これらの結果は、NMDAおよびnon-NMDA受容体刺激を介した過剰なCa²⁺流入とそれに続くNO合成酵素の活性化によるNOの生成によりグルタミン酸神経毒性が発現することを示している。さらに、培養網膜細胞において、チアミン(B1)、ピリドキシン(B6)およびニコチンアミドの慢性投与がグルタミン酸神経毒性に対して保護作用を発現することを見出した。

第2章 虚血性網膜神経細胞死におけるアポトーシスの関与

虚血性網膜神経細胞死の要因としてアポトーシスが関与するかどうかを検討する目的で、*in vivo*網膜虚血実験を行った。麻酔下のラットの前眼房に血圧を超える水圧を負荷することにより一過性網膜虚血を誘発した。虚血後の網膜組織におけるDNAの断片化をterminal deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTP nick end-labelling (TUNEL) 法で検討したところ、神経節細胞層(GCL)および内顆粒層(INL)においてTUNEL陽性細胞が観察された。その数は虚血24時間後にピークに達し、その後徐々に減少し、虚血7日後にはほとんど消失した。TUNEL陽性細胞が多数観察された虚血24および48時間後の網膜から抽出したDNAをアガロースゲル電気泳動により解析したところ、アポトーシスに特徴的なラダーが観察された。さらに、MK-801およびCNQXを虚血負荷前に単独あるいは同時に硝子体内投与することにより、虚血によるDNA断

片化の発現は著明に抑制された。グルタミン酸とグルタミン酸トランスポーター阻害薬のtrans-PDCを同時に硝子体内投与することにより、TUNEL陽性細胞の誘導が観察された。NMDAの硝子体内投与によっても虚血時と同様のTUNEL陽性細胞の誘導が観察され、この作用はMK-801の同時投与により抑制された。以上の結果は、一過性網膜虚血によりイオンチャネル型グルタミン酸受容体を介して遅延性にアポトーシスが誘導されることを示唆する。

第3章 網膜虚血によるアポトーシス誘導におけるBcl-2関連タンパクの関与

アポトーシス抑制因子であるB cell lymphoma-2 (Bcl-2) とアポトーシス促進因子であるBcl-2-associated Xprotein (Bax) の虚血後の網膜における発現変化をRT-PCR法により解析した結果、*bcl-2* mRNAレベルは再灌流168時間後まで顕著な変化を示さなかったのに対し、*bax* mRNAレベルは虚血6時間後から上昇し始め、24時間後にはピークに達し、168時間後にはほぼコントロールレベルにまで減少した。Baxの発現上昇を免疫組織化学により検討したところ、正常網膜ではほとんどBax免疫反応陽性細胞が観察されなかったのに対し、虚血24時間後の網膜ではGCLおよびINLにおいてBax免疫反応陽性細胞が観察された。グルタミン酸とtrans-PDCを同時に硝子体内投与することによりBax陽性細胞が観察され、Bax発現上昇はMK-801およびCNQXを虚血負荷前に同時に硝子体内投与することにより著明に抑制された。さらに、*bax*に対するアンチセンスを虚血負荷24時間前に硝子体内投与することにより、虚血24時間後のBaxの発現上昇が抑制されるとともに、TUNEL陽性細胞数も減少した。以上の結果は、一過性網膜虚血後のアポトーシス誘導においてグルタミン酸受容体を介するBaxの発現上昇が関与することを示唆する。

以上、著者は、網膜神経細胞のグルタミン酸神経毒性にイオンチャネル型グルタミン酸受容体刺激を介したNOの生成が重要な役割を果たすこと、および、グルタミン酸神経毒性に対してB1、B6およびニコチンアミドが保護作用を発現することを明らかにした。さらに、虚血性網膜障害にアポトーシスが関与することを見出し、その過程でイオンチャネル型グルタミン酸受容体を介したBaxの発現が重要な役割を果たしていることを明らかにした。本研究の成果は、網膜における虚血性神経細胞死の機序の解明に対する有用な知見となるとともに、網膜神経細胞死を伴う神経変性疾患の予防・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

網膜を含む中枢神経系の神経細胞は虚血障害に対して非常に脆弱であり、緑内障、糖尿病性網膜症や網膜血管閉塞症などの眼疾患に虚血性網膜神経細胞死の関与することが指摘されてきている。大脳皮質や海馬などの終脳諸部位における虚血性神経細胞死はグルタミン酸神経毒性を含む複数の要因により引き起こされることが明らかにされているが、網膜虚血後の神経細胞死の機序には不明の点が多い。そこで、本研究において筆者は、虚血性網膜神経細胞死の機序を明らかにする目的で、*in vitro*初代培養網膜細胞系および*in vivo*一過性網膜虚血モデルを用いて実験を行った。その結果、培養網膜細胞におけるグルタミン酸神経毒性の発現にはイオンチャネル型グルタミン酸受容体刺激による一酸化窒素 (NO) の生成が重要な役割を果たすこと、グルタミン酸神経毒性に対してB群ビタミンのうちB1、B6およびニコチンアミドが保護作用を発現することを見出した。さらに、一過性網膜虚血障害に神経細胞のアポトーシスが関与するとともに、その過程においてイオンチャネル型グルタミン酸受容体刺激によるアポトーシス促進因子の発現上昇が重要な役割を果たしていることを明らかにした。

初めに、ラット胎仔由来培養網膜細胞を用いてグルタミン酸神経毒性の機序の解明を試みた結果、グルタミン酸で培養細胞を短時間処置することにより遅延性神経細胞死が誘発され、このグルタミン酸神経毒性はグルタミン酸受容体アンタゴニストの投与あるいは培地中からのCa²⁺除去により著明に抑制されること、カルシウムイオノフォアのイオノマイシンもグルタミン酸と同様の神経毒性を発現すること、さらに、NO合成酵素阻害薬およびNO捕捉剤がグルタミン酸およびイオノマイシン神経毒性を抑制することを見出した。NOドナーもグルタミン酸に類似した遅延性神経細胞死を誘発し、このNOドナー誘発神経毒性はヘモグロビンの投与により減弱した。これらの結果より、グルタミン酸受容体刺激による過剰なCa²⁺流入とそれに続くNO合成酵素の活性化により産生されたNOを介してグルタミン酸神経毒性が発現することが明らかとなった。さらに、培養網膜細胞において、チアミン (B1)、ピリドキシン (B6) およびニコチンアミドの慢性投与がグルタミン酸神経毒性に対して保護作用を発現することを見出した。

次いで、虚血性網膜神経細胞死の要因としてアポトーシスが関与するか否かを検討する目的で、麻酔下のラット前眼房へ

の水圧負荷により一過性網膜虚血を誘発し、虚血後の網膜組織におけるDNAの断片化をterminal deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTPnick end-labeling (TUNEL) 法で検討した。その結果、神経節細胞層 (GCL) および内顆粒層 (INL) においてTUNEL陽性細胞が観察され、その数は虚血24時間後にピークを示すこと、また、TUNEL陽性細胞が多数観察された虚血24および48時間後の網膜から抽出したDNAのアガロースゲル電気泳動によりアポトーシスに特徴的なラダーが観察されることを明らかにした。さらに、グルタミン酸受容体アンタゴニストを虚血負荷前に硝子体内投与することにより、虚血によるDNA断片化の発現が著明に抑制されることを見出した。グルタミン酸受容体サブタイプのNMDA受容体の選択的アゴニストであるNMDAの硝子体内投与によりTUNEL陽性細胞が誘導され、このNMDAによるDNA断片化の誘導はNMDA受容体アンタゴニストのMK-801により抑制された。これらの結果より、一過性網膜虚血によりイオンチャネル型グルタミン酸受容体を介して遅延性にアポトーシスが誘導されることを示した。

網膜虚血によるアポトーシス誘導の機序を解明する目的で、アポトーシス抑制因子であるB cell lymphoma-2 (Bcl-2) とアポトーシス促進因子であるBcl-2-associated Xprotein (Bax) の虚血後の網膜における発現変化をRT-PCR法により解析した。その結果、*bcl-2* mRNAレベルは顕著な変化を示さなかったのに対し、*bax* mRNAレベルは虚血24時間後をピークとする一過性の発現上昇を示すことを見出した。Baxタンパクの発現を免疫組織化学により検討したところ、正常網膜ではほとんどBax免疫反応性が観察されなかったのに対し、虚血24時間後の網膜ではGCLおよびINLにおいてBax免疫反応陽性細胞が観察されることを明らかにした。さらに、*bax* アンチセンスの虚血前の硝子体内投与により、虚血後のBax発現上昇が抑制されるとともに、TUNEL陽性細胞数も減少することを見出した。これらの結果から、一過性網膜虚血後のアポトーシス誘導においてグルタミン酸受容体を介するBaxの発現上昇の関与することが示唆された。

以上の研究は、網膜神経細胞のグルタミン酸神経毒性にイオンチャネル型グルタミン酸受容体刺激によるNOの生成が重要な役割を果たすこと、グルタミン酸神経毒性に対してB1、B6およびニコチンアミドが保護作用を発現すること、さらに、虚血性網膜障害にアポトーシスが関与し、その過程でイオンチャネル型グルタミン酸受容体を介したBaxの発現が重要な役割を果たしていることを明らかにしたものであり、網膜における虚血性神経細胞死の機序の解明に対する有用な知見となるとともに、網膜神経細胞死を伴う神経変性疾患の予防・治療において重要な基礎的資料を提供すると考えられる。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

更に、平成11年2月19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。