

氏 名	たか はた かず え 高 畑 和 恵
学位の種類	博 士 (薬 学)
学位記番号	論 薬 博 第 703 号
学位授与の日付	平 成 16 年 3 月 23 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	網膜神経細胞死における一酸化窒素の役割とその制御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 佐 治 英 郎 教授 佐 藤 公 道

論 文 内 容 の 要 旨

緑内障、糖尿病性網膜症、網膜血管閉塞症などの眼疾患には興奮性アミノ酸による神経細胞死の関与することが指摘されてきている。網膜における主要な興奮性アミノ酸であるグルタミン酸は網膜虚血時に過剰に遊離され、N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体を介して神経節細胞、アマクリン細胞などの網膜内層の神経細胞死を惹起する。興奮性神経毒性に関わる因子として一酸化窒素 (NO) が重要な役割を果たすことが示唆されてきているが、グルタミン酸神経毒性が NO 合成酵素の阻害薬によって抑制されることなど間接的な証拠に基づくものであり、*in vivo*で NO が神経細胞死を誘発することの直接証拠はない。そこで、申請者は網膜神経細胞死における NO の役割と神経栄養因子および selegiline の網膜細胞死に対する効果を明らかにする目的で、*in vivo*の薬理学的研究を行い、以下の新知見を得た。

第一章 NO ドナーにより誘発される網膜障害の解析

NO 遊離の半減期の異なる 3 種の NO ドナー 1-hydroxy-2-oxo-3- (3-aminopropyl) -3-isopropyl-1-triazene (NOC5), 1-hydroxy-2-oxo-3- (N-ethyl-2-aminoethyl) -3-ethyl-1-triazene (NOC12), 1-hydroxy-2-oxo-3, 3-bis (2-aminoethyl) -1-triazene (NOC18) を用い、ラットの硝子体内に薬物微量注射を行い、NO ドナーが網膜障害を起こすか否かについて組織学的に検討した。その結果、NO 遊離の半減期の短い NOC12 および NOC5 が著明な網膜障害を引き起こすことを見出した。網膜障害を最も強く誘発した NOC12 について詳細な検討を行った結果、神経節細胞層 (GCL)、内網様層 (IPL) および内顆粒層 (INL) といった網膜内層に局限して障害が誘発されることが明らかになった。このような網膜内層に局限した網膜障害は NMDA により惹起される網膜障害と一致していた。NOC12 により誘発される網膜障害は、NO を選択的に除去する 2- (4-carboxyphenyl) -4, 4, 5, 5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (carboxy-PTIO) により完全に抑制されること、および、NO を完全に放出した後の NOC12 の硝子体内注射では網膜障害が誘発されないことなどから、NOC12 による網膜障害は NO を介したものであることが示された。さらに、NO 誘発網膜神経細胞死がアポトーシスによるか否かを検討する目的で、DNA 断片化を terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 法で検出したところ、NOC12 を硝子体内注射することにより GCL および INL に局限して TUNEL 陽性細胞が観察された。さらに、NOC12 誘発網膜障害は NMDA 受容体遮断薬 MK-801 により部分的に抑制された。以上の結果より、NO ドナーから遊離された NO が、アポトーシスを誘導することにより GCL を含む網膜内層の選択的な障害を惹起し、少なくともその一部には NMDA 受容体を介するグルタミン酸神経毒性の関与することが示された。

第二章 脳由来神経栄養因子 (BDNF)、毛様体神経栄養因子 (CNTF)、selegiline による網膜障害の制御

神経栄養因子である BDNF および CNTF は、グルタミン酸受容体アゴニストにより誘発される網膜神経細胞死を抑制することが報告されている。そこで、グルタミン酸神経毒性の重要なメディエーターである NO に対する BDNF および CNTF の作用を検討した。ラットの硝子体内に NOC12 および神経栄養因子を微量注射し組織学的な検討を行った結果、BDNF および CNTF が NO 誘発網膜障害を抑制することが明らかになった。選択的 B 型モノアミンオキシダーゼ (MAO_B)

阻害薬であるselegilineはドパミン系の賦活作用を示すことからパーキンソン病治療薬として用いられており、細胞株や培養ドパミンニューロンにおいて抗アポトーシス作用を示すことが報告されてきている。そこで、グルタミン酸-NO系により誘発される網膜障害に対するselegilineの作用を検討したところ、selegilineの皮下注射はNMDAおよびNO誘発網膜障害を抑制し、さらに、selegiline代謝物のdesmethylselegilineの硝子体内への局所投与はNMDA誘発網膜障害を抑制した。以上の結果より、BDNF、CNTFおよびselegilineはNO系を介した網膜障害を抑制すること、および、selegilineによる網膜保護作用の一部にはselegiline代謝物のdesmethylselegilineの関与することが示唆された。

以上、著者は、*in vivo*においてNOが網膜内層の神経細胞死を選択的に惹起することを見出した。NO誘発網膜細胞死は主としてアポトーシスによること、また、部分的にNMDA受容体を介するグルタミン酸神経毒性の関与することが示された。さらに、NOによる網膜障害はBDNF、CNTFおよびselegilineにより抑制された。本研究の成果は虚血性網膜障害の機構の解明に対し有用な知見となるとともに、網膜変性疾患の予防・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

緑内障、糖尿病性網膜症、網膜血管閉塞症などの眼疾患には興奮性アミノ酸による神経細胞死の関与することが指摘されてきている。網膜における主要な興奮性アミノ酸であるグルタミン酸は網膜虚血時に過剰に遊離され、N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体を介して神経節細胞、アマクリン細胞などの網膜内層の神経細胞死を惹起する。興奮性神経毒性に関わる因子として一酸化窒素 (NO) が重要な役割を果たすことが示唆されてきているが、グルタミン酸神経毒性がNO合成酵素の阻害薬によって抑制されることなど間接的な証拠に基づくものであり、*in vivo*でNOが神経細胞死を誘発することを示す直接の証拠はない。そこで、網膜神経細胞死におけるNOの役割と神経栄養因子およびselegilineの網膜細胞死に対する効果を明らかにする目的で、*in vivo*の薬理学的研究を行った。

はじめに、NO遊離の半減期の異なる3種のNOドナー、NOC5、NOC12、NOC18を用い、ラットの硝子体内に薬物微量注射を行い、NOドナーが網膜障害を起こすか否かについて組織学的に検討し、NO遊離の半減期の短いNOC12およびNOC5が著明な網膜障害を引き起こすことを見出した。網膜障害を最も強く誘発したNOC12について詳細な検討を行った結果、神経節細胞層 (GCL)、内網様層 (IPL) および内顆粒層 (INL) といった網膜内層に局限して障害が誘発されることが明らかになった。このような網膜内層に局限した網膜障害はNMDAにより惹起される網膜障害と一致していた。NOC12により誘発される網膜障害は、NO除去薬carboxy-PTIOにより完全に抑制されること、NOを完全に放出した後のNOC12の硝子体内注射では網膜障害が誘発されないことなどの知見から、NOC12による網膜障害はNOを介したものであることが示された。さらに、NO誘発網膜神経細胞死がアポトーシスによるか否かを検討する目的で、DNA断片化をTUNEL法で検出したところ、NOC12を硝子体内注射することによりGCLおよびINLに局限してTUNEL陽性細胞が観察された。NOC12誘発網膜障害はNMDA受容体遮断薬MK-801により部分的に抑制された。以上の結果より、NOドナーから遊離されたNOが、アポトーシスを誘導することによりGCLを含む網膜内層の選択的な障害を惹起し、少なくともその一部にはNMDA受容体を介するグルタミン酸神経毒性の関与することが示された。

NOはグルタミン酸神経毒性の重要なメディエーターであり、網膜内在性の神経栄養因子であるBDNFおよびCNTFがグルタミン酸受容体アゴニストにより誘発される網膜神経細胞死を抑制することから、本研究で確立したNO誘発網膜障害モデルにおけるBDNFおよびCNTFの作用を検討した。ラットの硝子体内にNOC12および神経栄養因子を微量注射し組織学的な検討を行った結果、BDNFおよびCNTFがNO誘発網膜障害を抑制することが明らかになった。選択的B型モノアミンオキシダーゼ (MAO_B) 阻害薬であるselegilineはドパミン系の賦活作用を示すことからパーキンソン病治療薬として用いられており、細胞株や培養ドパミンニューロンにおいて抗アポトーシス作用を示すことが報告されてきている。そこで、グルタミン酸-NO系により誘発される網膜障害に対するselegilineの作用を検討したところ、selegilineの皮下注射はNMDAおよびNO誘発網膜障害を抑制し、さらに、selegiline代謝物のdesmethylselegilineの硝子体内への局所投与はNMDA誘発網膜障害を抑制した。以上の結果より、BDNF、CNTFおよびselegilineはNO系を介した網膜障害を抑制すること、および、selegilineによる網膜保護作用の一部にはselegiline代謝物のdesmethylselegilineの関与することが示唆された。

以上の研究は、虚血などの病的条件下に遊離されたNOが主としてアポトーシスにより網膜内層の神経細胞死を選択的に惹起すること、さらに、このようなNOによる網膜障害がBDNF, CNTFなどの網膜内在性栄養因子やselegilineのように抗アポトーシス作用をもつ薬物により抑制されることを明らかにしたものであり、虚血性網膜障害の機構の解明と神経保護を標的とした網膜変性疾患の予防・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。

さらに、平成16年2月17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。