（書式１８）課程博士

学　位　論　文　要　約

博士論文題目　酸化ストレス誘導網膜神経節細胞障害におけるカルパインの役割

東北大学大学院医学系研究科　医科学専攻
神経感覚器病態学講座　眼科学　分野
氏名　横山　悠

【目的】

網膜神経節細胞（retinal ganglion cell: RGC）は生体内において視覚情報を中枢へと送る重要な働きを担う。RGC は生体内で増殖しないため、障害されると不可逆的視機能障害を来す。緑内障など様々な疾患で障害されるが、その機序に不明な点は多い。本研究では、マウスを用いて薬剤による網膜酸化ストレス負荷モデルを作成し、酸化ストレスによる RGC 障害の誘導を試みた。また、その過程において細胞死の重要なパスウェイの一つであるカルパインパスウェイの役割を検討した。

【方法】

C57BL/6 マウスの眼球に 2, 2'-azobis （2-amidinopropane） dihydrochloride（AAPH）を投与して酸化ストレスの負荷を試みた。Fluorogold （FG）を用い、RGC を上丘から逆行性に染色したマウスに対して AAPH（30mM, 2μl）、もしくは対照として Dulbecco's phosphate-buffered saline（DPBS, 2μl）の硝子体注射を施行した。7 日後に網膜を採取し固定を行った後に、フラットマウント標本を作成、生存 RGC 数を計測し障害の評価を行った。次に細胞死の原因を確認するため、RGC を FG 標識し、AAPH を硝子体注射した後、活性酸素種の検出用蛍光プローブ（CellROX）とアポトーシス検出用プローブ（Annexin V）の共染色を行い 24 時間後に共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

同様の手法で AAPH 硝子体注射を行い、カルパイン蛍光プローブを用いて RGC 内のカルパイン活性化の検出を行った。またウェスタンブロットを用いてカルパインによる分解産物（断片化α-fodrin）を確認することでカルパイン活性化の経時変化を検証した。さらにカルパイン阻害薬（SNJ-1945）が RGC に与える効果を調べた。

【結果】

AAPH 投与 7 日後､対照眼に比較し有意な RGC 密度の減少が確認された（対照: 3806.7 ± 575.2 RGCs/mm2, AAPH: 3156.1 ± 371.2 RGCs/mm2, $P < 0.01$）。AAPH 投与 24 時間後、FG 標識された RGC に CellROX と Annexin V の共染色が確認された。AAPH により酸化ストレスが RGC に負荷され、アポトーシスが誘導されていることが示唆された。また、ウェスタンブロットでは 24 時間後に有意な断片化α-fodrin の上昇を検

出した。カルパイン蛍光プローブを用いた観察ではAAPH投与24時間後にRGC内にカルパインの活性化が確認された。

SNJ-1945によりAAPH投与後の断片化α-fodrinの産生は抑制され、また7日後のRGC数の減少は有意に抑制された（AAPH: 3354.0 ± 226.9 RGCs/mm2, AAPH+SNJ-1945: 3717.1 ± 614.6 RGCs/mm2, $P < 0.01$）。

【結論】

AAPH を用いて、マウス網膜に酸化ストレスを負荷するモデルを作成した。この実験において、酸化ストレスはRGCにカルパイン活性化を惹起し細胞死を誘導した。カルパインは酸化ストレスによるRGC死に重要な役割を果たし、神経保護治療ターゲットとなる可能性が示された。