

氏 名	よこやま ゆう 横山 悠
学位の種類	博士（医学）
学位授与年月日	平成27年3月25日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科（博士課程）医科学専攻
学位論文題目	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
論文審査委員	主査 教授 中澤 徹 教授 布施 昇男 教授 阿部 俊明

論文内容要旨

【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が多い。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, 2 μ l)、もしくは対照として Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS, 2 μ l) 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

(書式 1 2)

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。

審 査 結 果 の 要 旨

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

所属専攻・分野名 医科学専攻 眼科学 分野

氏名 横山 悠

緑内障は我が国における中途失明原因 1 位の疾患であり、疾患が社会に与える影響は非常に大きい。眼圧が主な緑内障の危険因子として知られており、眼圧を下降させることが、エビデンスのある唯一の治療法である。

しかし眼圧下降療法が進歩した現在でも依然として緑内障は失明疾患である。これは緑内障の病態に眼圧以外の因子も関係することを示しており、その病態を明らかにすることは緑内障を克服するための重要な課題である。

緑内障の病態には不明な点を多く残すが、その本態は網膜神経節細胞（RGC）の不可逆的な障害である。これまでに申請者らのグループは、マウスの視神経を挫滅することで RGC 死を誘導するモデルを用い、眼内に酸化ストレスが負荷されていることが明らかにした。本研究は、これまでの研究を進めたもので、RGC における酸化ストレスと細胞死に重要な経路の 1 つであるカルパインパスウェイに着目したものである。申請者は酸化ストレスを 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) の硝子体注射を用いることで網膜に負荷した。これにより 1 週間後の RGC 密度が減少することを示した。次にタンパク質の解析を用いて、AAPH 硝子体注射 24 時間後にカルパイン分解産物が網膜内で有意に上昇することを示し、カルパインの活性化が網膜内で生じていることを示した。さらに蛍光イメージングの手法を用い、AAPH 硝子体注射 24 時間後に RGC に酸化ストレスとアポトーシスが惹起され、カルパインの活性化が生じていることを示した。以上により申請者は AAPH により RGC に酸化ストレスが付加され、それによりカルパインが活性化し、アポトーシスが誘導されていることを考察した。また、カルパイン阻害薬を腹腔内投与することで網膜内のカルパイン活性化は抑制され、また RGC 障害も減じた。これらの結果から、カルパインは酸化ストレスによる RGC 障害で重要な働きをしており、神経保護治療のターゲットになる可能性がある。

本研究で確立した酸化ストレスを負荷するモデルは今後、さらなる活用が見込まれる。しかし AAPH 硝子体注射という手法上、網膜全体に酸化ストレスを負荷する可能性があることに注意が必要である。主に RGC を障害するマウス視神経挫滅モデルとこの点が異なり、明確にする必要がある。申請者はこの点に関し査読者らの指摘を受け、本研究で確立した AAPH による酸化ストレス負荷モデルの特徴と限界を言及し、論文をまとめた。これにより申請者の研究成果報告は学位の基準に十分適合すると思われる。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。