

氏名	ゆきた まさよし 雪田 昌克
学位の種類	博士(医学)
学位授与年月日	平成28年9月26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	動物視神経障害モデルにおける早期バイオマーカー及び神経保護薬効果の検討
論文審査委員	主査 教授 中澤 徹 教授 阿部 俊明 教授 布施 昇男

論文内容要旨

【目的】緑内障は、本邦の失明原因の第一位を占める重要な網膜神経節細胞(以下RGC)の変性疾患である。本邦では、眼圧が正常なタイプの緑内障(正常眼圧緑内障)の割合が多く、眼圧を下降させても視野障害が進行する症例が多数存在することが問題となっている。近年、Brimonidine点眼が、眼圧非依存的な神経保護作用を有する可能性があることが明らかになった。基礎研究においては、同薬剤が、phosphatidyl inositol-3 kinase(以下PI3K)やMitogen-activated protein kinase(以下MAPK)を活性化させること、brain-derived neurotrophic factor(以下BDNF)等の神経栄養因子の発現を上昇させることが報告されている。Scotopic threshold response(以下STR)は、暗順応下で微弱な光刺激に対する網膜の電気反応である。網膜電図(Electroretinogram: ERG)を用いて測定され、RGCを含む網膜内層の機能を反映するとされる。本研究では、緑内障における視神経軸索障害とそれに続くRGC細胞死の病態を解明することを目的とした。ラット視神経挫滅モデルにおけるRGC機能障害のバイオマーカーを明らかにし、RGC死に対するBrimonidineの神経保護効果を検討するため、STRの測定や分子生物学検索及び形態学的解析を行った。

【方法】

マウスの視神経を鑷子で挫滅し、視神経挫滅モデルを作製した。視神経挫滅後1、2、3、5、7日で網膜mRNAを採取し、1、2、3、5、7、10日で網膜電図を測定し、2、5、7、10日目でRGC層を含む視神経周囲網膜内層厚を光断層撮影を用いた*in vivo*イメージングにより計測した。次に、ラットを用いて視神経切断モデルを作製し、同様の検討を行った。同モデルにBrimonidineを硝子体内投与後、網膜電図を測定し、網膜mRNA解析と逆行性フルオロゴールド染色による生存RGC数の定量を行い、その神経保護作用を検討した。更に、観察された神経保護効果とBDNFとの関連を調べるため、BDNFパスイエイの阻害剤であるK252a(Trkレセプター阻害剤)、U0126(MAPK/ERK阻害剤)、LY294002(PI3K阻害剤)をそれぞれBrimonidineと同時に投与し、網膜電図を測定した。

【結果】

マウス視神経挫滅モデルにおいて、RGCマーカーである*Brn3a*と*Brn3b*mRNAの発現量は処置後1日目から、網膜電図におけるRGC由来のpSTR振幅は3日目から、視神経周囲の網膜内層厚は10日目から有意に減少した。ラット視神経切断モデルにおいても、*Brn3a*、*Brn3b*のmRNA量が処置後1日目から、pSTR振幅が3日目から、逆行性フルオロゴールドでラベルされた生存RGC数が5日目から有意に減少した。ラット視神経切断後にBrimonidineを硝子体注

(書式12)

射したところ、2日後には、pSTRが無処置対照眼よりも処置眼で大きくなる振幅増大現象が認められた。この現象には *Bdnf* の mRNA 発現量の増加が伴っていた。次に、直接 BDNF を硝子体注射したところ、視神経切断処置の有無にかかわらず無処置対照眼と比べて pSTR の増大が認められた。さらに、BDNF パスウェイの阻害薬である K252a、U0126、LY294002 を Brimonidine と同時に硝子体注射したところ、pSTR の振幅増大現象は認められなかった。

【結論】

マウス視神経挫滅モデル、ラット視神経切断モデルにおいて、RGC の分子学的変化、電気生理学的変化、形態学的変化の順に障害の影響が認められた。ラットの視神経切断モデルでは、Brimonidine 硝子体投与により生存 RGC 数と RGC 由来の電気反応が増大した。これらのデータは、Brimonidine の RGC 軸索障害に対する神経保護作用を示唆するものである。

また、軸索障害の有無にかかわらず、Brimonidine の硝子体投与により RGC 由来の電気反応が増大した。その機序として、眼内 BDNF 濃度上昇による Trk レセプター、PI3K、MAPK シグナルの活性化が関与している可能性がある

審査結果の要旨

博士論文題目 動物視神経障害モデルにおける早期バイオマーカー及び神経保護薬効果の検討.....

所属専攻・分野名 医科学専攻 眼科学 分野

学籍番号 B2MD5129 氏名 雪田 昌克.....

緑内障は、本邦の失明原因の第一位を占める重要な網膜神経節細胞（Retinal Ganglion Cell：以下 RGC）の変性疾患である。RGC の細胞死に視神経での軸索障害が密接に関係していると考えられる。しかし、動物視神経軸索障害モデルにおいて、RGC 障害早期の病態を反映する *in vivo* バイオマーカーは未だ同定されていない。

そこで申請者は、マウスやラットの視神経軸索障害モデルにおける障害早期の病態を鋭敏に反映する *in vivo* バイオマーカーを探索し、微弱な光刺激に対する *in vivo* 網膜電氣的応答である Scotopic Threshold Response（以下 STR）を同定した。さらに、ラット視神経軸索障害モデルにおいて、眼圧下降薬である Brimonidine の神経保護効果を検出し、その保護効果のメカニズムの一端の解明にも寄与することにより、RGC 障害のバイオマーカーとしての STR の有用性を示した。

まず、マウスの視神経を露出させたあと、鑷子で同部位を挫滅することにより視神経軸索障害モデルを作製した。バイオマーカーとして、摘出網膜における RGC マーカーの遺伝子発現、STR、*in vivo* 光断層撮影による RGC 含む視神経周囲網膜内層厚を定量し、それぞれの障害後の経時的変化を調べた。その結果、1 日目に RGC マーカーの遺伝子発現量の減少、3 日目に STR の減少、10 日目に視神経周囲網膜内層厚の減少が障害後の変化として検出された。更に、ラットを用いた視神経軸索障害モデルでも同様の結果が得られた。このことより、STR が RGC 障害後早期の *in vivo* バイオマーカーとしての有用性が示された。

次に、ラット視神経軸索障害モデルにおける、Brimonidine の RGC に対する神経保護作用を STR を用いて評価した。片眼に Brimonidine を硝子体内注射した後に視神経軸索障害を誘導し、障害後 10 日目で生存 RGC を Fluorogold を用いて逆行性染色すると、シャム群に対して Brimonidine 投与群では、生存 RGC 数が有意に多く、同薬の神経保護効果が認められた。一方で、障害 2 日後には、Brimonidine 投与により、STR が無処置対照眼よりも処置眼でむしろ大きくなる振幅増大現象が障害後の早期変化として検出された。この現象には、神経保護作用のある *Bdnf* 遺伝子発現量の増加が伴っていた。そこで、直接 BDNF を硝子体内注射したところ、Brimonidine を投与した眼では、無処置対照眼と比べて STR の増大が認められ、同様な結果が得られた。更に、BDNF 経路の阻害剤である K252a（Trk レセプター阻害剤）、U0126（MAPK/ERK 阻害剤）、LY294002（PI3K 阻害剤）をそれぞれ Brimonidine と同時に投与し、STR を測定したところ、STR の振幅増大現象はキャンセルされた。これらのデータは、Brimonidine の STR の増大と RGC 保護作用が、BDNF パスウェイを介することを示唆するものであると考えられた。

本論文において、STR が、軸索障害による RGC の機能的変化を鋭敏に反映する、有用な *in vivo* バイオマーカーであることが示された。また、STR 測定は、侵襲が小さいため、同一個体で繰り返し評価できる大きな利点がある。したがって、本研究成果は、RGC に対する薬効評価に応用できる可能性があり、緑内障神経保護治療薬の開発に寄与するものであると考えられる。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文に十分値すると認める。