

氏 名（本籍）	鹿 野 哲 也 <small>か の てつ や</small>
学 位 の 種 類	博 士（医 学）
学 位 記 番 号	医 博 第 1 8 8 5 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 1 4 年 3 月 2 5 日
学 位 授 与 の 条 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 専 攻	東 北 大 学 大 学 院 医 学 系 研 究 科 （ 博 士 課 程 ） 外 科 学 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	脳由来神経栄養因子遺伝子導入虹彩色素上皮細胞 による神経網膜保護の研究

（ 主 査 ）

論 文 審 査 委 員	教 授 玉 井 信 教 授 佐 竹 正 延
	教 授 吉 本 高 志

論文内容要旨

虹彩色素上皮 (Iris Pigment Epithelium ; IPE) は、網膜色素上皮 (Retinal Pigment Epithelium ; RPE) と発生起源が同じであるため、様々な類似した機能をもつことが知られており、また容易に採取可能である。我々は、RPE の加齢性変化などのために重篤な視力障害を来す加齢黄斑変性に対し、RPE の代用として培養自己 IPE 移植を世界に先駆けて臨床応用し、その有効性を報告した。一方、脳由来神経栄養因子 (Brain-derived neurotrophic factor ; BDNF) は網膜虚血や、網膜光障害など様々な傷害に対して保護作用を有することが報告されている。IPE 移植をより広く臨床応用できることを目的として、我々はリポフェクション法にて BDNF 遺伝子をラット IPE に形質転換し、BDNF 遺伝子導入 IPE (BDNF-IPE) を作製した。そして、この BDNF-IPE における BDNF 発現、及び神経網膜保護効果を検討した。

BDNF-IPE における BDNF 遺伝子、タンパク質レベルでの発現を、それぞれ RT-PCR 法、及び sandwich ELISA 法を用いて計測し、継代各世代で比較検討した。遺伝子レベルでは遺伝子導入を行っていない IPE (N-IPE) と比べ、各世代で発現増大が認められた。継代の進行に伴う発現低下はみられなかった。また、タンパク質レベルにおいても発現増大がみられた。継代の進行に伴う発現低下はみられなかった。72 時間培養後の上清においては、N-IPE の約 30 倍の発現増大が認められた。

さらに、この BDNF-IPE の神経保護効果を *in vivo* と *in vitro* の両面から検討した。

In vitro では、ラットから網膜神経細胞を採取、分離し、NMDA 存在下で BDNF-IPE, N-IPE と共培養を行い、その保護効果をトリパングルー法で評価した。神経細胞生存率は NMDA 単独投与群 $66.6 \pm 9.07\%$ ($n=5$) に対し、BDNF-IPE 共培養群では、 $83.0 \pm 9.30\%$ ($n=5$) ($p=0.001$) と有意に高かった。これは選択的非競合 NMDA 受容体アンタゴニストである MK-801 添加群とほぼ同等 ($83.0 \pm 2.00\%$ ($n=5$)) であり、BDNF-IPE は生理活性をもつ十分な BDNF を産生していることが示された。一方、N-IPE 共培養群の生存率は $68.4 \pm 7.70\%$ ($n=5$) で BDNF-IPE 移植群と比べ低く、有意差も認められなかった。また、BDNF-IPE 共培養群に抗 BDNF 抗体を添加した群では、生存率 $77.6 \pm 8.41\%$ ($n=5$) であった。

一方 *in vivo* の実験として、BDNF-IPE、及び N-IPE をラット網膜下に移植、連続光暴露を行い、最も障害を受ける視細胞の生存率を示す指標として、外顆粒層 (Outer Nuclear Layer ; ONL) の厚さを計測し、神経網膜保護効果を評価した。移植はすべて眼球上側に経強膜的に 30 G 針を用いて行い、移植細胞 ($4 \times 10^4 / 2 \mu l$) は浮遊状態で使用した。通常の光条件下で 24 時間静置後、1 週間光連続暴露 (2,000–2,500 lux) を施行した。暴露終了後、眼球を摘出、パラフィ

ン包埋，3 μ m切片を作成し，H-E染色を行った。計測点は，すべて移植側で，視神経乳頭中央から網膜周辺部方向に600，700，800，1300，1400，1500，2000，2100，2200 μ mの9点とした。その結果，BDNF-IPE移植群はすべての計測点において基剤注入群に対しONLは厚く（18.630–23.1166 μ m），内7点で有意であった（ $p=0.03-0.002$ ）。さらにN-IPE移植群に対しても5点で有意に厚さが保持され，保護効果が非常に優れていることが示唆された。一方，N-IPE移植群のONL厚は，基剤注入群に比べ視神経乳頭近位では僅かに厚い程度であるが，遠位ではその差が大きくなった。これは，N-IPE移植群の保護効果が移植部位を中心に限局的であることが考えられた。基剤注入群でも対照群に比し，ややONL厚の増加が認められるのは，移植手技による機械的刺激が要因と考えられた。

以上より，IPEにBDNF遺伝子を導入し，安定してBDNF発現を増大させることに成功した。このBDNF-IPEは，*in vitro*及び*in vivo*ともに神経保護効果を有し，その効果はN-IPEと比べ有意であることを示した。

審査結果の要旨

虹彩色素上皮 (IPE) は、網膜色素上皮 (RPE) と発生起源が同じであるため、類似した機能をもつことが知られている。そこで RPE の加齢性変化などのために重篤な視力障害を来す疾患に対し、RPE の代用として培養自己 IPE 移植が試みられている。一方、脳由来神経栄養因子 (BDNF) は様々な傷害に対して神経保護作用を有することが報告されている。本研究は BDNF 遺伝子をラット IPE に形質転換し (BDNF-IPE) その発現、及び神経網膜保護効果を検討したものである。

BDNF-IPE における BDNF 遺伝子、タンパク質レベルでの発現を、それぞれ RT-PCR 法、及び sandwich ELISA 法を用いて計測し、継代各世代で比較検討した。遺伝子および蛋白質レベルでは遺伝子導入を行っていない IPE (N-IPE) と比べ、各世代で発現増大が認められ、継代の進行に伴う発現低下はみられなかったという。72 時間培養後の上清においては、N-IPE の約 30 倍の発現増大が認められた。さらに BDNF-IPE の神経保護効果を *in vivo* と *in vitro* の両面から検討した。*in vitro* では、ラットから網膜神経細胞を採取、分離し、NMDA 存在下で、BDNF-IPE、N-IPE と共培養を行い、その保護効果をトリパングルー法で評価した。その結果神経細胞生存率は NMDA 単独投与群 $66.6 \pm 9.07\%$ ($n=5$) に対し、BDNF-IPE 共培養群では、 $83.0 \pm 9.30\%$ ($n=5$) ($p=0.001$) と有意に高く、選択的非競合 NMDA 受容体アンタゴニストである MK-801 添加群とほぼ同等 ($83.0 \pm 2.00\%$ ($n=5$)) で、生理的に効果のある BDNF を産生していることが示された。一方、N-IPE 共培養群の生存率は $68.4 \pm 7.70\%$ ($n=5$) で BDNF-IPE 移植群と比べ低かった。また、BDNF-IPE 共培養群に抗 BDNF 抗体を添加した群では、生存率が $77.6 \pm 8.41\%$ ($n=5$) とやや低下した。

一方 *in vivo* で BDNF-IPE、及び N-IPE をラット網膜下に移植、連続光暴露を行い、最も障害を受ける視細胞の生存率、すなわち外顆粒層の厚さを計測したところ BDNF-IPE 移植群はすべての計測点において基剤注入群に対し厚く ($18.630-23.166 \text{ m}$)、内 7 点で有意であったという ($p=0.03-0.002$)。さらに N-IPE 移植群に対しても有意に厚さが保持され、保護効果が非常に優れていることが示唆された。このように IPE に BDNF 遺伝子を導入し、安定して BDNF 発現を増大させることにより BDNF-IPE は神経保護効果を有し、その効果は N-IPE と比べ有意であることを明らかにした。これらの研究は IPE の移植を臨床応用する場合のきわめて重要なデータであり、博士論文として十分な価値がある。