

氏 名	西 川 優 子
(ふ り が な)	(に し か わ ゆ う こ)
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 授 与 番 号	甲 第 号
学 位 審 査 年 月 日	平成 31 年 1 月 30 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学 位 論 文 題 名	Negative impact of AQP-4 channel inhibition on survival of retinal ganglion cells and glutamate metabolism after crushing optic nerve (AQP-4 チャンネルの阻害はグルタミン酸代謝を障害し視神経挫滅による網膜神経節細胞死を助長する)
論 文 審 査 委 員	(主) 教授 小 野 富 三 人 教授 菅 澤 淳 教授 黒 岩 敏 彦

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《緒言》

外傷性視神経障害は介達的に視神経損傷を来し、視神経の浮腫が増悪因子の一つと考えられている。浮腫軽減のためステロイドパルス療法が主に行われているが、偽薬と比較して有意な有効性はないという報告もあり、新たな治療法が求められている。脳浮腫の発生や改善に関しては、アストロサイトに発現する種々のアクアポリンの中で、特に quaporin-4 (AQP-4) が注目されている。ラット視神経挫滅モデルでは処置翌日に AQP-4 の発現が上昇するデータが得られていたことから、AQP-4 をターゲットにした治療の可能性が示唆された。

一方で、AQP-4 は水チャネル以外にグルタミン酸トランスポーターや Kir4.1 と macromolecular complex を形成していて、グルタミン酸代謝にも関与している。そのた

め、AQP-4 チャンネルを阻害すると細胞外グルタミン酸濃度が上昇し、神経興奮毒性が働く可能性が危惧された。このような背景から、今回ラット視神経挫滅モデルを用い、AQP-4 チャンネル阻害による視神経への影響を検討した。

《方法》

ラット視神経を露出し、眼球後端から 2mm の部位を鑷子で把持して、視神経軸索に障害を与えた。視神経挫滅直後に、AQP-4 チャンネル阻害薬である TGN-020 を腹腔内投与 (5.0ml/kg) した。対照として、溶媒である DMSO を投与した crush placebo 群、視神経の露出のみを行った sham control 群を設け、合計 3 群で比較検討した。処置 7 日後に安楽死させ、免疫組織学的に網膜神経節細胞 (RGC) 数をカウントした。またアポトーシスの指標となる Bax/Bcl-2 比を、real time PCR と western blot 法で評価した。また処置翌日に視神経および網膜を摘出し、組織内グルタミン酸濃度を、high performance liquid chromatography (HPLC) 法を用いて定量した。TGN-020 投与がグルタミン酸代謝関連蛋白に与える影響をみるため、視神経を処置 3 日後に摘出し、glutamine synthetase (GS) と glutamate aspartate transporter (GLAST)、AQP-4 の発現を western blot で定量した。さらに脳浮腫のモデルとしてラット急性水中毒モデルを作成し、TGN-020 の脳浮腫への効果を脳の含水率の変化で検討した。*in vitro* での実験系として、培養アストロサイトにグルタミン酸を暴露し、TGN-020 投与による AQP-4 と glial fibrillary acidic protein (GFAP) の発現変化を、western blot と蛍光免疫染色で確認し、培養液中のグルタミン酸、グルタミン濃度を測定し、グルタミン酸処理への影響を確認した。

《結果》

TGN-020 の投与は、挫滅後の RGC 数と Bax/Bcl-2 比の両指標から、神経障害的に作用していた。crush 後には視神経グルタミン酸濃度が増加し、グルタミン酸関連代謝蛋白 (GS、GLAST) の発現も亢進することが確認された。これに対し TGN-020 投与で、グルタミン酸関連代謝蛋白の発現は逆に抑制された。水中毒ラットで脳浮腫での含水率は有意に増加

し、TGN-020 投与により有意に減少した。培養アストロサイトでも同様に、グルタミン酸暴露で AQP-4、GFAP の発現は増加し、TGN-020 投与により AQP-4 の発現が抑制され、グルタミン酸からグルタミンへの変換が抑制された。

《考案》

今回の検討により、AQP-4 チャンネル阻害により、水中毒モデルでは脳浮腫の軽減が確認されたが、視神経損傷に対しては、神経保護作用が認められないことが示された。その因子の一つとして、外傷後に上昇するグルタミン酸毒性が関与していると考えられた。外傷後 AQP-4、グルタミン酸代謝関連蛋白 (GS, GLAST) の発現は亢進したが、TGN-020 投与により、これらの発現は有意に抑制された。そのためグルタミン酸のアストロサイト内への取り込みが低下して、細胞外グルタミン酸濃度が上昇し、グルタミン酸毒性による神経障害が進行したと考えられた。*in vitro* の実験系においては、グルタミン酸暴露により培養視神経アストロサイトで AQP-4 の発現が増加し、TGN-020 投与で抑制されることを確認した。また培養アストロサイト、ミュラー細胞の両培養系で、AQP-4 チャンネル阻害により培養液中のグルタミン酸濃度が上昇し、グルタミンへの変換率が低下した。以上より AQP-4 チャンネルの阻害によりグルタミン酸のアストロサイト、ミュラー細胞への取り込みが低下し、細胞外グルタミン酸濃度が上昇することが *in vitro* の系においても示された。TGN-020 投与で視神経浮腫は軽減する可能性はあるが、AQP-4 チャンネルはグルタミン酸代謝に深く関与しており、同チャンネルブロックすると細胞外グルタミン酸濃度が上昇し、逆に神経障害が助長される可能性が示唆された。AQP-4 は脳浮腫の治癒過程にも関与していることが報告されており、今後 AQP-4 を発現亢進した際の神経保護作用に関しても検討していく必要がある。

論文審査結果の要旨

本研究により、AQP-4 チャンネル阻害による網膜神経保護作用は認められないことが示され、その原因の一つとしてグルタミン酸が関与していることが明らかになった。

ラット視神経挫滅モデルを作成し AQP-4 阻害薬である TGN-020 投与後の RGC 数、Bax/Bcl-2 比を測定し神経保護作用があるか否かを検討した。また、神経興奮毒性を有するグルタミン酸濃度、グルタミン酸関連蛋白(GS、GLAST)、AQP-4 の発現についても検討した。脳浮腫のラットモデルを作成し TGN-020 の脳浮腫への効果を脳の含水率を算出し検討した。*in vitro* の実験系では、グルタミン酸に暴露した培養アストロサイトで、TGN-020 投与による AQP-4 と GFAP の発現への影響を確認し、また、TGN-020 のグルタミン酸処理への影響を確認した。TGN-020 の投与は、挫滅後の RGC 数と Bax/Bcl-2 比の両指標で、神経障害的に作用した。*crush* 後視神経グルタミン酸濃度は増加し、グルタミン酸関連代謝蛋白 (GS、GLAST) の発現も亢進することが確認された。これに対し、TGN-020 投与でグルタミン酸関連代謝蛋白の発現は逆に抑制された。脳浮腫での含水率は TGN-020 投与で有意に低下した。培養アストロサイトでも同様に、グルタミン酸暴露で AQP-4、GFAP の発現は増加し、TGN-020 投与により AQP-4 の発現が抑制され、グルタミン酸からグルタミンへの変換も抑制された。以上より AQP-4 チャンネル阻害により、脳浮腫は軽減するが、グルタミン酸関連蛋白の発現が低下し、細胞外グルタミン酸濃度が上昇することで、神経障害が助長される可能性が示唆された。したがって、AQP4 チャンネルを介した視神経浮腫の治療には、グルタミン酸毒性の観点から、否定的な結果が得られた。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条第 1 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Experimental Eye Research 146: 118-127, 2016