

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
小林 崇俊	主査 教授 池田 恒彦 副査 教授 林 秀行 副査 教授 花房 俊昭 副査 教授 宮崎 瑞夫 副査 教授 古谷 榮助
主論文題名 Advanced glycation end products induce death of retinal neurons via activation of nitric oxide synthase (蛋白糖化最終産物は一酸化窒素合成酵素の活性化を介して網膜神経細胞死を惹起する)	
学位論文内容の要旨	
<p>《研究の目的》</p> <p>蛋白糖化最終産物(以下AGEs)は糖尿病や加齢に伴い種々の臓器に集積することが知られている。眼科領域においても、AGEsの全身投与により血管基底膜の肥厚や白血球粘着能の亢進、血液網膜関門の破壊などが観察され、AGEsは糖尿病における網膜循環障害の一因として注目されている。一方、AGEsと神経細胞の関連性も注目されつつあり、例えばAlzheimer病では、老人斑や神経原線維変化にAGEsが沈着していることが確かめられている。しかしながら、AGEsの網膜神経細胞に対する作用については明らかにはされていない。本研究では、AGEsが主としてアマクリン細胞から構成される培養網膜神経細胞に対して神経毒性を有し、その機序の一つとして一酸化窒素が関与していることを明らかにした。</p> <p>《材料と方法》</p> <p>在胎日数19日の胎児Wistarラットから網膜を摘出し、可能な限り単細胞になるまで分離して、10日間分化培養(1.0×10⁶cells/ml)し、実験に使用した。この培養系では、ほぼ全ての神経細胞はアマクリン細胞のマーカーであるsyntaxin-1を持ち、アマクリン細胞からなる培養系であると考えられる。アマクリン細胞は網膜の主要な一酸化窒素(NO)産生源である。</p> <p>検討項目として、AGEs(0.5mg/ml)による神経毒性の時間依存性(2、6、24、48時間曝露で検討)、および用量依存性(0.02、0.1、0.5mg/mlで24時間曝露)を検討した。神経毒性の程度はトリパンブルー排出能による細胞生存率により評価した。さらにAGEsの神経毒性に一酸化窒素合成酵素(以下NOS)が関与していることを検討するため、NOSの阻害剤であるNG-nitro-L-arginine methyl ester(以下L-NAME)の細胞死に対する効果を検討し、AGEsによる培養上清中の亜硝酸値の変化をhigh-performance liquid chromatography (HPLC)を用いて定量した。</p> <p>また免疫組織化学的手法を用い、培養網膜神経細胞にAGEsの特異的な受容体であるRAGE(Receptors for AGEs)の存在を確認し、AGEsが神経細胞で3-nitrotyrosineの発現を亢進させるか否かを検討した。3-nitrotyrosineは一酸化窒素由来の毒性物質であるペルオキシ亜硝酸生成のマーカーである。さらにAGEsの神経毒性にアポトーシスが関与していることを検討するため、caspase-3の免疫組織化学染色とTUNEL assayを施行した。</p>	

《結果》

培養網膜神経細胞はRAGEに対する免疫組織化学染色で濃染され、本研究で使用した神経細胞にRAGEが発現していることが認められた。AGEsは時間依存的かつ用量依存的に網膜神経細胞死を惹起した。NOS阻害剤であるL-NAMEは有意にAGEsによる神経細胞死を抑制した。

またAGEsはcaspase-3の発現を亢進させ、L-NAMEはその発現を有意に抑制した。さらにTUNEL染色でも、AGEsによるTUNEL陽性細胞の増加が、L-NAMEにより抑制された。以上のことから、AGEsによる神経細胞死の少なくとも一部はアポトーシスを介して生じ、その過程でNOSが関与していると考えられた。実際に網膜神経細胞ではAGEs曝露により3-nitrotyrosineの発現が亢進しており、細胞死にNOとペルオキシ亜硝酸の関与が強く示唆された。これをさらに支持する所見として、細胞培養上清中の亜硝酸値がAGEsにより上昇することが確認された。

《考察》

本研究から、AGEsはNOSの活性化を介して神経細胞死を惹起すると考えられた。すなわち、AGEsの網膜神経細胞に対する神経毒性が明らかになり、AGEsが糖尿病網膜症における神経細胞障害に直接的に関与している可能性が示唆された。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	乙 第 号	氏 名	小林崇俊
論文審査担当者		主 査 教授 池 田 恒 彦 副 査 教授 林 秀 行 副 査 教授 花 房 俊 昭 副 査 教授 宮 崎 瑞 夫 副 査 教授 古 谷 榮 助	
主論文題名 Advanced glycation end products induce death of retinal neurons via activation of nitric oxide synthase (蛋白糖化最終産物は一酸化窒素合成酵素の活性化を介して網膜神経細胞死を惹起する)			
論文審査結果の要旨			
<p>蛋白糖化最終産物(AGEs)は糖尿病網膜症などの眼科領域のみならず、腎症、神経障害などの糖尿病合併症や動脈硬化などの加齢現象に伴い、組織中に蓄積されることが知られており、各種疾患を惹起する可能性のある重要な物質の一つとして認識されている。また、一酸化窒素合成酵素(NOS)は様々な生理作用に関与しているが、過剰に一酸化窒素(NO)が発生すると、組織障害につながる事が知られている。</p> <p>申請者は、胎児ラットから得た培養網膜神経細胞を使用してAGEsが時間依存的、用量依存的に神経細胞に及ぼす作用について検討し、AGEsが神経細胞死を惹起していることを明らかにした。また、神経細胞死の一因としてNOSが関与していると推定して実験を行い、NOSの関与をNOS阻害剤による細胞死の抑制、免疫組織化学的手法によるnitrotyrosineの検出、培養上清でのnitriteの増加など様々な側面から明らかにした。さらに、細胞死の一部にアポトーシスが関与していることも明らかにした。</p> <p>申請者は本研究において、今まであまり知られていなかったAGEsの網膜神経細胞に対する神経毒性を明らかにし、その機序にNOSが関与していることを明らかにした。本研究結果は糖尿病網膜症における神経障害にAGEsが関与していることを示唆する重要な研究であると考えられる。</p> <p>以上により、本論文は本学大学院学則第9条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。</p> <p>(主論文公表誌) Experimental Eye Research 81: 647-654, 2005</p>			