

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
佐藤孝樹	主査教授 朝日通雄 副査教授 林秀行 副査教授 黒岩敏彦 副査教授 窪田隆裕
主論文題名 Effect of Hypoxia on Susceptibility of RGC-5 Cells to Nitric Oxide (一酸化窒素による RGC-5 細胞の感受性に対する低酸素の影響)	
学位論文内容の要旨	
《目的》 一酸化窒素 (NO)には神経保護および傷害作用の二面性があることが知られている。循環改善を期待して NO 供与体が開発される一方で、網膜虚血時には一酸化窒素合成酵素 (NOS) 阻害剤の有効性が示されており、虚血網膜に対する NO の効果については、依然明らかにされていない。NO は酸素と競合してヘム蛋白である Cytochrome Oxidase に結合し、ミトコンドリアの呼吸鎖を阻害することから、酸素濃度により NO の傷害性に差がでる可能性が考えられる。今回われわれは、NO の培養網膜神経細胞に対する傷害性と酸素濃度の関連について検討した。 《方法》 網膜神経節細胞株である RGC-5 細胞を、1.生理的酸素(20%):グルコース (5.5mM)、2.生理的酸素:グルコース除去、3.低酸素 (1.0%) : 生理的グルコース、	

4. 低酸素: グルコース除去の各環境で培養し、NO 発生化合物である S-nitroso-N-acetyl-penicillamine (SNAP) (0.1、1.0、10、100 μ M を添加して、その細胞傷害を検討した。

細胞死の評価には、WST-8 assay を用いた評価、annexin V およびヨウ化プロピジウムによる二重染色による FACS 解析、DNA 含量の解析、および ATP 測定を行なった。また、ミトコンドリア膜電位と細胞内 superoxide, peroxynitrite の発生、カスパーゼ活性の変化についても検討した。

《結 果》

WST-8 assay において、正常酸素下ではグルコースの有無にかかわらず、SNAP は有意な細胞傷害性を示さなかった。一方、低酸素下では SNAP (100 μ M は有意な細胞死を惹起した。annexin V の結合、DNA 含量、および ATP 濃度などの解析から、低酸素下での細胞死の形態は、生理的グルコースではアポトーシス、グルコース除去の状態ではネクローシスを主体とした細胞死と考えられた。

低酸素: 生理的グルコースの環境でみられた SNAP (100 μ M によるアポトーシスは、ミトコンドリア膜電位の低下、カスパーゼの活性化、細胞内 superoxide、peroxynitrite の増加を認め、NO は低酸素下でミトコンドリア機能を強く障害すると考えられた。これを支持する所見として、シクロスポリン A、TEMPOL、Z-VAD-FMK の添加で、SNAP による細胞死は抑制された。より低濃度の SNAP (0.1-10 μ M の効果も検討したが、低酸素: 生理的グルコースでは、低濃度でもミトコンドリア膜電位の低下と、細胞内 ATP レベルの低下が認められた。

《結 論》

これらの結果より、NOは虚血網膜で投与された場合、神経細胞に対してはその傷害性が強まる可能性があると考えられた。近年開発されたNO供与体を含む点眼薬は、血流量を増加させ神経保護を発揮する可能性が期待されている。しかし代謝の盛んな網膜では、低酸素状態に陥りやすく、NOがミトコンドリアのさらなる機能障害をもたらし、逆に神経細胞死を増強する可能性に留意する必要があると考えられた。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	乙第	号	氏名	佐藤孝樹
論文審査担当者			主査教授 朝日通雄	
			副査教授 林秀行	
			副査教授 黒岩敏彦	
			副査教授 窪田隆裕	
主論文題名				
Effect of Hypoxia on Susceptibility of RGC-5 Cells to Nitric Oxide (一酸化窒素による RGC-5 細胞の感受性に対する低酸素の影響)				
論文審査結果の要旨				
<p>一酸化窒素 (nitric oxide , NO) は中枢神経系において、血流制御、神経伝達などの重要な生理機能を担っている。その作用が血管、神経細胞、グリア細胞など様々な組織におよぶため、虚血網膜に対する NO の作用は複雑で、循環改善を期待して NO 供与体が開発される一方で、網膜虚血時には一酸化窒素合成酵素(nitric oxide synthase, NOS)阻害剤の有効性が示されている。このように虚血網膜に対する NO の効果が実験レベルでも異なる原因として、in vivo での実験系では血管、神経細胞、グリア細胞など種々の組織に対する NO の作用が複雑に関与しているためと考えられる。この問題を解決するため、申請者は網膜虚血時に最も傷害されやすい網膜神経節細胞の cell line である RGC-5 を用いて、低酸素-糖除去の in vitro 虚血モデルをはじめ、低酸素-生理的糖濃度、20%酸素-糖除去などの培養条件を用い、NO の神経細胞に対する反応がどのように変化するかを検討した。</p> <p>その結果、NO は低酸素下では神経細胞に対して傷害的に作用し、その機序としてミトコンドリアの機能障害が生じることを明らかにした。低酸素下で傷害性が強まる原因として、NO は酸素と競合してヘム蛋白である Cytochrome Oxidase に結</p>				

合する点から、低酸素濃度では NO が Cytochrome Oxidase に結合しやすくなり、ミトコンドリアの呼吸鎖をより強く阻害する可能性を考察している。その結果、ミトコンドリアの膜電位は低下し、活性酸素、ペルオキシ亜硝酸の発生が増加するが、低酸素時に NO が神経細胞の酸化還元状態を変化させるという知見は新しい。また虚血網膜に対する NO 供与体の投与は、少なくとも神経細胞に対する直接作用としては、神経傷害を促進させる可能性を実験的に示したもので、臨床的にも重要であると考えられる。

以上により、本論文は本学学位規程第 3 条第 2 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）

Investigative Ophthalmology & Visual Science 51(5): 2575-2586, 2010