

氏 名	戸 成 匡 宏
(ふりがな)	(となり まさひろ)
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 25 年 1 月 12 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	Blocking Endothelin-B Receptors Rescues Retinal Ganglion Cells from Optic Nerve Injury through Suppression of Neuroinflammation (ETB 受容体拮抗剤は、炎症抑制を介し、視神経傷害による網膜神経節細胞死を抑制する)
論文審査委員	(主) 教授 朝 日 通 雄 教授 宮 武 伸 一 教授 窪 田 隆 裕

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《目 的》

endothelin-1 (ET-1) は強力な血管収縮ペプチドであるが、中枢神経系においては ET-1 を介したシグナル伝達系が存在する。アストロサイトは視神経を含む中枢神経系における主要なグリアであるが、ET-1 はアストロサイトを活性化しグリア瘢痕を形成し、局所での変性に深く関与している。ラット視神経挫滅モデルは、しばしば、視神経および網膜の変性過程を調べるために使用され、網膜神経節細胞は逆行性にアポトーシスに陥る。ET-1 の受容体には ETA・ETB 受容体が存在するが、これらの受容体拮抗剤を用いて ET-1 のシグナル伝達を阻害することで、グリア瘢痕の形成を抑制し、視神経保護作用を発揮する可能性につき検討した。

《方 法》

ラット球後視神経を露出し、ETA 受容体拮抗剤である BQ123(1.0 μ M)、ETB 受容体拮抗剤である BQ788(1.0 μ M)、対照として PBS を、マイクロスポンジを介して 15 分間浸潤させた。その後、球後 2mm の部位で視神経を鑷子で 10 秒間把持し、視神経を挫滅した。挫滅後 7 日で挫滅部を含む視神経を摘出し、ETA・ETB 受容体発現の変化を real-time PCR 法で定量し、発現の局在を、免疫組織化学的手法を用いて検討した。同様に ET-1、CD68 (マクロファージ・ミクログリアのマーカー)、GFAP (アストロサイトのマーカー)、TNF- α 、iNOS (inducible nitric oxide synthase)の発現を real-time PCR 法および免疫組織化学的手法を用いて評価した。さらに、ET-1 受容体拮抗剤の神経保護作用を、挫滅後 7 日に網膜神経節細胞数を測定し評価した。

《結 果》

挫滅後 7 日で、視神経には、ETB 受容体優位の発現亢進がみられた。免疫組織化学的に、挫滅部には ETB 受容体陽性細胞の集積がみられ、これらの細胞は CD68 陽性で、マクロファージ・ミクログリアの遊走が生じていると考えられた。また CD68 陽性細胞は、ET の免疫活性も示し、挫滅部の遊走細胞は ET 分泌能を有していると考えられた。一方挫滅部では GFAP の免疫活性は弱く、挫滅部周囲で GFAP の発現は亢進していた。GFAP 陽性細胞の一部は、PCNA 陽性で、アストロサイトは挫滅部周囲で活性化され、肥大化、増殖していると考えられた。Real-time PCR 法での解析では、挫滅後 7 日の視神経には ET-1 (4.5 倍)、CD68(87.5 倍)、GFAP(2 倍) の遺伝子発現亢進が見られ、さらに局所炎症に關与する TNF- α (490 倍) および iNOS(6 倍) 遺伝子の発現亢進も認められた。BQ788 を前投与すると、視神経での ET-1、CD68、GFAP、TNF- α 、iNOS の遺伝子発現は有意に抑制され、網膜神経節細胞数の減少も有意に抑制された。一方、ETA 受容体拮抗剤である BQ123 の効果は、BQ788 より劣っており、網膜神経節細胞に対する保護作用は有意でなかった。これらの結果から、視神経挫滅部にはマクロファージ・ミクログリアが遊走して ET-1 を分泌し、それを受けてアストロサイトの活性化と、局所炎症が生じる機序が考えられた。ETB

受容体の抑制は、マクロファージ・ミクログリアの遊走や ET-1 分泌を抑制し、さらにアストロサイトの活性化、局所炎症を抑制することで、神経保護作用を発揮すると考えられた。

《考 案》

最近、中枢神経系の外傷、虚血、神経変性疾患などで、マクロファージ・ミクログリアなどの免疫担当細胞の遊走が生じ、神経変性過程に深く関与していることが明らかにされつつある。視神経を挫滅すると、アストロサイトは活性化され、最終的にグリア瘢痕を形成するが、その過程は現在まで明らかにされていない。本研究で免疫組織化学的手法にて検討した結果、挫滅部では ETB 受容体陽性細胞の集積がおこる一方、挫滅部周囲では、GFAP の免疫活性が亢進しアストロサイトの肥大および増殖が生じていると考えられた。挫滅部に集積した ETB 受容体陽性細胞は CD68 陽性で、さらに ET-1 に対して免疫活性を示したことから、挫滅部にはマクロファージ・ミクログリアが遊走し、これらが ET-1 を分泌しているものと推察した。Real-timePCR 法で検討した結果、挫滅後の視神経における ET-1、CD68、GFAP、および局所での炎症に関与する TNF- α や iNOS の遺伝子発現はすべて亢進していたが、BQ788 投与では遺伝子発現上昇は有意に抑制され、網膜神経節細胞数の減少も抑制された。以上の結果から、挫滅部に集積し、ETB 受容体を発現したマクロファージ・ミクログリアが ET-1 を分泌し、アストロサイトの活性化、マクロファージ・ミクログリアの遊走促進、TNF- α や iNOS の発現上昇を引き起こすことが明らかになった。これらの一連の反応は、視神経挫滅部におけるグリア細胞と炎症性サイトカインとの間の paracrine loop の存在を示し、炎症反応の中心機構としての役割を担っていることが考えられた。さらに、ETB 受容体遮断により、視神経挫滅時の炎症性サイトカインの発現を抑制し、TNF- α や NO による軸索変性に伴った網膜神経節細胞死を抑制することができた。したがって、ET-1、ETB 受容体、グリア細胞を介した炎症反応機構をさらに解明し制御することは、新規の神経保護治療として期待できる。

論文審査結果の要旨

中枢神経の外傷、虚血、神経変性疾患などで、主要なグリアであるアストロサイトが endothelin-1(ET-1)により活性化され、グリア瘢痕が生じ局所での変性に深く関与していることが知られている。しかし、これまでの研究では、視神経を挫滅することによるアストロサイト活性化の詳細な機序は明らかにされていない。そこで、申請者は視神経挫滅モデルを用いて、まず挫滅部周囲での ETA・ETB 受容体の発現の変化を real-timePCR 法で定量し、その発現を免疫組織学的手法を用いて検討した。また、ETB 受容体拮抗剤である BQ788 が、ET-1、マクロファージ・ミクログリア、アストロサイトの発現に与える影響を免疫組織学的手法を用いて検討し、さらに局所での炎症に関与する TNF- α 、iNOS の発現の変化への影響を real-timePCR 法にて定量した。また、挫滅後に網膜神経節細胞数を測定し、ET-1 受容体拮抗剤の神経保護作用を評価した。その結果、免疫組織学的検討では、挫滅部においてマクロファージ・ミクログリアが遊走し、ET-1 を分泌していること、また分泌された ET-1 が挫滅部周囲のアストロサイトを活性化し、肥大、増殖していることを明らかにした。また、Real-timePCR 法による結果では、挫滅後の視神経における ET-1、マクロファージ・ミクログリア、アストロサイト、および TNF- α 、iNOS の遺伝子発現はすべて亢進していたが、BQ788 投与により遺伝子発現上昇は有意に抑制されることを示した。さらに、挫滅後の視神経における網膜神経節細胞数の測定により、BQ788 による網膜神経節細胞の保護効果も明らかにした。

本研究は、視神経障害に深く関わっている ET-1 が、マクロファージ・ミクログリアで産生され、アストロサイトを活性化することを明らかにし、さらに、活性化されたアストロサイトがミクログリアからの TNF- α 、iNOS の誘導を惹起する可能性を示している。また、挫滅後の網膜神経節細胞に対する保護効果が BQ788 投与で認められたことより、ET-1、ETB 受容体、グリア細胞を介した炎症反応機構を制御することは、今後新規の神経保護治療として期待できる。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 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。

(主論文公表誌)

Investigative Ophthalmology & Visual Science 53(7): 3490-3500, 2012