

氏 名	森 下 清 太
(ふりがな)	(もりした せいた)
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27年7月29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	Systemic simvastatin rescues retinal ganglion cells from optic nerve injury possibly through suppression of astroglial NF- κ B activation (シンバスタチンの全身投与は視神経損傷においてNF- κ Bの抑制を介して網膜神経節細胞を保護する)
論文審査委員	(主) 教授 朝 日 通 雄 教授 木 村 文 治 教授 廣 瀬 善 信

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《目 的》

中枢神経が様々な原因で損傷を受けると、アストロサイトは活性化し炎症反応を惹起する。その過程でNF- κ Bが転写因子として働き、ケモカイン、炎症性サイトカインの産生、炎症細胞の遊走をもたらし、神経傷害を助長する。スタチンはNF- κ Bの活性化を抑制する可能性が示唆され、炎症を抑制し神経保護的に作用することが期待される。視神経および網膜の神経変性過程の研究で使用される、視神経挫滅モデルを用いて、スタチンの炎症抑制作用、神経保護作用を検討した。

《方 法》

動物種としてWistar rat (雄) を使用した。視神経を挫滅する1週間前に皮下に浸透圧

ミニポンプを挿入し、シンバスタチンおよびその溶解液のみ（コントロールとして）を全身投与した。挫滅3日後に視神経で生じる炎症反応を、免疫組織化学的に検討し、**realtime PCR** で炎症関連遺伝子の発現を定量的に評価した。

視神経軸索の逆行性変性で生じる網膜神経節細胞(**retinal ganglion cell; RGC**)死は、挫滅7日後に網膜伸展標本を作製し、**Tuj-1** 染色で定量した。さらに視神経アストロサイトの培養系を用いて、**TNF- α** による **NF- κ B** の活性化と、シンバスタチンによる抑制作用を検討した。

《結 果》

視神経挫滅3日後に施行した視神経の免疫染色では、**CD68** 陽性細胞であるミクログリア/マクロファージが挫滅部に集積していた。**NF- κ B** のリン酸化は、挫滅部と健常部の境界部位のアストロサイトで確認された。また同部位では、**MCP-1** の発現が認められた。これらの変化はシンバスタチンで抑制されるのが確認された。**real time PCR** による評価では、挫滅後、**CD68**、**MCP-1**、**ET-1**、**GFAP**、**TNF- α** 、**iNOS** などの炎症関連遺伝子がいずれも増加していた。シンバスタチン投与群では、これらの発現亢進が有意に抑制されていた。**in vitro** の実験では、シンバスタチンが **TNF- α** による **NF- κ B** の活性化を抑制することが確認された。

《考 察》

視神経挫滅部での **CD68** 陽性細胞と挫滅周辺部の **MCP-1** の発現はシンバスタチンの全身投与により抑制されることが示された。シンバスタチンの全身投与は **NF- κ B** のリン酸化と同様に、**CD68**、**MCP-1**、**ET-1**、**GFAP**、**iNOS**、**TNF- α** などの炎症関連遺伝子の発現を抑制した。**in vitro** の結果でも、シンバスタチンは **TNF- α** による視神経アストロサイトの **NF- κ B** 活性化を抑制していた。

アストロサイトの **NF- κ B** 活性化は、挫滅部の辺縁でおこり、その部分は **MCP-1** も発現

していた。したがって NF- κ B の活性化は、MCP-1 などのケモカインを誘導すると考えられた。シンバスタチンの全身投与は、アストロサイトの NF- κ B の活性化を抑制し、ケモカインの産生を抑制し、さらに ET-1、GFAP、TNF- α や iNOS などの炎症関連遺伝子の発現を抑制した。これらの結果から、シンバスタチンはアストロサイトやミクログリア/マクロファージの活性化と、それに続く炎症反応のカスケードを抑制し、結果的に視神経での炎症反応を抑制することで、RGC を保護している可能性が考えられた。

スタチンは HMG-CoA レダクターゼを阻害し、メバロン酸代謝物を減少させ、RAS や Rho ファミリーなどの低分子 G タンパク質の産生を抑制する。メバロン酸を添加するとシンバスタチンによる NF- κ B の活性化抑制効果が減弱した。したがって、シンバスタチンは低分子 G タンパク質の産生を抑制し抗炎症作用を発揮している可能性が示唆された。実際に、RASp21 は NF- κ B を活性化する Raf-1 の活性化に必須である。また、Rho は NF- κ B を活性化することが知られている。したがって、シンバスタチンの全身投与で RGC が保護された機序として、シンバスタチンが低分子 G タンパク質の産生を抑制し、結果的にアストロサイトの NF- κ B を抑制した可能性が考えられた。

論文審査結果の要旨

HMG-CoA 還元酵素阻害剤であるスタチンには、コレステロール生成の抑制以外に、**pleiotropic effects** とよばれる作用が報告されている。今回、申請者は視神経挫滅モデルのラットにおいて、シンバスタチンの神経保護作用を検討している。

まず、視神経挫滅により生じる変化を免疫染色にて示し、シンバスタチンを全身投与した群と比較することでその神経保護作用を示した。次いで、炎症関連遺伝子について **real time PCR** を用いて検討し、シンバスタチン投与による神経炎症の抑制作用を示した。

培養アストロサイトを用いた検討では、**TNF- α** の添加による **NF- κ B** 活性化に対するスタチンの影響を検討した結果、シンバスタチン投与により、**TNF- α** による **NF- κ B** の活性化が有意に抑制された。したがって、シンバスタチンは **NF- κ B** の活性化抑制を介し、その下流で活性化されるケモカインやサイトカイン誘導を抑制し、神経炎症を抑制することで神経保護的に働く機序を示した。

申請者は今回の研究において、視神経挫滅時の神経炎症がシンバスタチン投与により抑制されることを示し、**in vitro** では **NF- κ B** を介して神経保護作用を有する可能性を示した。視神経挫滅モデルでみられる変化は、緑内障などの神経炎症と類似していることより、脳血液関門を通過するシンバスタチンが有力な神経保護薬となる可能性があると考えられる。

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)

PLoS One 9(1): e84387. 2014 Jan 2

doi: 10.1371/journal.pone.0084387.