

氏名・（本籍）	じん だい すけ 神 大 介 （北海道）
専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	医博乙第592号
学位授与の日付	平成26年3月27日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題名	Involvement of Nitric Oxide In Simulated Retinal Ischemia (疑似虚血を誘導した網膜における一酸化窒素の役割の解明)
論文審査委員	(主査) 教授 尾野 恭 一 (副査) 教授 石川 和 夫 教授 今 井 由美子

学位論文内容要旨

論文題目

疑似虚血を誘導した網膜における一酸化窒素の役割の解明

申請者氏名 神 大介

研究目的

中枢神経系におけるグルタミン酸興奮毒性においては、2種類のグルタミン酸受容体（NMDA受容体とnon-NMDA受容体）の異常興奮が関与することが知られている。中枢神経系に虚血がおこるとNMDA受容体の異常興奮がおこり、ついで一酸化窒素（NO）が発生し、神経細胞を破壊する。これらの結果、中枢神経系では、NO合成酵素（NOS）阻害薬による神経保護に関する多くの報告が行われた。しかし、虚血網膜について、NMDA受容体のみでグルタミン酸興奮毒性が誘導されるのか、non-NMDA受容体も関与するのか、は明らかになっていない。さらに、NO発生とNMDA受容体との関与も、不明である。

本研究では、疑似虚血を誘導したラット網膜分離標本（ex vivo 網膜標本）に、2種類のグルタミン酸受容体拮抗薬（MK-801, GYKI）、およびNO合成酵素（NOS）阻害薬を組み合わせ投与し、疑似虚血網膜におけるグルタミン酸興奮毒性の発症機序とNOの関与について検討する。

研究方法

生後30日齢のSprague-Dawleyラットを用いて、ex vivo 網膜標本を作製した。ブドウ糖を除去した培養液中にex vivo 網膜標本を沈め、95%窒素-5%二酸化窒素の混合ガスでバブリングすることによって、ex vivo 網膜標本に疑似虚血を誘導した。疑似虚血を誘導した網膜におけるNOの役割を調査するため、NOS阻害薬を、2種類のグルタミン酸受容体拮抗薬（MK-801, GYKI）と組み合わせ、培養液中に投与した。さらに、NOドナーも培養液中に投与して、網膜の変化を組織学的・形態学的に検討した。

研究成績

疑似虚血を誘導した網膜では、網膜全層に様々な程度の傷害を認めたが、特に、神経節細胞層と内顆粒層における顕著な細胞変性と内網状層の腫脹が、特徴として認められた。疑似虚血による網膜の傷害は顕微鏡による鏡検ならびにLDHにより評価し、コントロールが 5 ± 4 U/mg、虚血網膜は 206 ± 59 U/mg、虚血+MK801は 204 ± 69 U/mg、虚血+GYKIは 189 ± 45 U/mgであった。虚血網膜にMK801とGYKI同時投与だと 82 ± 32 U/mgと抑制された。

同様に、疑似虚血による網膜の傷害は、神経型NOS阻害薬をGYKIと同時に投与することによって、 75 ± 45 U/mgと抑制することができた。しかし、NOドナーをMK-801およびGYKIと共に疑似虚血網膜に同時投与すると、神経保護効果は認められなかった。これは、NOドナーの傷害作用が、グルタミン酸受容体拮抗薬の神経保護作用を凌駕したためと考えられた。

結論

疑似虚血における網膜傷害においては、2種類のグルタミン酸受容体（NMDA受容体とnon-NMDA受容体）の異常興奮が関与した。NOはNMDA受容体活性化後に、NOSによって発生した。non-NMDA受容体拮抗薬とNOS阻害薬を投与することにより、虚血網膜における神経保護を得られる可能性が示された。また、グルタミン酸興奮毒性が薬理的に抑制されていても、NOドナー投与によって、網膜傷害が誘導される危険性が示された。

学位(博士一乙)論文審査結果の要旨

主査：尾野 恭一

申請者：神 大介

論文題名： **Involvement of nitric oxide in simulated retinal ischemia**
(擬似虚血を誘導した網膜における一酸化窒素の役割の解明)

要旨

著者の研究は、擬似虚血を誘導したラット網膜標本を用い、グルタミン酸受容体及び一酸化窒素合成酵素の作用を組織学的・生化学的・薬理的に測定したものである。その結果、1) 擬似虚血を誘導した網膜では網膜全層に様々な程度の傷害を認め、とりわけ神経節細胞層と内顆粒層における細胞変性、内網状層の腫脹が顕著であった。2) 擬似虚血による形態的变化は網膜 LDH の上昇を伴っていた。3) 擬似虚血による網膜傷害は神経型 NOS 阻害薬と非 NMDA 型グルタミン酸受容体拮抗薬を同時投与することにより著明に抑制された。4) グルタミン酸受容体拮抗薬の神経保護効果は NO ドナーを投与することにより消失した。以上により、擬似虚血による網膜傷害においては、NMDA 型及び非 NMDA 型グルタミン酸受容体が関与していることが明らかとなった。NMDA 受容体活性化は NOS による NO 産生をもたらす、神経細胞傷害をもたらすと考えられる。非 NMDA 型グルタミン酸受容体拮抗薬と NOS 阻害薬を投与することにより、虚血網膜における神経保護を得られる可能性が示唆された。

本論文の斬新さ、重要性、研究方法の正確性、表現の明瞭さは以下の通りである。

1) 斬新さ

近年、虚血による神経細胞傷害にグルタミン酸受容体及び NO が関与しているという報告が相次いでいる。本研究はこの仮説を網膜に適応することにより、擬似虚血から細胞死に至るプロセスを明らかにしようとしたものである。網膜は視覚情報処理の中心的役割を担う組織である一方、脳のミニチュアとして多くの神経科学研究者が脳機能を知

るための対象としてきた組織である。本研究は、単に網膜だけでなく神経全般にわたって共通の「虚血による神経細胞傷害機構」に関する重要な情報を提供している。網膜傷害にグルタミン酸受容体及び NOS 両者が関与していることは新たな発見であり、さらには、グルタミン酸受容体活性化を経て NOS による NO 産生が細胞傷害に導かれるというシグナル伝達経路を明確にしたことは極めて意義深い。

2) 重要性

グルタミン酸受容体の拮抗薬及び NOS 阻害薬の組み合わせにより神経傷害が予防できたことは臨床上画期的なことであり、今後 NO の標的分子を解明することは極めて重要であると思われる。グルタミン酸受容体に関しては、NMDA 型及び非 NMDA 型いずれの受容体も関与していることが示唆されており、ここの役割について今後の研究の発展が期待される。本研究からは、血管拡張薬として用いられる NO が副作用として神経傷害に作用するかもしれないことを示唆しており、NO 製剤の臨床使用についても警鐘を鳴らしている。

3) 研究方法の正確性

擬似虚血による網膜障害の程度は、顕微鏡による形態観察と逸脱酵素 LDH により定量化されている。形態観察においては Neuronal damage score (NDS)を導入し、傷害の定量化を図っている。文献的にも、確立された実験手法であり、客観的かつ定量的な評価を可能としている。NMDA 受容体や NOS の関与については、数多くの選択的薬物 (MK-801、GYKI、L-NAME、NIL、NIO、7-NIA、等) を用いることで、ターゲットとなる分子の同定に至っている。細胞傷害の定量的評価と合わせて、信頼性ある実験データを提示している。

4) 表現の明瞭さ

研究の背景、研究方法・方法・結果および考察が明瞭に記載されており、文章も簡明である。

以上述べたように、本論文は学位を授与するに十分値する研究と判定された。