

氏名 (本籍)	末 森 晋 典 (愛知県)
学位の種類	博 士 (医学)
学位授与番号	乙第 1417 号
学位授与日付	平成 19 年 1 月 17 日
学位授与要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Metallothionein, an Endogenous Antioxidant, Protects against Retinal Neuron Damage in Mice
審査委員	(主査) 教授 山 本 哲 也 (副査) 教授 犬 塚 貴 教授 國 貞 隆 弘

### 論文内容の要旨

メタロチオネイン (Metallothionein; MT) は、分子量約 6000 のシステイン含有蛋白質であり、I・II・III・IV の 4 つのアイソフォームが存在する。I と II は哺乳動物の全身の器官で発現しているが、III は脳、IV は舌と皮膚の上皮細胞に発現が限局している。

MT の作用には重金属解毒作用やフリーラジカル消去作用が知られており、細胞保護に働く生体内防御蛋白と考えられている。

今回我々は *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) による網膜神経節細胞死における MT の関与を明らかにするため、網膜障害時の MT-I/II/III の発現を検討し、また MT-I/II 欠損マウスを使用、さらに MT inducer である亜鉛、Vit. D<sub>3</sub> を使用した。

#### 【対象と方法】

*in vivo* で体重 20~25g の MT-I/II 欠損マウスとその野生型マウス (C57BL/6J) を用い、以下①~⑦の実験を行った。*in vitro* でラット由来 RGC 細胞株 RGC-5 を継代維持し、⑧の実験を行った。

- ① 野生型マウス片眼に NMDA を硝子体投与してから 4, 12, 24 時間後に網膜サンプリングを行い、MT-mRNA をリアルタイム RT-PCR 法で定量した。
- ② 野生型マウス片眼への NMDA 投与 12, 24 時間後の眼球組織切片で、抗 MT 抗体を用いて免疫染色した。
- ③ 野生型および MT 欠損マウス各 9 匹の片眼に NMDA を投与し、1 週間後に眼球摘出後 HE 染色組織切片を作製した。
- ④ 野生型マウス片眼に MT を誘導する硫酸亜鉛とその溶媒である硫酸を硝子体内投与し 24 時間後に MT 免疫染色をした。
- ⑤ 野生型および MT 欠損マウス各 8 匹の片眼に硫酸亜鉛とその溶媒である硫酸を前処置として硝子体内投与し、24 時間後に NMDA を投与した。そして 1 週間後に眼球組織切片を作成し HE 染色をした。
- ⑥ 野生型マウス片眼に Vit. D<sub>3</sub> と Vehicle (溶媒) を硝子体内投与し 24 時間後に MT 免疫染色をした。
- ⑦ 野生型マウス 10 匹の片眼に Vit. D<sub>3</sub>、11 匹の片眼に Vehicle (溶媒) を前処置として硝子体内投与し、24 時間後に NMDA を投与した。そして 1 週間後に眼球組織切片を作成し HE 染色した。
- ⑧ 網膜神経節細胞株 RGC-5 を継代維持し、Buthionine Sulfoximine (BSO) とグルタミン酸を添加し酸化ストレスを惹起させ、Vit. D<sub>3</sub> 添加による RGC 障害の影響を確認するため Hoechst 33342 と YO-PRO-1 の蛍光核染色法を用い死細胞率を測定した。

網膜障害時の MT の関与を確認する方法として、リアルタイム RT-PCR と MT 免疫組織標本で MT 発現を調べた。また網膜神経節細胞死を評価する方法として、HE 染色組織標本の網膜神経節細胞数 (RGC 数) をカウントすることにより、MT 欠損マウスと野生型マウスの比較を行った。

#### 【結 果】

- ① 野生型マウスにおけるリアルタイム RT-PCR で網膜内の MT 発現をみると、MT-II mRNA は NMDA 投与 12 時間後に有意な増加を認めた。一方、MT-I, III では持続的かつ有意に低下した。(\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ )

Dunnett' s test)

- ② 野生型マウスでのNMDA投与後のMT免疫組織標本では、網膜内層でMT免疫活性が増加した。
- ③ NMDA投与後のHE染色組織標本では、MT欠損マウスも野生型も網膜内層が障害されRGC数は減少し、MT欠損マウスのRGC数は野生型と比べ有意に減少していた。 (\*\*:  $p < 0.01$  Student' s *t*-test)
- ④ 野生型マウスにおける亜鉛投与後のMT免疫染色では、網膜内層におけるMT免疫活性が増加した。
- ⑤ HE染色組織標本では、野生型マウスで亜鉛前処置をするとNMDA投与でのRGC数の減少を有意に抑制した (\*:  $p < 0.05$  Student' s *t*-test)。またMT欠損マウスでは亜鉛前処置によるRGC数の減少抑制効果は消失した。
- ⑥ 野生型マウスでのVit. D<sub>3</sub>投与後のMT免疫染色では、網膜内層のMT免疫活性が増加した。
- ⑦ HE染色組織標本では、野生型マウスでVit. D<sub>3</sub>を前処置すると、NMDA投与でのRGC数の減少を有意に抑制した (\*\*:  $p < 0.01$  Student' s *t*-test)。
- ⑧ YO-PRO-1陽性細胞率(死細胞率)を測定すると、Vit. D<sub>3</sub>前投与で酸化ストレスによる死細胞率が有意に抑制された (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  Student' s *t*-test)。

### 【考 按】

本研究において、我々は網膜障害時におけるMTの役割を、MT-I/II欠損マウスとMT inducerである亜鉛, Vit. D<sub>3</sub>を使用することにより評価した。

野生型マウスにNMDAを硝子体投与して12と24時間後に、網膜内層でMT免疫活性の増加を確認した。MT-I/II欠損マウスでは、同様にNMDAを硝子体投与してもMT免疫活性は増加しなかった。

NMDA受容体を活性化させると細胞内へCa<sup>2+</sup>イオンが流入して細胞内Ca<sup>2+</sup>イオン濃度が上昇する。また細胞内活性酸素も増加し細胞生命活動を低下させる。さらに細胞内還元型グルタチオンが消費して、細胞内活性酸素を不活化させる能力が著しく阻害され細胞死をきたす。酸化ストレスは細胞内活性酸素を増加して細胞死を誘導するため、酸化ストレスによる細胞死は脳梗塞, アルツハイマー病, パーキンソン病などの急性または慢性の様々な神経疾患の最終病態としての神経細胞死の原因と関係があるとされている。このような細胞死が起こる病的状態では、MTが増加してフリーラジカル消去能の低下を補う。このことは我々が野生型マウスのNMDA投与による網膜障害モデルでMT免疫活性の増加を確認できたことから説明できる。そこで網膜障害時このMTアイソフォームが上昇するか検討したところ、MT-II mRNAがNMDA投与12時間後に有意な増加を認めた。このことからMT-IIが、増加したMTの主体であると確認できた。

またMT-I/II欠損マウスを使用し網膜神経節細胞死におけるMTの関与を調べた。NMDA硝子体投与7日後のHE染色組織標本では、MT欠損マウスのRGC数は野生型と比べ有意に減少していた。この結果からMTがRGCに対して細胞保護に作用することが示唆された。

さらにMT inducerである亜鉛, Vit. D<sub>3</sub>を使用して、NMDA障害モデル (in vivo) とRGC-5培養細胞酸化ストレスモデル (in vitro) でMT作用を確認した。亜鉛やVit. D<sub>3</sub>は細胞内MT mRNAレベルを上昇させることが報告されており、我々の実験でも野生型マウスへ亜鉛とVit. D<sub>3</sub>を硝子体投与すると網膜内層におけるMT免疫活性の上昇を確認した。NMDAによるRGC減少は亜鉛及びVit. D<sub>3</sub>前投与で有意に抑制され、その保護効果はMT欠損マウスで消失した。また培養RGC-5ではVit. D<sub>3</sub>前投与で酸化ストレスによる細胞障害を有意に抑制した。

結論として、網膜神経障害においてMTアイソフォームの中のMT-IIがNMDAによるRGC障害に対し、細胞保護因子として中心的な機能をになうことが示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

申請者 末森 晋典は、メタロチオネイン-IIがNMDAによる網膜神経節細胞死において細胞保護因子として機能することを明らかにした。このことは生体機能分子学と眼科学の発展に少なからず寄与するものと考えられる。

[主論文公表誌]

Metallothionein, an Endogenous Antioxidant, Protects against Retinal Neuron Damage in Mice  
Invest Ophthalmol Vis Sci. 47, 3975-3982 (2006).