

氏名(本籍)	中井 義幸(三重県)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第 443 号
学位授与日付	平成 12 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	ラット高眼圧実験モデル網膜における網膜神経節細胞数の変化及び bcl-2, bax mRNA発現量の変化
審査委員	(主査) 教授 北澤 克明 (副査) 教授 岡野 幸雄      教授 伊藤 和夫

### 論文内容の要旨

緑内障は特徴的な視神経萎縮、視野狭窄を示し慢性的に進行する疾患である。しかし、その視神経障害の発生、進行のメカニズムについてはいまだ不明な点が多い。古くから緑内障は高眼圧により視神経乳頭萎縮をきたす疾患と定義されてきたが、現在も視神経障害発生の上で、眼圧が重要な役割を演じていると考えられている。ヒト緑内障の病理組織学的検索では、早期より網膜神経節細胞層の減少が認められる。網膜神経節細胞体の消失は篩板レベルでの神経軸索の障害により生ずるとされている。軸索障害の原因として篩板の変形、虚血などが提唱されているが、なお不明の点が多い。さらに網膜神経節細胞の消失が軸索の損傷による進行性軸索流障害にのみ起因するものではなく、細胞体の直接的障害による可能性も指摘されている。さらに網膜神経節細胞死がアポトーシスにより生ずる証拠が蓄積されつつある。アポトーシスはネクローシスと違い遺伝子により制御された細胞死である。その作動に際して細胞外因子、細胞内因子の関与が必要である。細胞内因子のうちBcl-2、Baxは二量体を形成することにより定常状態を保っているが、ひとたびバランスを崩すと細胞死のプログラムが作動するといわれている。本研究において、ラット高眼圧モデルを用い、その網膜における神経節細胞数の変化を調べた。またRT-PCR法を用い、高眼圧のアポトーシス作動に対する影響をbcl-2、bax mRNA発現量の変化を調べることにより検討した。一方、免疫抑制剤として用いられるFK-506は、神経細胞においてアポトーシスの作動を抑制すること、マクロファージにおいてbcl-2の発現レベルを保ち、アポトーシスの作動を抑制することも報告されている。そこでFK-506全身投与下での、高眼圧の網膜神経節細胞への影響とbcl-2、bax mRNA発現への影響もあわせて検討した。

#### 対象と方法

Wistar系白色ラット40匹を用いてラット眼圧上昇モデルを作製した。一眼を高眼圧モデルとし、その僚眼は無処置対照眼とした。高眼圧モデルは、まず前房水を30 $\mu$ l墨汁と置換し、その4日後アルゴンレーザーを用い隅角部を光凝固して作製した。FK-506は生理食塩水に溶解し、低濃度群0.3mg/kg (n=10, 網膜神経節細胞数測定)、高濃度群1.0mg/kg (n=10, 網膜神経節細胞数測定, n=5, mRNA解析)を腹腔内に隅角部光凝固直前に一回投与した。対照群には生理食塩水1.5ml (n=10, 網膜神経節細胞数測定, n=5, mRNA解析)を投与した。網膜神経節細胞数の測定には逆行性の蛍光色素による網膜神経節細胞の標識による方法を用いた。隅角部光凝固5日後にfast blue 1.5 $\mu$ lを両側上丘内に注入した。Fast blue注入3日後、4%ホルマリン溶液による全身灌流固定後直ちに両眼球を摘出した。摘出眼球より網膜伸展標本を作製し、蛍光顕微鏡を用い得られた画像を画像解析ソフトNIH Image 1.61を用いて解析した。網膜神経節細胞標識率を緑内障における標識神経節細胞数と対照眼の標識神経節細胞数の比として算出した。RT-PCRは隅角部光凝固後7日目、眼圧測定後採取された網膜よりacid guanidinium thiocyanate-phenol chloroform extraction法にて精製したRNAを用いた。RT-PCRに用いたプライマーはbcl-2には5'-CAAGGGGAAACACCAGAATCAA-3'(sense), 5'-CTCCCGTTATCATACCCTGTTC-3'(anti-sense)(Genbank Accession No. L14680), bax- $\alpha$ には5'-CGAATTGGAGATGAACTGGA-3'(sense), 5'-TGAGCGAGCGGTGAGGACT-3'(anti-sense)(Genbank Accession No. L22472)であった。

## 結果

- 1) 隅角部光凝固前に測定したラットの眼圧は平均で $11.60 \pm 1.69$ mmHgであった。光凝固5日後に測定した網膜神経節細胞数測定に用いたラットの眼圧は、処置眼では対照群では $19.68 \pm 2.21$ mmHg (n=10), FK-506 0.3mg/kg投与群では $21.10 \pm 1.33$ mmHg (n=10), 1mg/kg投与群では $20.57 \pm 0.99$ mmHg (n=10)であった。網膜mRNA解析に用いたラットの処置眼では、対照群 $20.30 \pm 1.31$ mmHg (n=5), FK-506 1mg/kg投与群では $19.72 \pm 0.60$ mmHg (n=5)であった。3群間で有意差は認められなかった (ANOVA)。
- 2) 網膜神経節細胞標識率は、対照群では $73.1 \pm 7.7\%$  (59.21~79.79%), FK-506 0.3mg/kg投与群では $89.9 \pm 11.3\%$  (70.71~107.92%), 1 mg/kg投与群では $90.9 \pm 11.7\%$  (76.15~111.96%) であり3群間で有意差が認められた (P=0.0009; ANOVA)。
- 3) 本研究に用いたRT-PCR反応条件ではbcl-2, baxともにRT反応前のmRNA量の差を半定量的に反映することが確認できた。処置眼より採取したサンプルでは無処置眼より採取したものと比してbcl-2 mRNAの発現量は著しく低下していることが認められた。これに対し、baxはその発現量の差を処置眼、無処置眼の間に認めなかった。一方、隅角部光凝固直前にFK-506を投与したモデルの網膜より採取したmRNAでは処置眼、無処置眼の間にはbcl-2およびbaxの発現量に大きな変化を認めなかった。

## 考按

本研究で用いたラット高眼圧モデルは比較的簡便に再現性良く作製できる。眼圧上昇幅はマイルドであり、実際臨床の場で多く目にする緑内障における眼圧上昇と類似していると考えられた。眼圧上昇眼においては網膜神経節細胞のfast blueによる標識率が対照眼に比して減少していたことは一定期間の眼圧上昇により網膜神経節細胞が減少することを示唆している。この網膜神経節細胞数の減少とアポトーシスの関与を示唆する報告が現在までになされているものの、その作動に関するメカニズムはいまだ不明な点が多い。本研究に用いたRT-PCR反応条件では、反応前のmRNA量を比較的反映できた。本研究の結果より、高眼圧下では網膜でbcl-2の発現が減少することにより網膜内でのアポトーシスが促進される可能性が示唆された。これにより網膜神経節細胞死が促進され、その細胞数が減少するという一連の流れが推察された。

免疫抑制作用を有するFK-506は、神経系細胞においてアポトーシスを抑制する可能性が報告されており、それによる神経保護作用についても注目されている。本研究においてFK-506全身投与により高眼圧による網膜神経節細胞数の減少が少なくとも一部分は抑制されることを認めた。一方で、FK-506投与により網膜内でのbcl-2発現量が高眼圧モデル網膜において一定に保たれることが認められた。このことより、高眼圧によって作動する網膜内でのアポトーシスがFK-506により抑制されると考えられた。

現在FK-506の局所投与の試みも検討されており、新しい緑内障治療への応用も含めて今後の検討に値すると考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

申請者中井義幸はラット高眼圧モデルを用いて高眼圧により網膜神経節細胞数が減少することを示した。また高眼圧により網膜内においてアポトーシス作動にかかわるbcl-2の発現が減少することにより、アポトーシスが促進されている可能性をRT-PCRを用い明らかにした。また、FK-506投与によりこれらの変化を抑制できる可能性を明らかにした。これらの知見は緑内障における視神経萎縮発生のメカニズムを解明し、また新しい緑内障治療薬の探求をする上で意義あるもので緑内障治療学の進歩に少なからず寄与するものと思われる。

---

### [主論文公表誌]

ラット高眼圧モデルにおける網膜神経節細胞数の変化及びbcl-2, bax mRNA発現量の変化  
平成12年3月発行予定 岐阜大医紀 48 (2)