

網膜神経節細胞における虚血性障害の分子生物学的研究

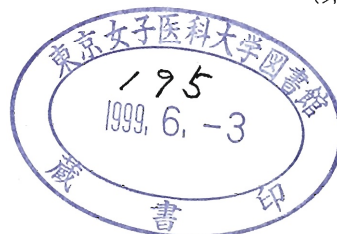
08672036

平成8年度～平成10年度科学研究費補助金（基盤研究(C)(2)）研究報告書

平成11年3月

研究代表者 北野 滋彦

(東京女子医科大学医学部助教授)



は し が き

我々は本研究において、新生児ラットの網膜神経節細胞を脳星状神経膠細胞または網膜ミュラー細胞上に植え付けることにより、長期間の培養に成功した。この培養神経節細胞を用い、虚血に対する網膜神経節細胞の感受性、および興奮性アミノ酸による網膜神経節細胞の興奮毒性を検討し、網膜神経節細胞における興奮性アミノ酸レセプターの分布、さらに虚血下およびグルタミン酸負荷における網膜神経節細胞内フリーカルシウムイオンの上昇を明らかにした。このなかで、ミュラー細胞が、網膜神経節細胞に対するグルタミン酸毒性を減少させる保護作用のあることが示された。また、培養ミュラー細胞を用いたサイトカインの研究において、我々は、TGF- β により VEGF の産生が促進されることを見出し、in vivo における TGF- β の血管新生は、ミュラー細胞での VEGF 産生が関与することを示した。これらの研究から、ミュラー細胞がニューロンの機能維持以外にも、多彩な作用を有することを明らかとなった。

研究組織

研究代表者： 北野 滋彦 (東京女子医科大学医学部助教授)
研究分担者： 堀 貞夫 (東京女子医科大学医学部教授)
研究分担者： 茂木 豊 (東京女子医科大学医学部助手)

研究経費

| | |
|--------|---------|
| 平成8年度 | 1400 千円 |
| 平成9年度 | 400 千円 |
| 平成10年度 | 400 千円 |
| 計 | 2200 千円 |

研究発表

- (1)学会誌等 (Kitano S. Morgan J. Caprioli J., Hypoxic and excitotoxic damage to cultured rat retinal ganglion cells. *Exp. Eye Res.*, 63 (1) 1996)
(Caprioli J. Kitano S. Morgan JE., Hyperthermia and hypoxia increase tolerance of retinal ganglion cells to anoxia and excitotoxicity. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 37(12) 1996)
- (2)口頭発表 (北野滋彦、培養ミュラー細胞における TGF- β による VEGF 産生. 第101回日本眼科学会総会 平成8年5月18日)

I はじめに

虚血下における網膜神経節細胞の病態生理を分子生物学的に研究する事は、緑内障や網膜虚血性疾患をはじめとした種々の疾患に対する治療法の確立において重要である。我々は、網膜神経節細胞をミュラー細胞のうえに生やすことにより長期間培養することに成功した。この培養網膜神経節細胞を用いて、虚血に対する傷害率を様々な観点から算出し、緑内障や網膜の虚血性疾患等の病態生理について研究をした。

II 網膜神経節細胞の培養系

われわれは、緑内障や虚血性網膜疾患、網膜変性疾患の病態生理の解明のため、虚血状態における遅発性神経壊死に対する興奮性アミノ酸の関与について、培養網膜神経節細胞を用いて研究してきた。

そのなかで、より安定した培養網膜神経節細胞を供給するため、培養法の研究を行ってきた。その結果において、新生児の脳星状神経膠細胞や網膜ミュラー細胞のうえに培養することにより網膜神経節細胞を長期に生存が可能となることがわかった。これは、これらのグリア細胞の共存が神経細胞の生命維持に重要な役割を果たしていることが考えられ、グリア細胞は神経細胞に対して、ニューロンの支持作用や、血液関門の形成などの形態的な役割と、栄養物質や神経発育因子の供給によるニューロンの成長促進やニューロトランスミッターの代謝といった生理的な役割を果たす。

図1は、網膜ミュラー細胞上、脳星状神経膠細胞上、およびラミニンコート上に培養した網膜神経節細胞の生存率を経時的にみたグラフだが、網膜神経節細胞は、グリア細胞との共存のほうがラミニンコート上よりも生存率が有意に良好であることが示す。

特にミュラー細胞による網膜細胞に対する作用として、ミュラー細胞がラミニンを産生することで、シナプスの進展を助長させる役割を果たしていると報告があり、ファイブログロースファクターやといったサイトカインネットワーク形成の場として、重要な役割を担っているほか、グルタミン酸の代謝の場でもあるうえに、グルタミン酸レセプターの存在が指摘されており、興奮性アミノ酸毒性に対して、防御的に働くことが示唆される。

とくに、ミュラー細胞は、網膜細胞の標的細胞としてグルタミン酸や一酸化窒素、酸素ストレスによる細胞障害に対して、神経栄養因子やサイトカインを網膜細胞に供給することで、防御的な効果を持っていることが推測される。

培養網膜神経節細胞は、生後7日のラット (Sprague-Dawley rat) の眼球より網膜を摘出し、酵素処理して細胞を分散させ、約 3×10^6 個の網膜細胞を予め用意した培養ミュラー細胞上で培養した。網膜神経節細胞の同定は、上丘にカルボシアニン蛍光物質 (DiI) を投与して逆行性に網膜神経節細胞を標識し、かつ、電気生理学的にパッチクランプを用い膜電位を測定して行った。

図2は、ミュラー細胞単層上の培養10日目の網膜神経節細胞で、周辺の網膜細胞に樹状突起を伸ばしシナプスを形成している。この培養系で少なくとも31日間以上の網膜神経節細胞の生存が確認できた。

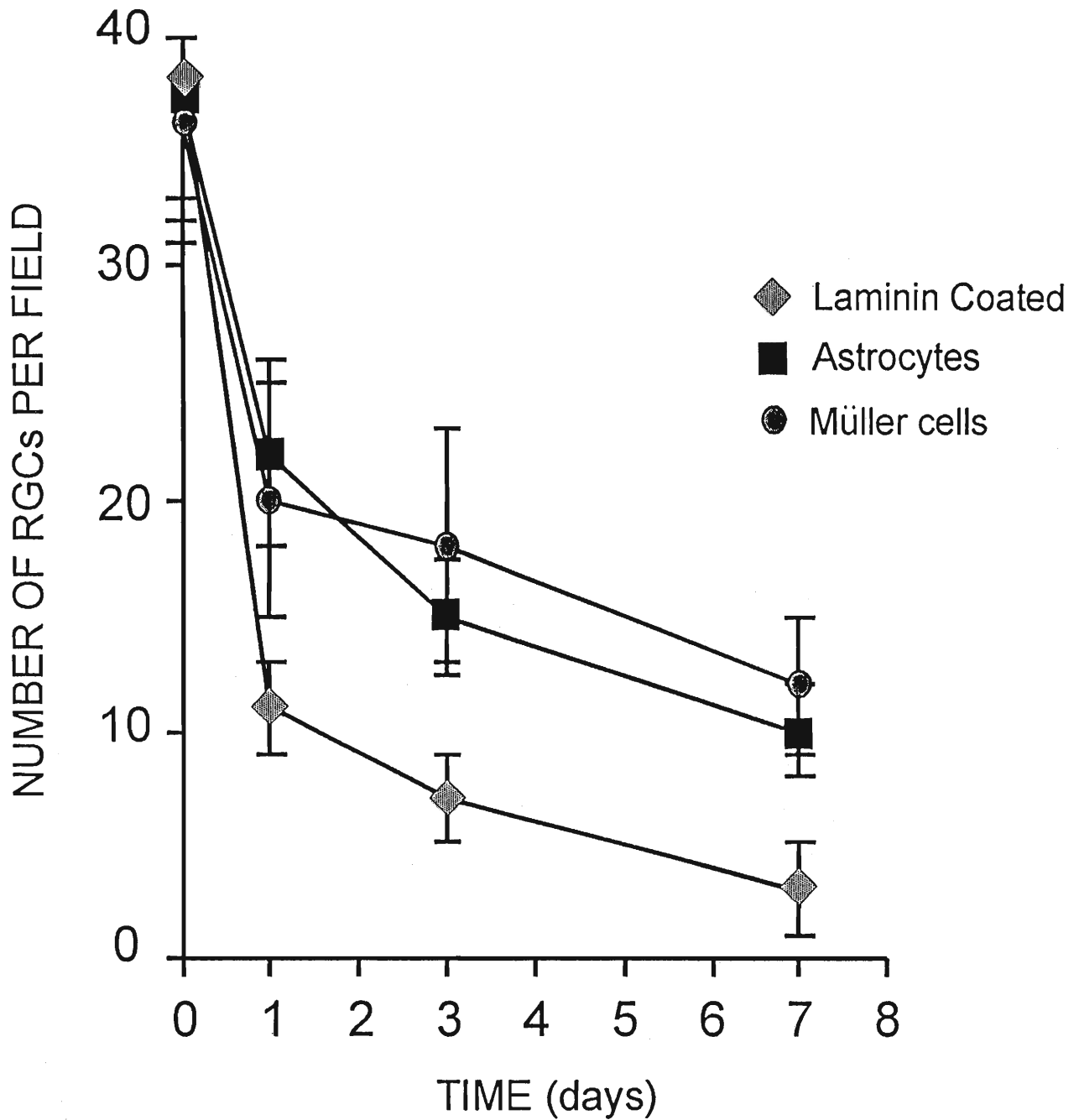


図1. 網膜ミュラー細胞上、脳星状神経膠細胞上、およびラミニンコート上に培養した網膜神経節細胞の生存率を経時的をしめす。網膜神経節細胞は、グリア細胞との共存のほうがラミニンコート上よりも生存率が有意に良好であることが示す。

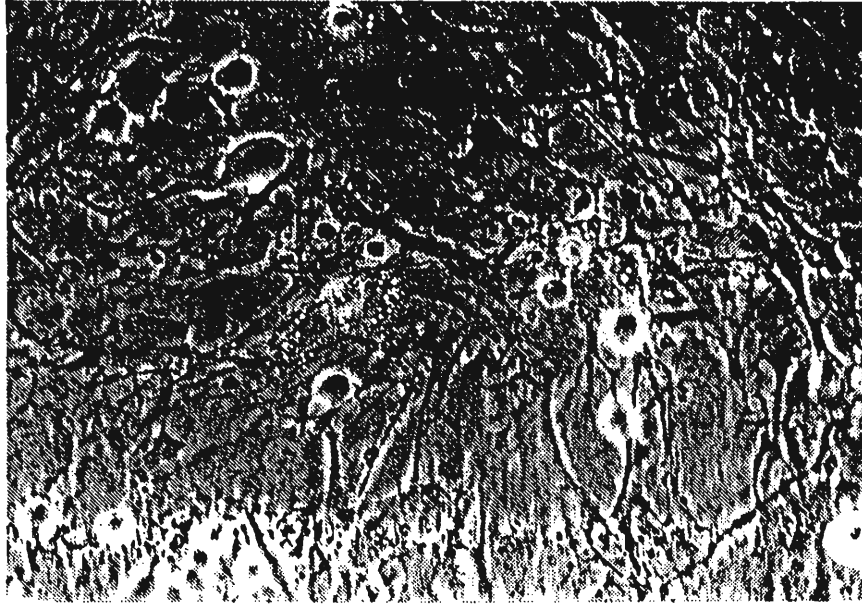


図 2. ミュラー細胞上に生える培養 10 日目の網膜神経節細胞。

II 網膜虚血と興奮性アミノ酸

多くの *in vivo*、*in vitro* の実験により、網膜を虚血下においた場合に網膜内の各細胞によって感受性が異なることが知られている。*in vivo* において、眼圧を上げることにより網膜と脈絡膜両者の血流を閉塞させた場合、網膜各層によって感受性が異なり、そのなかでも網膜神経節細胞層が他の網膜層に比し、虚血に対する感受性が高い。また、同じ網膜神経節細胞のなかでも細胞径の大きいものに感受性が高いというされている。このことは、臨床的に緑内障における太い網膜神経線維層の欠損という所見に結びついて興味深い。

このように網膜における虚血に対する感受性の相異が、緑内障や網膜の虚血性疾患の病態に関連していることが示唆されるが、とくに緑内障における網膜神経線維層の菲薄化に関して、網膜神経節細胞の虚血に対する感受性の相異が病態を解明する上で注目されている。

中枢神経系の神経細胞は特に虚血に対して脆弱であるといわれているが、すべての神経細胞が虚血に対して脆弱であるというわけではない。たとえば、脳においては、海馬CA1 錘体細胞、線状体背外側小型細胞、小脳プルキンエ細胞、大脳皮質第3・5層錘体細胞などが虚血に対して脆弱な細胞群はあげられる。一方、網膜においては、動物の種類や虚血の作成方法によって多少なり異なるところはあるが、一般には、網膜神経節細胞層および網膜内顆粒層の脆弱性が報告されている。先に述べたように、緑内障との関連もあって興味深いことに、網膜神経節細胞の細胞径の大きい細胞が虚血に対して感受性が高いといわれている。

では、何故、このような虚血に対して脆弱な神経細胞群が存在するのかと理由としては、興奮性アミノ酸の存在、一酸化窒素、酸素ストレス、神経栄養因子の関与などが考えられている。その中でもグルタミン酸をはじめとする興奮性アミノ酸の関与が注目されている。脆弱な神経細胞群とグルタミン酸レセプターの分布が一致しており、虚血によって生ずるグルタミン酸の過剰分泌が、より多くのグルタミン酸レセプターを有する神経細胞を壊死に至らしめることが考えられている。

興奮性アミノ酸は、興奮伝達物質として作用するほか、過剰に細胞外に分泌されると網膜神経節細胞など網膜細胞に毒性があることが明らかにされ、この興奮性アミノ酸毒性が虚血後に生ずる遅発性神経細胞壊死に大きく関与しているのではないかと論じられている。実際に、虚血下網膜において、興奮性アミノ酸濃度著明な上昇が網膜内層に認められている。また、興奮性アミノ酸を全身投与した場合、網膜神経節細胞層と網膜内顆粒層に変性がみられ、しかもこの変性は興奮性アミノ酸の拮抗剤によって阻害されることが報告されており、このことから、興奮性アミノ酸が虚血やその他の傷害において何らかのかたちで網膜神経節細胞の壊死に関与していると思われる。我々は、同じ網膜神経節細胞のなかでも、細胞体径の違いによって虚血に対する感受性が変化するかを検討する上で、培養網膜神経節細胞に低酸素負荷を加えるほかに、興奮性アミノ酸毒性についても研究した。実験的虚血は、後述するように、培養神経節細胞を、37℃に保温されている密閉された容器に、0%O₂、5%CO₂、95%N₂ガスを灌流させて低酸素状態にした。興奮性アミノ酸毒性は、一定濃度のグルタミン酸、カイニン酸、NMDAの3種を培養網膜神経節細胞の培養液に加え、一定時間インキュベートしてから、培養液かえ、24時間後にトレバンプルー排除率から生存率をパッチクランプの電位から傷害率を算出した。

III 培養網膜神経節細胞における興奮性アミノ酸毒性

先に述べたように、網膜細胞に限らず神経細胞を長期間培養するのは容易なことではない。新生児ラットの脳星状神経膠細胞や網膜ミュラー細胞上に培養することで、網膜神経節細胞をはじめとする網膜細胞を長期間培養することが可能となる。網膜細胞を星状神経膠細胞やミュラー細胞上に培養する理由として、これらの細胞には、ニューロンの支持作用、血液関門の形成、栄養物質や神経発育因子の供給によるニューロンの成長促進、興奮性アミノ酸をはじめとするニューロトランスミッターの代謝など神経細胞と関連した特有の機能を有しているためである。このことから、神経細胞を培養するにあたり、神経膠細胞を共存させることが神経細胞に生命維持に役立っているものと思われる。

培養そのものが生体内の環境と大きく異なるものの、培養細胞を用いることにより様々な条件を人為的に負荷し、定量的に病態を評価することができる。そこで、虚血の病態生理を研究する目的で、培養神経節細胞を用いて細胞そのものを低酸素に暴露するほか、興奮性アミノ酸を負荷して、その後の細胞の機能的、形態的变化を検討した。

一連の研究のなかで、培養網膜神経節細胞は何種の興奮性アミノ酸の負荷により時間および濃度依存性に毒性を示すことが確認されており、また、低酸素負荷においても、興奮性アミノ酸と同様に時間および濃度依存性に生存率が変化していくことが判明した。

図2は、興奮性アミノ酸を培養液中に負荷した場合の網膜神経節細胞の生存率を示す。10から500 μ Mの濃度のグルタミン酸、カイニン酸、NMDA (N-methyl-DL-aspartic acid)、を培養液に加えて6時間インキュベートし、培養液を変え24時間後にトレバンプルーの排泄率からコントロール群と比較した生存率を算出した。各興奮性アミノ酸は、濃度依存性に網膜神経節細胞に毒性を持つことが示されている(図3~図5)。

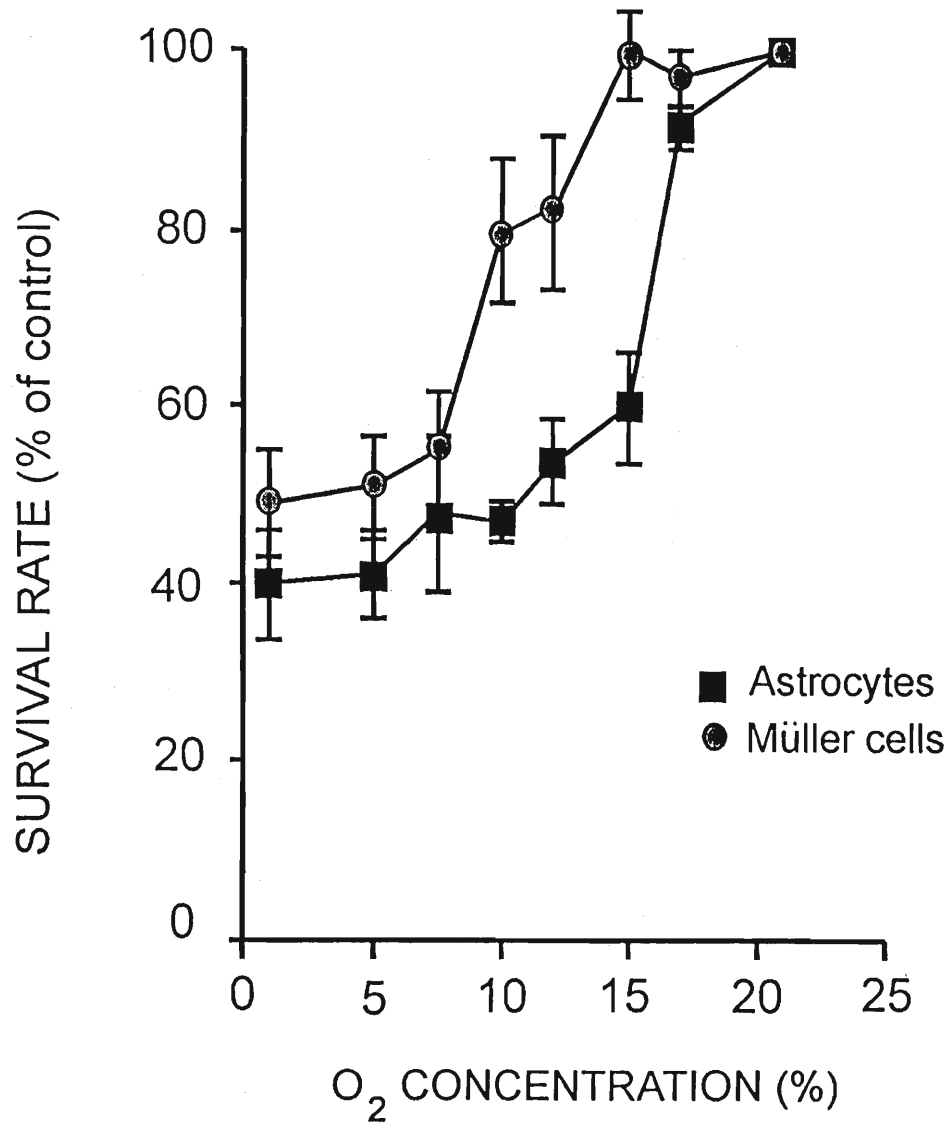


図3. 各酸素濃度下6時間暴露後における培養網膜神経節細胞の生存率。濃度依存性が認められる。

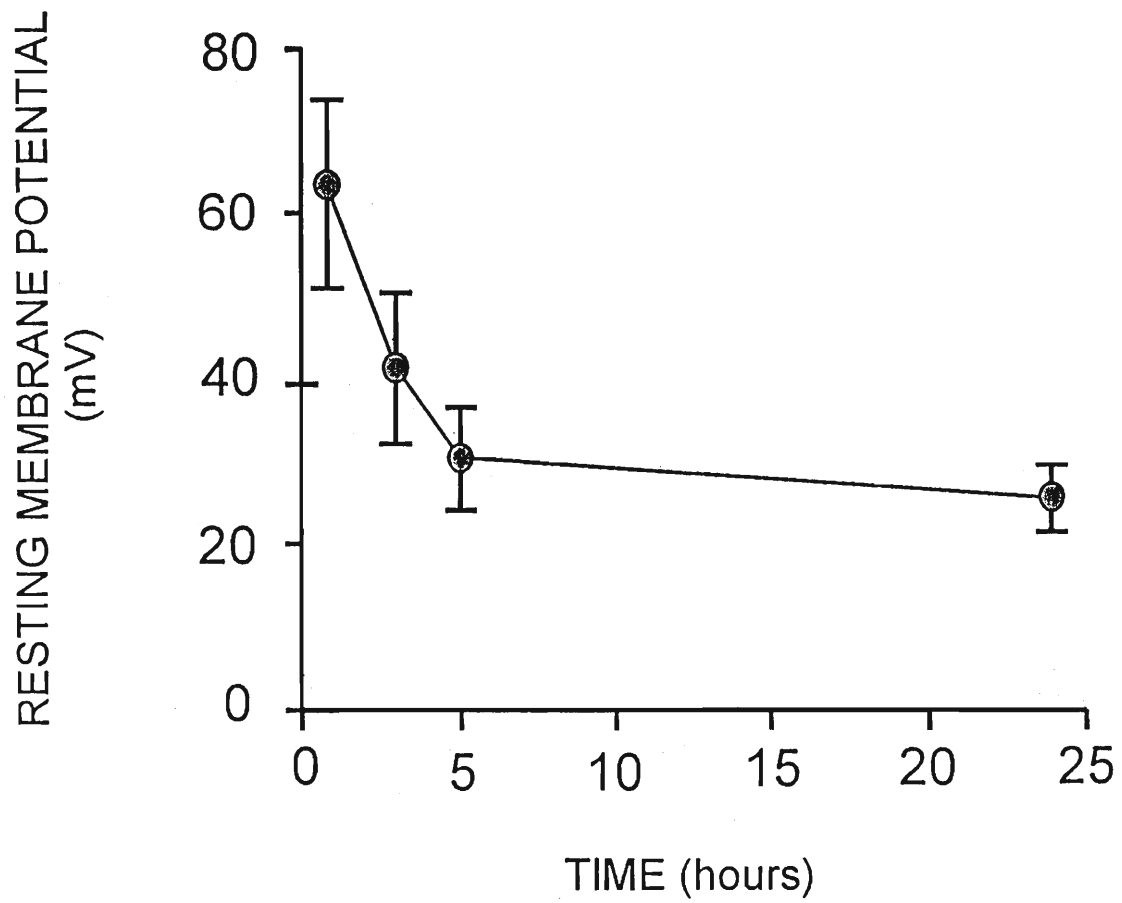


図4. 虚血負荷後のパッチクランプ培養網膜神経節細胞の静止膜電位。時間経過とともに低下が認められる。

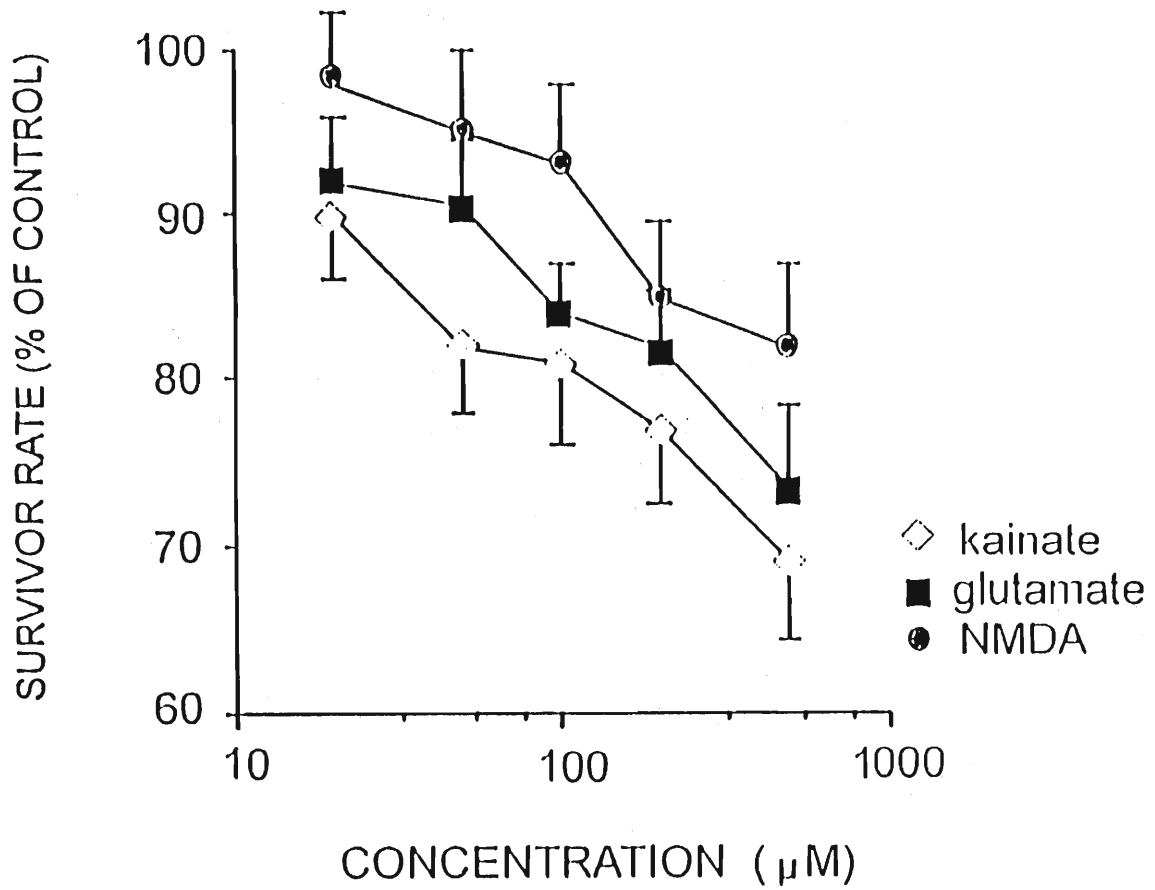


図5. 興奮性アミノ酸 (■グルタミン酸、●NMDA) を各濃度負荷後の培養網膜神経節細胞の生存率。濃度依存性が認められる。

IV培養網膜神経節細胞の興奮性アミノ酸毒性に対するミュラー細胞の保護作用

ミュラー細胞は、網膜細胞の標的細胞としてグルタミン酸や一酸化窒素、酸素ストレスによる細胞障害に対して、神経栄養因子やサイトカインを網膜細胞に供給することで、防御的な効果を持っていることが推測される。そこで、培養網膜神経節細胞の興奮性アミノ酸毒性や低酸素負荷に対しても、グリア細胞が防御的に働くのかを検討した。

培養網膜神経節細胞の虚血負荷および興奮性アミノ酸毒性 ($200 \mu\text{M}$ NMDA) における生存率は、ラミニンコート上ではそれぞれ 40.0 ± 7.0 、 $54.2 \pm 10.8\%$ であったのに対して、脳星状神経膠細胞上では、 53.2 ± 5.6 、 $68.6 \pm 11.6\%$ で、ミュラー細胞上は、 85.8 ± 6.3 、 $84.2 \pm 11.2\%$ と有意差がみられた。培養網膜神経節細胞の虚血負荷および興奮性アミノ酸毒性に対し、グリア細胞の共存は防御的に作用することが示唆された (図6～8)。

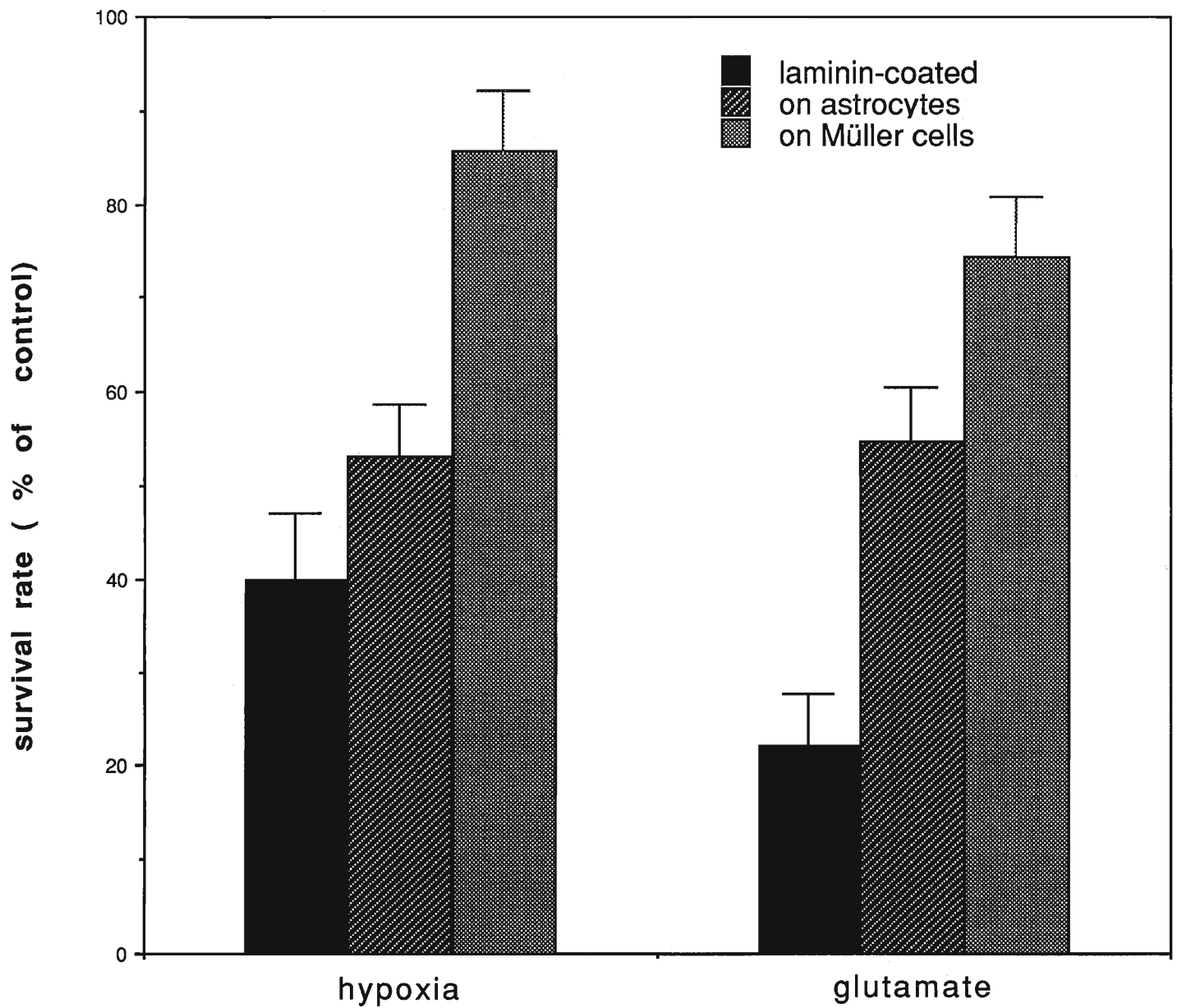


図6. 培養網膜神経節細胞の虚血負荷および興奮性アミノ酸毒性 (200 μ M グルタミン酸) における生存率は、ラミニンコート上ではそれぞれ 40.0 \pm 7.0、54.2 \pm 10.8%であったのに対して、脳星状神経膠細胞上では、53.2 \pm 5.6、68.6 \pm 11.6%で、ミュラー細胞上は、85.8 \pm 6.3、84.2 \pm 11.2%と有意差がみられた。

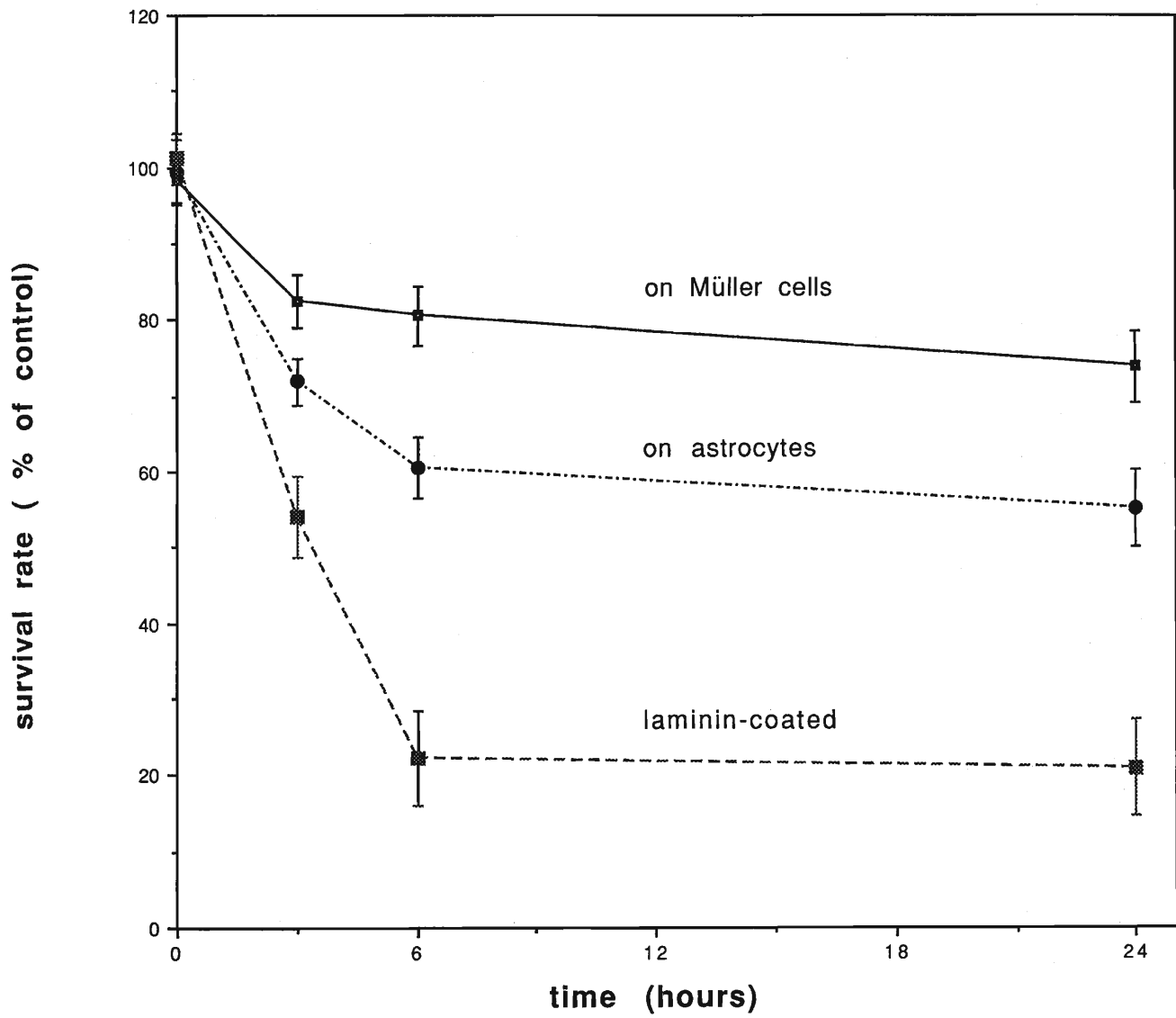


図7. ラミニンコート上、脳星状神経膠細胞上、およびミュラー細胞上の培養網膜神経節細胞に $200 \mu\text{M}$ グルタミン酸負荷後の生存率の経過。

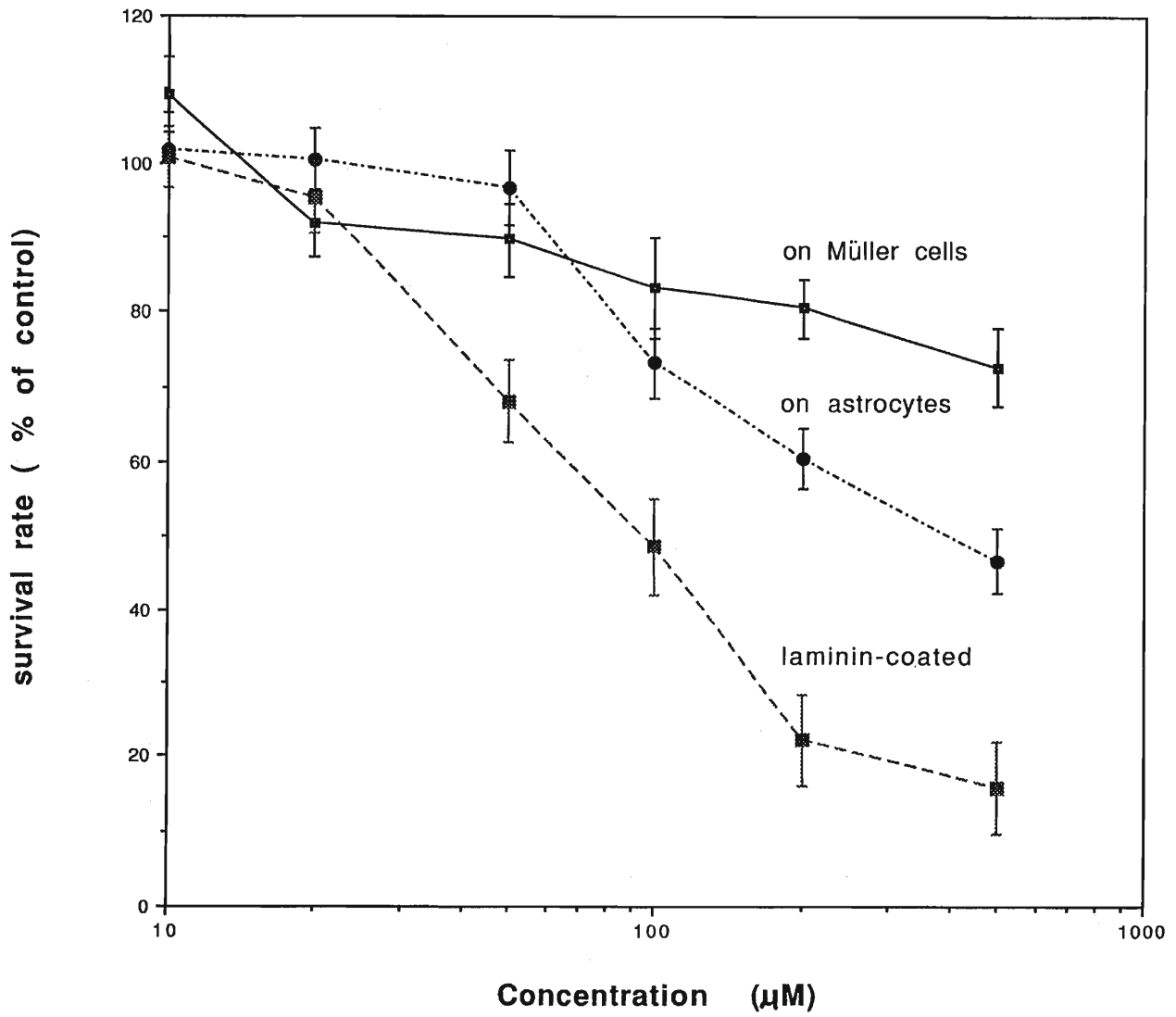


図8. ラミニンコート上、脳星状神経膠細胞上、およびミュラー細胞上の培養網膜神経節細胞に各濃度のグルタミン酸を負荷して6時間後の生存率。

V興奮性アミノ酸毒性の細胞径による感受性の相異

次に、同様に培養網膜神経節細胞に負荷を加えた場合に、顕微鏡下で計測した細胞の胞体の大きさによる感受性の相異について検討してみた。

先の実験と同様に、培養網膜神経節細胞は生後7日のラットの眼球より網膜を摘出し、酵素処理して細胞を分散させ、各35 mm ディッシュに約 3×10^6 個の網膜細胞を予め用意した培養ミューラー細胞上に培養した。網膜神経節細胞の同定は、新生児ラットの上丘にカルボシアニン蛍光物質(DiI)を投与して逆行性に標識し、かつ電気生理学的に膜電位を測定して行った。

網膜神経節細胞の大きさは、細胞胞体の短径をもって、small ($<12 \mu\text{m}$)、medium ($12 \sim 18 \mu\text{m}$)、large ($18 \mu\text{m} <$) に分類した。コントロール群における網膜神経節細胞の大きさの分布は、small 15 ± 7 、medium 67 ± 10 、large $18 \pm 8\%$ であった。動物の種類により多少の差は認められるが、この分布は、従来のヒトネコ、家兎、ラットの網膜神経節細胞の各細胞径の比率の報告と類似した。図9は、培養後2日目のDiIに染まる網膜神経節細胞を細胞胞体の短径を、12 および $18 \mu\text{m}$ を境にして全体に占める比率を算出したものである。

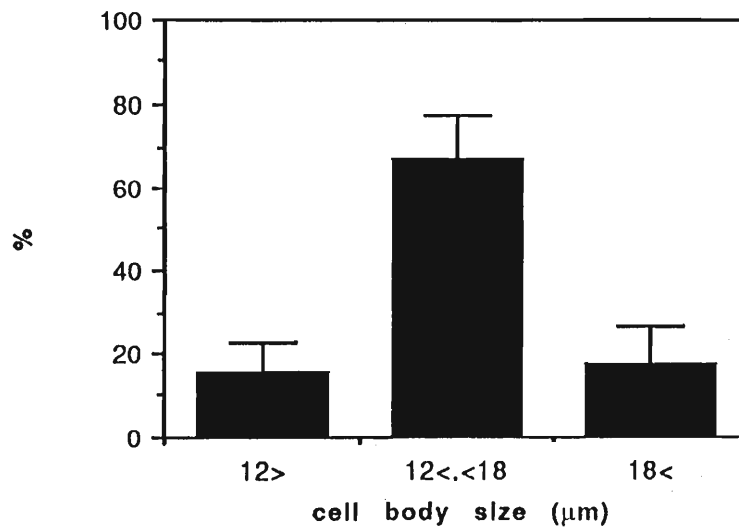


図9. 培養2日目の網膜神経節細胞における各細胞胞体径の占める比率。

興奮性アミノ酸毒性は、同様に一定濃度のグルタミン酸、カイニン酸、NMDAの3種の興奮性アミノ酸を培養網膜神経節細胞の培養液に加え、一定時間インキュベートした後、培養液を変えて24時間インキュベーターにディッシュを戻した後、トレパンブルーの排泄率から生存率を算出した。前述したように培養網膜神経節細胞に対して、各興奮性アミノ酸は濃度依存性に毒性を示したが、このうちの200 μ MのNMDAを培養液に加えた場合における各細胞の胞体径の生存率を算出した。図10にNMDAを培養液中に一定時間負荷した場合の網膜神経節細胞の各細胞胞体径の生存率を表す。細胞胞体径18 μ m以上のlarge群の生存率がインキュベート時間とともに低くなっている。図11は、24時間インキュベートした時の網膜神経節細胞の各細胞胞体径の生存率の比較したもので、各細胞胞体径毎の生存率は、コントロール群との比で、small 52 ± 6 、medium 90 ± 11 、large 27 ± 28 %で細胞胞体径18 μ m以上のlarge群の生存率が他群に比較して有意に低いことが示されている。

図10

図11

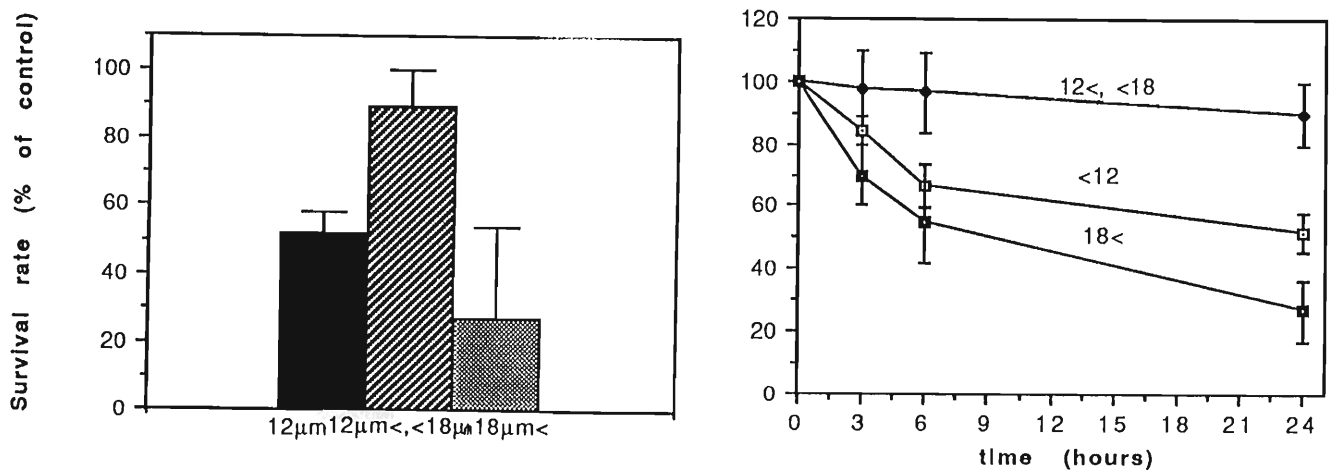


図10. NMDAを培養液中に負荷した場合の網膜神経節細胞の各細胞胞体径の生存率。

200 μ MのNMDAを培養液に加え一定時間インキュベートし、培養液を変えて24時間後にコントロール群と比較した網膜神経節細胞の各細胞胞体径毎の生存率を算出した。細胞胞体径18 μ m以上のlarge群の生存率がインキュベート時間とともに低くなっている。

図11. 図10における6時間インキュベートした時の網膜神経節細胞の各細胞胞体径の生存率の比較。細胞胞体径18 μ m以上のlarge群の生存率が他群に比較して有意に低いことが示されている。

低酸素負荷として、培養2日目に密閉された空気環流装置付きの保温チャンバーにディッシュを入れ、0%酸素、5%二酸化炭素、95%窒素ガスを一定時間環流した。ガス環流中は培養液内の酸素分圧、pH、温度を金属電極をもちいてモニターした。環流終了後、24時間インキュベーターにディッシュを戻した後、トレパンブルーの排泄率から生存率を算出した。培養網膜神経節細胞は、各酸素分圧に対して、濃度依存性かつ時間経過により生存率が低下することが、予備実験で示されており、本実験は0%酸素ガスを3時間環流した場合の網膜神経節細胞の各細胞胞体径の生存率を算出した。図12に0%酸素下で一定時間インキュベートした場合の網膜神経節細胞の各細胞胞体径の生存率を表す。細胞胞体径18 μ m以上のlarge群の生存率がインキュベート時間とともに低くなっている。図13は、24時間インキュベートした時の網膜神経節細胞の各細胞胞体径の生存率の比較したもので、各細胞胞体径毎の生存率は、small 70 \pm 28、medium 84 \pm 13、large 17 \pm 9%でNMDA負荷の場合と同様に細胞胞体径18 μ m以上のlarge群の生存率が他群に比較して有意に低いことが示されている。

興奮性アミノ酸毒性と低酸素負荷のいずれにおいても、細胞胞体径の大きい培養網膜神経節細胞が選択的に傷害される結果が示された。

図 12

図 13

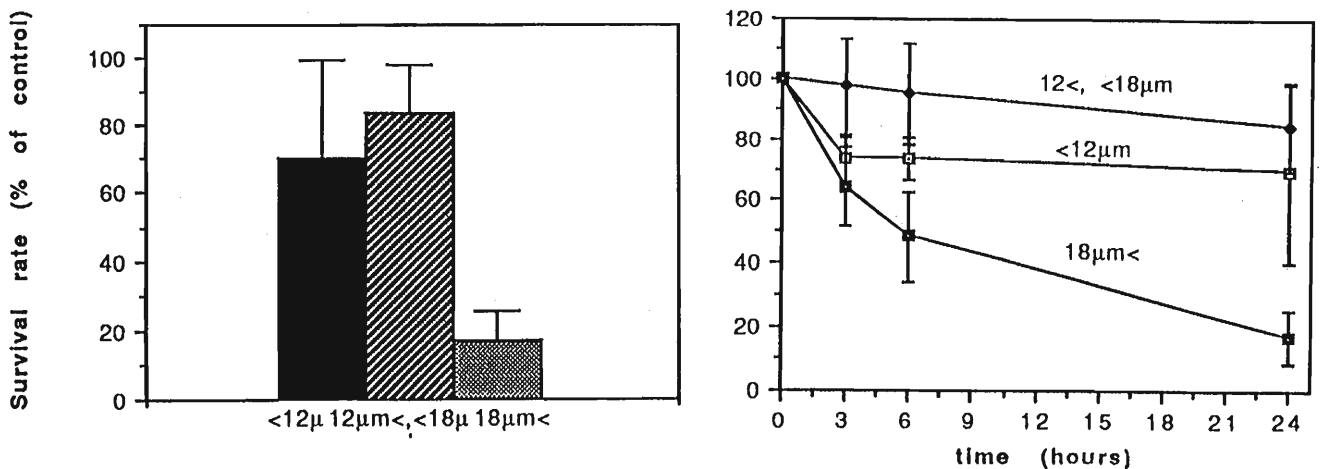


図 12. 培養網膜神経節細胞に低酸素負荷を加えた場合の網膜神経節細胞の各細胞胞体径の生存率。0%酸素下で一定時間インキュベートし、培養液を変えて24時間後にコントロール群と比較した網膜神経節細胞の各細胞胞体径毎の生存率を算出した。細胞胞体径18 μ m以上のlarge群の生存率がインキュベート時間とともに低くなっている。

図 13. 図12における6時間インキュベートした時の網膜神経節細胞の各細胞胞体径の生存率の比較。NMDA負荷の場合と同様に細胞胞体径18 μ m以上のlarge群の生存率が他群に比較して有意に低いことが示されている。

VI興奮性アミノ酸毒性の細胞径による感受性の相異

次にこれら感受性の相異の機序を検討する上で、興奮性アミノ酸のレセプターの分布について検討した。抗レセプター抗体を用いて培養網膜神経節細胞の各細胞胞体径におけるレセプターの分布をみたところ、グルタミン酸R1、R2、R3、R5、R6、R7、NMDAR1のレセプターのうち、グルタミン酸R1、R2、R3およびNMDAR1のレセプターが存在が認められ、とくにNMDAR1は細胞径の大きい網膜神経節細胞に多く染まる示された。この結果から、興奮性アミノ酸のレセプターの分布の数が細胞径によって異なることが、虚血下における細胞胞体径による感受性の相異の機序のひとつとして考えることができる。

抗グルタミン酸レセプター抗体による染色率

| | 網膜神経節細胞全体 | 大型網膜神経節細胞 |
|---------|-----------|-----------|
| Glu R1 | + | ± |
| Glu R2 | + | ± |
| Glu R3 | + | ± |
| Glu R5 | - | - |
| Glu R6 | - | - |
| Glu R7 | - | - |
| NMDA R1 | + | + |

VII網膜神経節細胞の分類

網膜神経節細胞は生理学的な特徴からX細胞 (brisk sustained cells)、Y細胞 (brisk transient cells)、W細胞 (sluggish cells) の3型に分類されているが、一方で形態学的特徴のうち細胞胞体径からも large (α)、medium (β)、small (γ) の3型に分類されている。また、この生理学的と、形態学的な分類は、それぞれ対応しているとの報告もみられる。

網膜神経節細胞の細胞胞体径による分類において、large、medium、small それぞれをどの細胞胞体の短径でわけるかは報告によって様々ではあるが、12と18 μ mを境界とするものが多い。ヒトの網膜神経節細胞においては、細胞径12 μ m以下の細胞は中心窩に高密度に分布しており、18 μ m以上の細胞は網膜全体に分布している。網膜神経節細胞全体に18 μ m以上の細胞の占める比率は7~20%であった。ラットの場合は、18 μ m以上の大型細胞は3%と網膜神経節細胞全体に占める比率は我々の結果より低いとの報告もあるが、細胞胞体径による分布はヒトなど他の動物と類似していると思われる。

この形態学的な分類で、それぞれの細胞群が生体内において如何なる役割が果たしているかについて詳細は不明ではある。したがって、今回の研究で各細胞群による虚血の感受性の違いが見出されたが、さらに電気生理学的手法を用い機能的な面で関連づける必要があると思われる。

VIII 中枢神経系における虚血の病態

網膜神経節細胞に限らず中枢神経系の神経細胞は、特に虚血に対して脆弱である。しかし、網膜と同様に、中枢神経系の神経細胞全体が虚血に対して一応に同程度の傷害を受けるわけではなく、一部の神経細胞において感受性の高いものがみられる。脳においては、海馬CA1錐体細胞、線条体背外側中小型細胞、小脳プルキンエ細胞、大脳皮質第3・5層錐体細胞などが虚血に脆弱な細胞としてあげられる。

脆弱な神経細胞が存在するの理由の一つとして、興奮性アミノ酸による毒性があげられる。近年、興奮性アミノ酸、特にグルタミン酸レセプターのサブタイプの同定、それぞれに対する拮抗薬の開発の研究が盛んに行われるようになったが、グルタミン酸レセプターの脳内分布に関する研究で、虚血に脆弱な神経細胞とグルタミン酸レセプターの分布とよく一致すると報告されている。このことから、脳虚血により細胞外に放出されたグルタミン酸がグルタミン酸のレセプターを豊富にもっている神経細胞を選択的に破壊することが推定される。実際にグルタミン酸を直接脳内に注入すると、注入の針先の周囲に神経細胞とグリア細胞の壊死が認められ、重症の脳梗塞と類似した形態をとることが知られている。脳梗塞の場合、虚血に脆弱な部位を中心に小さな梗塞巣が発生して、それが連続する形で神経細胞の壊死が拡大していき、癒合して大梗塞を形成する。このことから、細胞内のグルタミン酸が細胞外へ放出され、次々に細胞壊死が誘発されるメカニズムが考えられる。

細胞外にグルタミン酸が放出される機序として、虚血によって細胞外からCa²⁺が神経終末部に流入し、シナプス小胞からからのグルタミン酸の放出を促すことがあげられる。また、虚血によって細胞外のKイオン濃度が上昇し、Na、Kイオンの動きに共役するグルタミン酸の細胞内への取り込みが減少する。さらに、細胞内にKイオンを取り込むかわりに、細胞内のグルタミン酸が放出される。このため、細胞外のグルタミン酸濃度がさらに上昇するものと考えられる。細胞外のグルタミン酸濃度の上昇は細胞内でのフリーのCa²⁺イオンの上昇を招き、神経細胞を壊死に至らしめると考えられている。事実、短時間の脳虚血から時間を経てCa²⁺を注射すると、細胞死に陥る神経細胞にCa²⁺の蓄積が認められる。

先に述べたように、グルタミン酸のレセプターを豊富にもつ神経細胞が虚血に対して脆弱であることが示唆される。グルタミン酸レセプターには、イオンチャンネルを有するNMDA型およびnon-NMDA型と細胞内G蛋白と共役する代謝型レセプターが知られている。このうち、虚血に最も脆弱な海馬CA1領域にNMDA型レセプターが多く分布している。したがって、NMDA型レセプターの競合性拮抗剤AP-7が動物の脳虚血モデルに対して有効であるとの報告はこれを裏付けるものである。また、一方でnon-NMDA型の拮抗剤であるNBQXが動物の脳虚血モデルに対して有効であるとの報告もあり、さらにグルタミン酸レセプターと虚血の関連性に関して検討する必要がある。

IX 緑内障における網膜神経節細胞傷害

網膜神経節細胞の虚血傷害と密接に関連すると思われる臨床的疾患として緑内障があげられる。緑内障の病理所見として網膜の神経線維層の非薄化や神経節細胞層の減少がみられる。この際の神経節細胞層の減少は、細胞胞体径の大きな細胞が優先されており、また、軸索径とは比例関係にあるとされている。実験的にも、サル眼に緑内障をアルゴンレーザー

一を線維柱帯に照射する方法で作製した場合、大きな軸索ほど傷害されやすいという報告がある。また、緑内障の視野変化に関して網膜神経線維層の欠損が関与しており、なかでも太い神経繊維層のほど高眼圧に対して抵抗性が弱いとされている。このほかに実験的緑内障眼において細胞径の大きい中心窩網膜神経節細胞が傷害されやすいことや、剖検緑内障眼において細胞径の大きい網膜神経節細胞が傷害されやすいことも報告されている。

何故、緑内障眼において細胞胞体径の大きい網膜神経節細胞が傷害を受けやすいかは、緑内障の網膜における神経線維層の菲薄化や神経節細胞層の減少の機序が不明のため、いろいろな仮説はあるものの正確には明らかにされていない。一般的には強膜篩状板での軸索輸送の障害が特に大きい軸索に生じやすいことが有力視されている。しかし、今回の検討したように、網膜神経節細胞の細胞胞体径によるグルタミン酸レセプターの分布の違いから、虚血およびそれに伴う興奮性アミノ酸の毒性に対する感受性の相異が生じ、その結果として、緑内障眼における細胞胞体径の大きい網膜神経節細胞の減少がおこるということも十分に示唆される。今後、緑内障眼における網膜神経節細胞の傷害機序が解明されることにより、視野をはじめとした視機能障害の病態が明らかとなり、さらには治療法の確立への発展が期待される。

X培養網膜神経節細胞における 72-kDa 熱ショック蛋白の発現

72-kDa 熱ショック蛋白(HSP-72)の発現が、中枢神経系における虚血耐性に関与していることが知られている。しかしながら、網膜虚血に対して HSP-72 が防御的に作用するかについては明らかにされていない。そこで、HSP-72 の誘導抑制作用のあるケルセチンを用い、網膜虚血に対する防御作用の抑制を培養網膜神経節細胞にて検討した。

虚血下およびグルタミン酸負荷における蛋白合成障害とストレス応答等の研究では、培養神経節細胞を 24 時間低酸素負荷させた後、抗 72kDa 熱ショック蛋白抗体を用いて、biotin-streptavidin 法にて免疫組織学的、また免疫電気泳動法で観察し、その染色陽性率を算出し、さらに 72kDa 熱ショック蛋白の mRNA の分布をハイブリダイゼーションで検討した。また、培養神経節細胞に対する 72kDa 熱ショック蛋白の虚血に対する防御効果をその生存率から明確にした。

前述のように、新生児ラットの視上丘に蛍光物質を投与して逆行性に標識した培養網膜神経節細胞を用いた。低酸素負荷およびグルタミン酸負荷による培養網膜神経節細胞の生存率は、その回復時のトリパンプルー排除率から算出した。致死下の低酸素負荷による HSP-72 の発現は、抗 HSP-72 抗体による免疫組織化学および免疫電気泳動にて検索した。このなかで、ミュラー細胞に網膜神経節細胞より遅れ、長期にわたる 72kDa 熱ショック蛋白の発現がみられ、虚血に対する反応が認められた(図 14,15,16)。

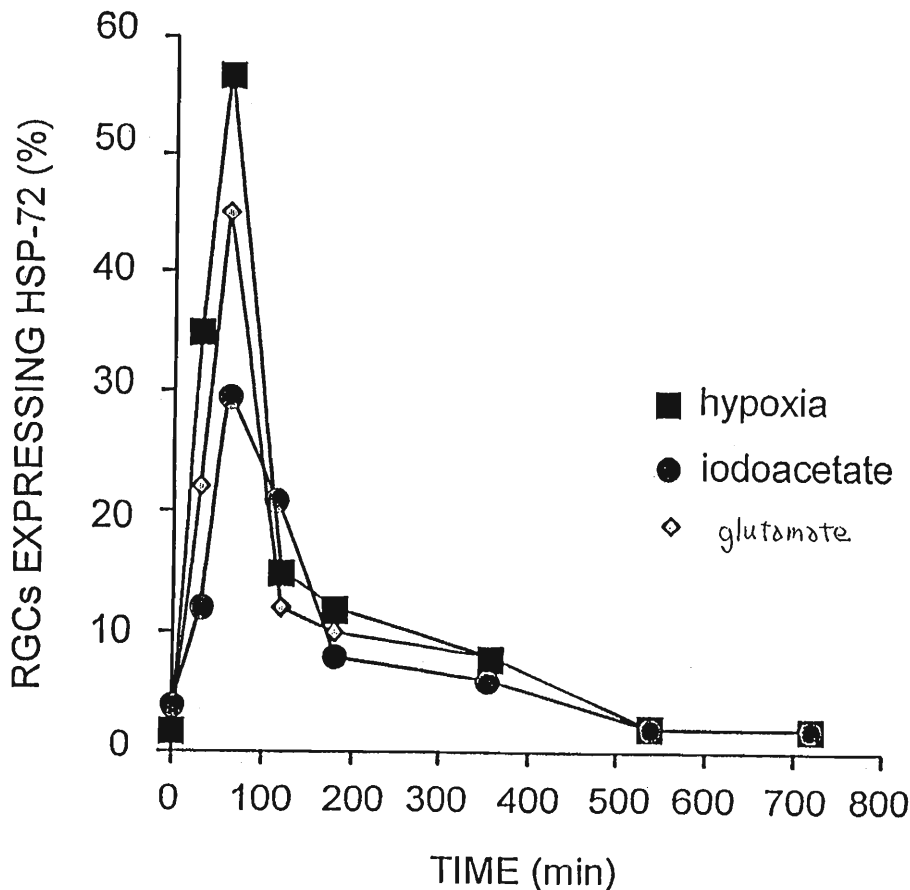


図 14. 致死下の低酸素負荷およびグルタミン酸負荷による培養網膜神経節細胞の HSP-72 の発現。

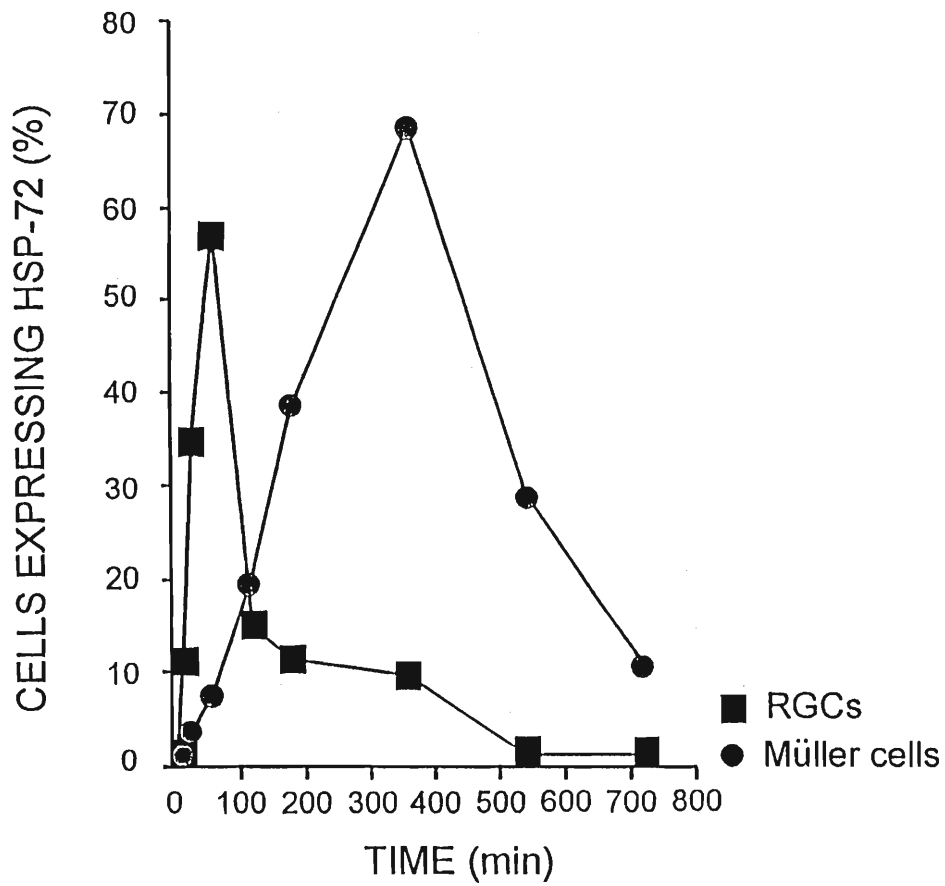


図 15. 致死下の低酸素負荷による HSP-72 の発現。ミュラー細胞に網膜神経節細胞より遅れ、長期にわたる HSP-72 の発現がみられる。

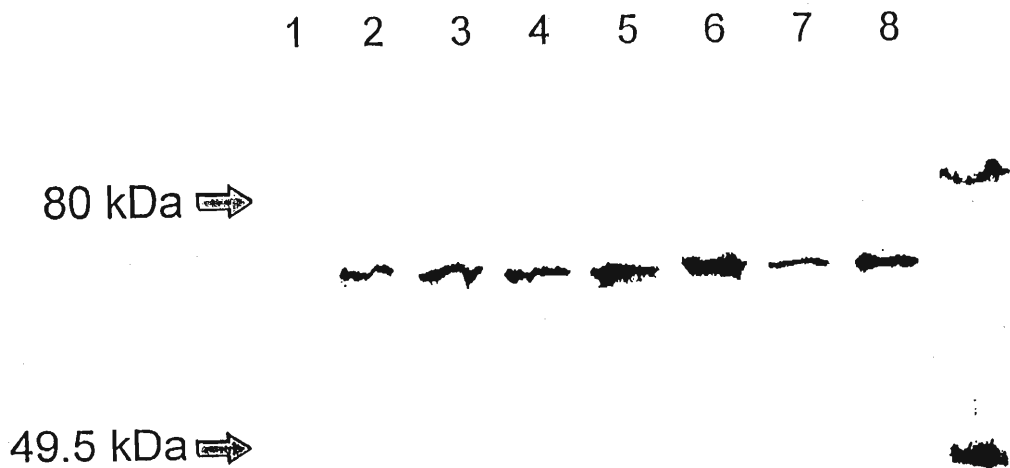


図 16. 熱負荷 (2,3,4,)、致死下の低酸素負荷 (5,6) およびグルタミン酸負荷 (7,8) 後の抗 HSP-72 抗体による免疫電気泳動。

致死下の低酸素負荷で前処置した後に、さらに高度の低酸素負荷をした場合の培養網膜神経節細胞の生存率を対照群と比較した。(図 17,18)

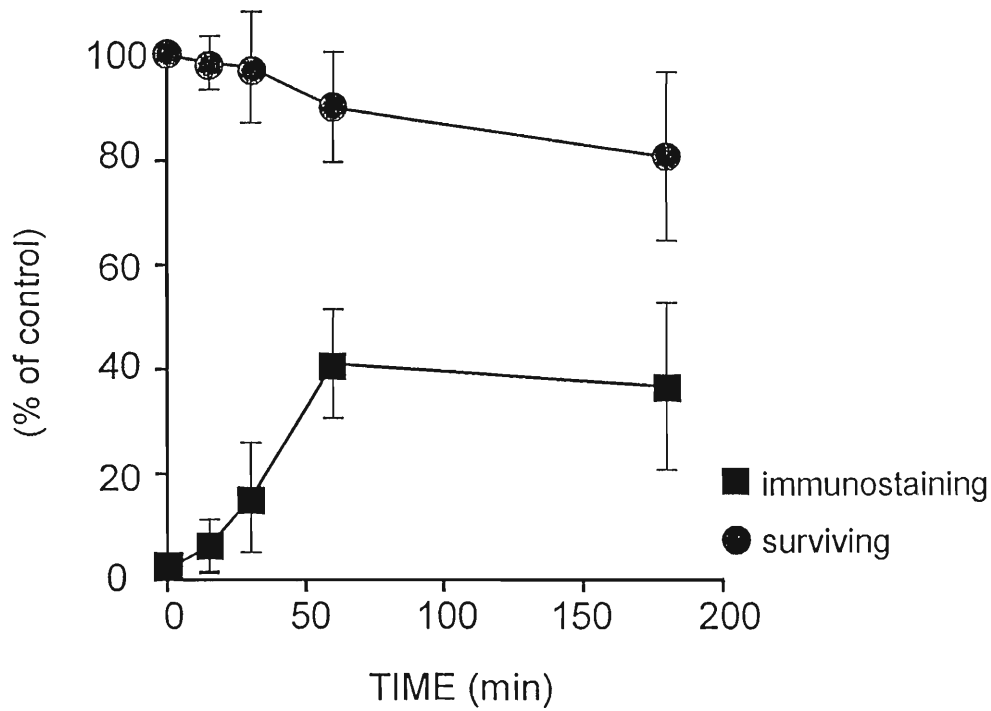


図 17. 熱負荷で前処置した後に、高度の低酸素負荷をした場合の培養網膜神経節細胞の生存率を対照群と比較した。■は、HSP-72 の発現率を示す。

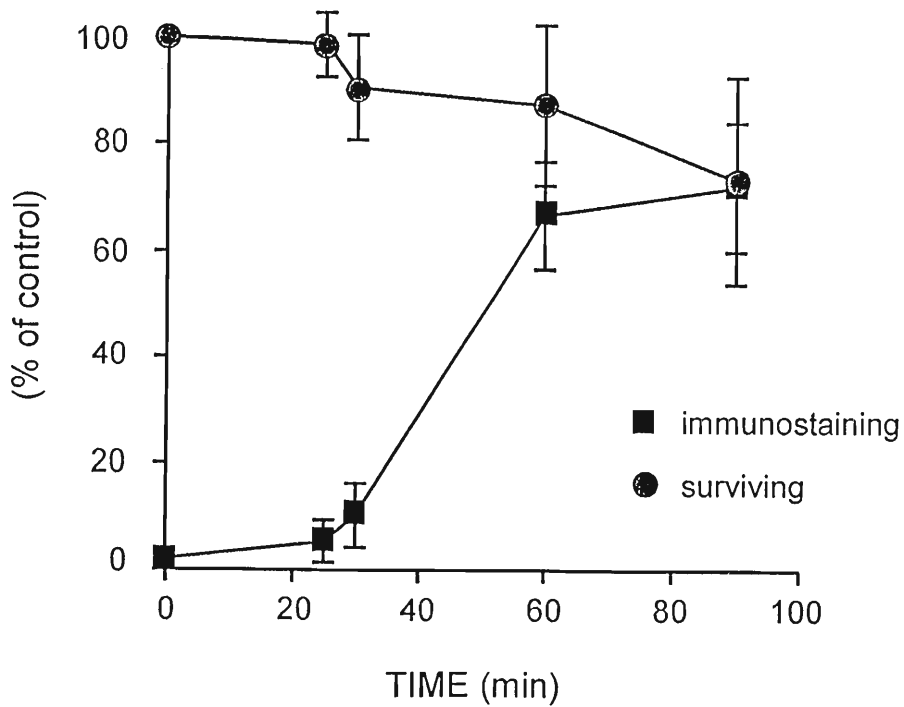


図 18. 致死下の低酸素負荷で前処置した後に、さらに高度の低酸素負荷をした場合の培養網膜神経節細胞の生存率を対照群と比較した。■は、HSP-72 の発現率を示す。

加えて、前処置においてケルセチン(50-200 μ M)を投与した場合の生存率の変化を検討した。

1. ケルセチン (100 μ M) によるH S P 72 発現抑制に関する実験

| | 非投与 | 投与 |
|--------|------|------|
| コントロール | 4.2 | 5.5 |
| 低酸素負荷 | 60.7 | 19.4 |
| 高温負荷 | 68.0 | 20.4 |

2. ケルセチン各濃度による低酸素負荷後のH S P 72 発現抑制に関する実験

| | |
|-------------|------|
| 0 | 60.7 |
| 100 | 19.4 |
| 200 μ M | 5.8 |

3. 低酸素負荷耐性に対するケルセチン (100 μ M) による抑制に関する実験

低酸素負荷／コントロール

| | | |
|-----|-----|-------------------|
| 無処置 | 非投与 | 56.1 \pm 26.8 % |
| | 投与 | 54.6 \pm 17.6 |
| 前処置 | 非投与 | 83.3 \pm 26.4 |
| | 投与 | 63.3 \pm 20.3 |

4. 低酸素負荷に対するサイクロヘキサマイドによる抑制に関する実験

低酸素負荷／コントロール

| | | |
|-----|-----|-----------------|
| 無処置 | 非投与 | 56.1 \pm 26.8 |
| | 投与 | 60.7 \pm 19.2 |
| 前処置 | 非投与 | 83.4 \pm 26.4 |
| | 投与 | 86.7 \pm 21.7 |

5. 低酸素負荷耐性に対するケルセチンによる抑制の濃度依存性に関する実験

| | |
|-------------|------------------|
| 0 | 83.4 \pm 26.4 |
| 50 | 109.6 \pm 12.6 |
| 100 | 98.6 \pm 9.5 |
| 200 μ M | 84.1 \pm 11.4 |

致死下の低酸素負荷(10% O₂、3hrs)による HSP-72 の発現は、ケルセチン(100 μ M)の投与によって有意に抑制された。培養網膜神経節細胞の高度の低酸素負荷(0% O₂、3hrs)後の生存率は、56 ± 28 %であったが、前処置として致死下の低酸素負荷を加えると、83 ± 26 %と有意に上昇した。しかし、前処置においてケルセチンを投与すると、63 ± 20 %と前処置による培養網膜神経節細胞の生存率の上昇が有意に抑制された。この効果は濃度依存性に認められた。

培養網膜神経節細胞における虚血耐性は、HSP-72 の誘導抑制作用をもつケルセチンの投与により抑制された。この結果から培養網膜神経節細胞の虚血に対して HSP-72 は防御的に作用することが示唆された。

X I 72-kDa 熱ショック蛋白の発現と硝子体液化

酸化ストレスは、硝子体の液化を促進することが指摘されている。このことから、本研究では、HSP を発現しうる熱ショックが、硝子体の液化に与える影響について検討した。

生後7日の新生児ラットを用い、熱ショックは、42 °Cで5分間の温浴を10分間のインターバルで計4回を行い、これを1クールとし、1日3クールを3日間繰り返して行った。熱ショック後、眼球を摘出し顕微鏡下にて観察したのち、硝子体を露出した。硝子体液化率は、濾紙の吸着された硝子体液の重量を測定し、硝子体全重量における比率として算出した。対照群(n=10)と比較して、熱ショック群(n=10)の角膜、水晶体、網膜、脈絡膜などの形状に変化は認められなかった。対照群の硝子体液化率の平均は、26.9% (MD 7.019)であったのに対して、熱ショック群は、35.5% (MD 7.025)で、2群間に有意差が認められた(p=0.019, Mann-Whitney U test)。

新生児ラット眼に HSP を発現しうる熱ショックを与えることにより、硝子体液化率は有意に上昇することが示され、熱ショックが硝子体液化を促す可能性が示唆された。我々は、ラットの網膜硝子体に熱ショック蛋白が産生される条件で熱ショックを与えると、硝子体の液化に変化を生ずることを報告した。本研究では、家兎を用い、熱ショックによる硝子体液化の機序について、生化学的および組織学的に検討した。

有色家兎(ダッチラビット)6羽を麻酔下に、片眼に温湿布を貼り、網膜硝子体の温度が約43°Cとなるように調整し、1日30分の熱ショックを4日間連続して与えた。他眼は、コントロールとした。処置終了後、検眼鏡的に眼球を観察した後に、眼球を摘出した。濾紙を用いて液化硝子体を抽出し、硝子体全重量における比率を算出した。液化硝子体は、コラゲナーゼなどの酵素をはじめとする生化学的な解析を行った。一方、残りの網膜硝子体は、固定後、電顕を用い組織学的に観察した。

検眼鏡的に熱ショック群の3眼において、硝子体中に細かい白濁が認められたが、角膜および水晶体には変化はみられなかった。液化硝子体率は、熱ショック群は39.8 ± 6.0%で、コントロール群の33.1 ± 7.6%に比し、有意(p=0.0277, Wilcoxon signed-ranks test)に重かった。液化硝子体中のヒト間質型コラゲナーゼ(MMP-1)は、熱ショック群に多い傾向にあった。

家兎においても、熱ショックにより硝子体の液化に変化を生じた。液化硝子体中のヒト間質型コラゲナーゼや組織学的変化から、熱ショックによる硝子体の液化は、熱ショック蛋白を介する蛋白分解酵素の活性の上昇が一因であることが示唆された。

X II メチルコバラミンの網膜虚血に対する保護作用

本研究では、網膜虚血に特に脆弱である培養大型網膜神経節細胞を対象にして、網膜の主要な神経伝達物質であるグルタミン酸による遷延性網膜毒性や低酸素負荷を加えて、メチル基転移反応による細胞膜の安定化作用のあるメチルコバラミンの網膜虚血に対する保護作用を検討した。

前述のように、新生児ラットの上丘に蛍光物質を投与して逆行性に網膜神経節細胞を標識した。摘出した網膜は酵素で処理し、一定数の網膜細胞をミュラー細胞上に培養した。7日目の培養網膜神経節細胞を、37℃に保温され密閉された容器に入れ、0% O₂、5% CO₂、95% N₂ ガスを灌流させて低酸素状態にし、その回復時のトレパンプルー排除率から生存率を算出した。さらに、パッチクランプを用いて静止膜電位を測定して傷害率を算出した。同様にして、培養液中に一定濃度のグルタミン酸を負荷してその生存率、傷害率を算出した。虚血負荷および興奮性アミノ酸毒性による傷害に対する保護作用という観点から、メチルコバラミンの急性投与および慢性投与における培養網膜神経節細胞の生存率、傷害率の変化を検討した。

メチルコバラミン 10⁻⁸ から 10⁻⁵ M を 24 時間添加後（急性投与）、3 時間低酸素状態にして、その回復時の培養網膜神経節細胞（各細胞径）の生存率を対照と比較した。メチルコバラミン 10⁻⁶ M 添加における全培養網膜神経節細胞の生存率は 79 ± 10% で、対照群の生存率 53 ± 6% に対して、有意に良好であった。この保護作用には、濃度依存性が認められた。グルタミン酸 200 μM を 6 時間負荷後の回復時の生存率においては、メチルコバラミン 10⁻⁶ M 添加における生存率は 84 ± 10%、対照群の生存率 60 ± 11% に対して有意に良好で、濃度依存性も認められた。sodium nitroprusside を負荷した培養網膜神経節細胞においても、メチルコバラミン同様の保護作用を有した。

メチルコバラミンは、細胞膜脂質の代謝を介して、培養網膜神経節細胞のグルタミン酸負荷および低酸素負荷において、保護作用を有することが示唆された。虚血に脆弱な培養大型網膜神経節細胞を対象に、神経伝達物質であるグルタミン酸による遷延性網膜毒性や低酸素負荷を加え、メチル基転移反応による細胞膜安定化作用のあるメチルコバラミンの網膜虚血に対する保護作用を検討した。

X III 培養網膜ミュラー細胞における TGF-β による VEGF の産生

Transforming growth factor-β (TGF-β) は、種々の細胞で産生され、多彩な作用を有するポリペプチドで、in vivo においては、血管新生を促進する作用を有することが知られている。しかしながら、培養血管内皮細胞に対しては、逆に増殖を抑制する作用をもつ。そのため、in vivo においては、TGF-β が血管新生因子である Vascular endothelial growth factor (VEGF) の産生を促進することにより、血管新生に関与していることが推定されている。本研究では、培養ミュラー細胞を用いて、TGF-β による VEGF の産生について検討した。

生後 5 ないし 7 日のラット網膜から抽出した培養ミュラー細胞を用い、血清無添加の培養液中に異なる濃度の TGF-β を添加して 24 時間培養した。対照として血清アルブミンを含む 4 mM HCl を添加した。添加培養前後の培養液中の VEGF 濃度を radioimmunoassay 法にて測定した。さらに、培養ミュラー細胞の VEGF の mRNA の

発現について検討した。

培養液中の VEGF は、TGF- β を添加したものにおいて測定が可能であって、対照群は測定されなかった。1 および 10ng/ml の TGF- β を添加培養後の培養液中の VEGF 濃度は、それぞれ 8.1 ± 6.9 、 24.7 ± 4.4 ng/ml で、濃度依存性の産生増加と VEGF の mRNA の発現が認められた。培養ミューラー細胞において、TGF- β が VEGF の産生を促進する作用が認められた。TGF- β が VEGF の産生を介して、血管新生の促進作用に関与している可能性が示唆された (図 19)。

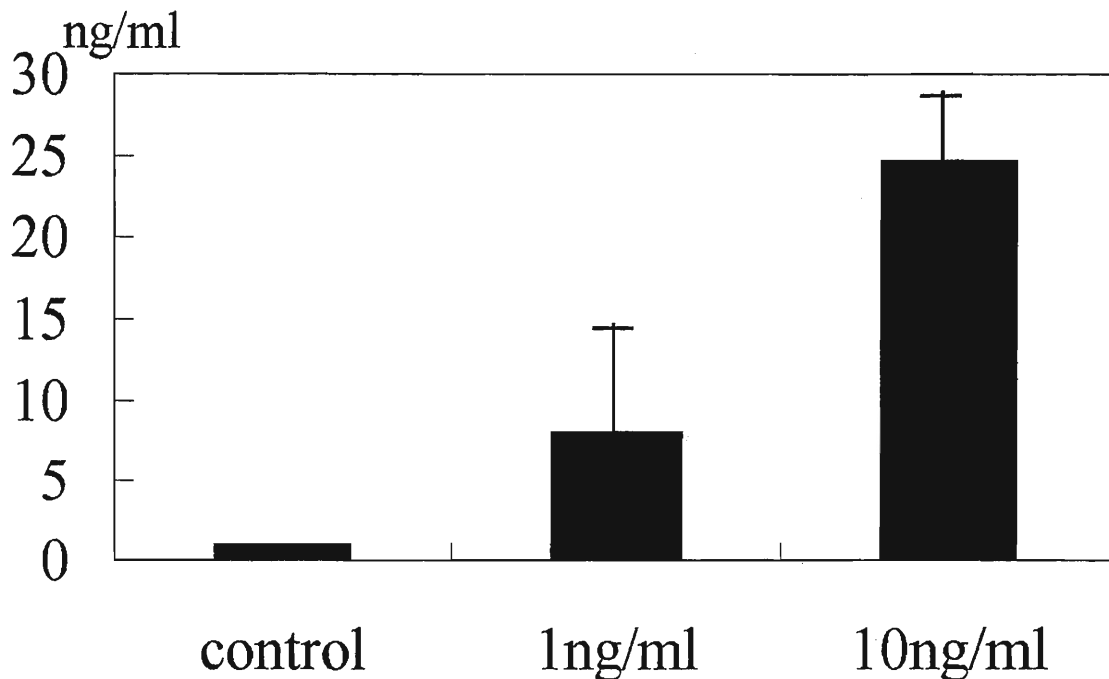


図 19. 1 および 10ng/ml の TGF- β を添加培養後の培養液中の VEGF 濃度

おわりに

我々は、新生児ラットの網膜神経節細胞を脳星状神経膠細胞または網膜ミューラー細胞上に植え付けることにより、長期間の培養に成功した。この培養神経節細胞を用い、虚血に対する網膜神経節細胞の感受性、および興奮性アミノ酸による網膜神経節細胞の興奮毒性を検討し、網膜神経節細胞における興奮性アミノ酸レセプターの分布、さらに虚血下およびグルタミン酸負荷における網膜神経節細胞内フリーカルシウムイオンの上昇を明らかにした。このなかで、ミューラー細胞が、網膜神経節細胞に対するグルタミン酸毒性を減少させる保護作用のあることが示された。また、培養ミューラー細胞を用いたサイトカインの研究において、我々は、TGF- β により VEGF の産生が促進されることを見出し、in vivo における TGF- β の血管新生は、ミューラー細胞での VEGF 産生が関与することを示した。これらの研究から、ミューラー細胞がニューロンの機能維持以外にも、多彩な作用を有することを明らかとなった。