

網膜再生における neuron-glia interaction の分子生物学的研究

13671854



平成 16 年 3 月

研究代表者 北野 滋彦
(東京女子医科大学医学部教授)



は し が き

グリア細胞上に網膜神経節細胞を培養することで、網膜神経節細胞を長期生存が可能となった。虚血負荷や興奮性アミノ酸を加えると、濃度依存性に網膜神経節細胞の生存率が低下するが、この培養系を用いると、生存率が有意に向上した。一方、培養グリア細胞における一酸化窒素合成酵素を免疫組織学的に同定したところ、抗 bNOS 抗体陽性、抗 iNOS 抗体陰性であったことから、この培養系に一酸化窒素合成酵素阻害薬 (N ω -nitro-L-arginine) を前処置することで、虚血負荷や興奮性アミノ酸による毒性に対する網膜神経節細胞の生存率の改善が認められ、一酸化窒素を介する neuron-glia interaction が示された。

また、培養グリア細胞において、ニューロトロフィンとして、NGF と BDNF が分泌され、サイトカインとして、VEGF、bFGF、TGF β の産生が確認されて、グリア細胞と網膜神経節細胞の neuron-glia interaction が形成されていた。さらに、ラット毛様体の神経幹細胞を分離し、bFGF を添加して培養したところ、GABA 陽性細胞、アセチルコリン陽性細胞、tyrosine hydroxylase 陽性細胞、カルビンジン陽性細胞、グリア線維状酸性蛋白 (GFAP) 陽性細胞、Thy-1 抗体陽性細胞、vimentin 陽性細胞が出現した。

ラット毛様体の神経幹細胞を分離し、bFGF 添加にて得られた培養細胞に、ニューロトロフィン (NGF、BDNF) やサイトカイン (VEGF、IGF、NGF、bFGF、PDGF) を添加して、網膜神経節細胞への分化・誘導を試みているが、現在のところ結果が得られていない。

研究組織

研究代表者： 北野 滋彦 (東京女子医科大学教授)
研究分担者： 船津 英陽 (東京女子医科大学講師)
研究分担者： 関本 香織 (東京女子医科大学助手)

交付決定額 (配分額)

(金額単位：千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 13 年度	1,700	0	1,700
平成 14 年度	1,500	0	1,500
総計	3,200	0	3,200

研究発表

- (1) 学会誌等 (小関義之、ラット培養網膜神経節細胞における一酸化窒素合成酵素阻害剤の細胞保護効果. 東女医大雑誌 71 巻第 5・6 号 297-303、2001)

はじめに

現在、中途失明の原因疾患として、糖尿病網膜症と緑内障が上位を占めているが、これらの疾患の視力障害の原因は、最終的には網膜の神経細胞の障害にある。網膜の神経細胞は再生は不可能とされ、失われた視機能を回復することはできないとされていた。しかし、成体哺乳類の中枢神経系組織にも神経幹細胞が存在し、海馬や脳室下帯などの一部の領域においては神経細胞が再生されることが明らかにされた。さらに、網膜においても、毛様体縁部に網膜幹細胞が存在することが示された。したがって、網膜固有の神経細胞も可能性が示唆されている。一方で、中枢神経系を構成するグリア細胞が神経細胞の生死、成長および神経機能へ大きく関与していることが明確にされている。網膜を構成するグリア細胞にひとつミューラー細胞が、網膜神経細胞の保護と再生に寄与していることが想定される。本研究では、網膜再生における neuron-glia interaction の関与を明らかにすることを目的にしている。

網膜神経節細胞の培養系

網膜神経節細胞の病態生理を分子生物学的に研究するため、安定した培養網膜神経節細胞の供給は必要不可欠である。網膜神経節細胞は、ミュー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。この培養神経節細胞を用いて、虚血に対する障害率を様々な観点から算出して、網膜神経節細胞とミューラー細胞の neuron-glia interaction の関与を研究した。

網膜神経節細胞は、グリア細胞の共存が生命維持に重要な役割を果たしていることが考えられ、グリア細胞は網膜神経節細胞に対して、ニューロンの支持作用や、血液関門の形成など形態的な役割と、栄養物質やニューロトロフィン、サイトカインの供給による神経細胞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。

網膜ミューラー細胞上、脳星状神経膠細胞上、およびラミニン添塗上に培養した網膜神経節細胞の生存率を経時的に観察した結果、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添塗上よりも生存率が有意に良好であることが示された。

特にミューラー細胞による網膜細胞に対する作用として、ミュー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、VEGF や bFGF、TGF- β 1 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。

また、ミューラー細胞は、網膜細胞の標的細胞としてグルタミン酸や一酸化窒素、酸化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。

本研究では、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ー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による膜電位を測定して行った。

ミュー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

延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。

グリア細胞による網膜神経節細胞の虚血に対する保護作用

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、糖尿病網膜症や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、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°C に保温されている密閉された容器に、0%O₂、5%CO₂、95%N₂ ガスを海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 時間後にトレパンブ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。

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。

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、神農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 μ 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 \pm 7.0、54.2 \pm 10.7%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、55.8 \pm 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。

中枢神経系における虚血の病態

脆弱な神経細胞が存在する理由の一つとして、興奮性アミノ酸による毒性があげられるが、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カルシウムイオン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カリウムイオン濃度が上昇し、ナトリウム、カリウム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、細胞内にカリウム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カルシウム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カルシウムイオンを注射すると、細胞死に陥る神経細胞にカルシウム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。

培養網膜ミュラー細胞におけるサイトカインの発現

網膜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るほかに、VEGF

や bFGF、TGF- β 1 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ことが推測される。

本研究では、培養ミューラー細胞を用いて、サイトカインネットワークの形成について検討した。

生後 5 ないし 7 日のラット網膜から抽出した培養ミューラー細胞を用い、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 4mM HCl を添加した。添加培養前後の培養液中の VEGF 濃度を radioimmunometric assay 法にて測定した。さらに、培養ミューラー細胞の 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つて、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。

一酸化窒素合成阻害剤の網膜神経節細胞に対する保護効果

虚血による網膜障害によって起こる網膜神経節細胞死に興奮性アミノ酸が原因となっているという報告や NMDA 受容体の拮抗剤が虚血障害から網膜を保護したという報告がある。一方、一酸化窒素は中枢神経系で重要な伝達物質であることが明らかになってきた。ラット脳皮質細胞で NMDA などがその受容体に結合すると、カルシウムイオンが細胞内に流入し、カルモジュリンと結合することで神経型一酸化窒素合成酵素が活性化し、細胞内一酸化窒素の濃度が上昇する。このことは、一酸化窒素は興奮性アミノ酸や虚血による神経障害に関与している可能性を示している。中大脳動脈を閉塞させた動物モデルで、一酸化窒素合成酵素抑制剤を腹腔内投与すると、脳梗塞の範囲が減少したとの報告がある。また、培養脳皮質細胞で、一酸化窒素合成酵素抑制剤がグルタミン酸による神経毒性に拮抗したという報告もある。網膜神経節細胞においても、一酸化窒素合成酵素阻害剤が虚血や興奮性アミノ酸による神経細胞毒性を抑制する可能性がある。

我々は、グリア細胞上に網膜神経節細胞を培養することにより、網膜神経節細胞の長期生存を可能とした。この培養系を用いて、様々な観点から neuron-glia interaction の研究を行ってきた。そのなかで、神経膠細胞上に培養した網膜神経節細胞は、虚血負荷や興奮性アミノ酸毒性に対して濃度依存性に生存率が低下することが明らかとなった。

本研究では、この培養系を用い、一酸化窒素合成酵素阻害剤が虚血や興奮性アミノ酸による細胞毒性に及ぼす効果を検討した。

I 対象

実験には Sprague-Dawley ラット（日本チャールズ・リバー、東京）を用いた。動物実験にあたっては東京女子医科大学動物実験倫理委員会規程（許可番号 97-27, 98-6, 99-21, 00-74）に従った。

II 方法

1) 網膜神経節細胞の逆行性標識

生後 5~7 日の Sprague-Dawley ラットを氷上で 10 分間放置することで麻酔した。顕微鏡下で横静脈洞のやや後方の皮膚を小切開し、上丘に 1, 1'-dioctadecyl-3, 3', 3', 3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI ; DiI 2.5ml/ml 100%エチルアルコール) を 1 μ l 注入し、網膜神経節細胞を逆行性に標識した。

2) 網膜細胞浮遊液の作製

網膜神経節細胞は、DiI を注入後 2 日目の生後 5~7 日の Sprague-Dawley ラットの網膜から Liefer らの方法に従って分離した。すなわち、ラットを麻酔薬 (ベントパルビタール塩) 過剰投与した後、断頭により屠殺した。眼球を摘出し、ペニシリン 100U/ml とストレプトマイシン 100 μ g/ml を加えた HBSS (Hank's balanced salt solution) 中で顕微鏡を用い、角膜を切開し水晶体・硝子体を除去した後、網膜を小スパーテルで傷つけないように摘出した。4 眼分の網膜をパパイン (260U/ml)・DL-システイン (0.2mg/ml)・ウシ血清アルブミン (0.2ml/ml) 含有 HBSS 10ml 中で 36°C 40 分間消化させた。消化させた網膜を HBSS で洗浄した後、Dulbecco 改変 Eagle medium (DMEM) 4ml に移し細胞浮遊液を作製した。後述のラット脳皮質星状膠細胞を単層培養してある 35mm シャーレに 1. 5ml の培養液 (DMEM にグルタミン 580mg/L・グルコース 1000mg/L・5%ラット血清・ペニシリン 100U/ml・ストレプトマイシン 100 μ g/ml) を入れ、それに細胞浮遊液 0.2ml (約 3 \times 10⁶ 個の網膜細胞) を滴下した。網膜細胞は、温度 37°C・湿度 100%の 5%CO₂ を維持した炭酸ガスインキュベーターで培養し、培養液は 3 日毎に交換した。

3) 神経膠細胞単層培養の作製

神経細胞を長期間生存させるためには星状膠細胞などの神経支持細胞上で培養する必要がある。脳皮質星状膠細胞は McCaffery らの方法により生後 1~2 日のラットの大脳半球を用いた。断頭の後、大脳半球を摘出し、ペニシリン 100U/ml・ストレプトマイシン 10 μ g/ml 含有 HBSS 中に浸した。顕微鏡下で髄膜を除去し、1~2mm³ 角に切断し、0.25%トリプシン含有 HBSS 中で 37°C 40 分間インキュベートし消化させた。組織を HBSS で洗浄した後、6ml の培養液中に移し、18G 針で吸い込み粉碎させた。この組織液を 75cm² の培養フラスコに移し、インキュベーター (温度 37°C, 湿度 100%, 空気に 5%CO₂ を混合) で培養した。培養液には DMEM にグルタミン 580mg/L・グルコース 4500mg/L・10%ウシ胎児血清・ペニシリン 100U/ml・ストレプトマイシン 100 μ g/ml を混合し、3 日毎に交換した。

初代培養 1~2 週間後、培養容器壁に間隙なく細胞層を形成した所で、ベトリ皿に継代した。トリプシン処理で細胞浮遊液とし、細胞密度を約 1. 2~2. 0 \times 10⁵ 個/ml になるように希釈した。この細胞浮遊液をベトリ皿に 1ml 入れ培養した。培養した細胞は免疫組織学的に抗 GFAP (anti-gial fibrillary acidic protein) 抗体に染色されることで脳皮質星状膠細胞と同定した。

4) 一酸化窒素合成酵素の同定

この培養系に関与する一酸化窒素合成酵素のアイソフォームの同定を試みた。構成型一酸化窒素合成酵素には monoclonal anti-brain nitric oxide synthase (bNOS ; Sigma、USA)、誘導型一酸化窒素合成酵素には anti-inducible nitric oxide synthase (iNOS ; Sigma、USA) を用いた。培養細胞を 5%ヤギ血清含有 HBSS で洗浄した後、pH7.4 に調

整した過ヨウ素酸含有 PBS に移した。内因性ペルオキシダーゼ活性を抑制するために 3% ペルオキシダーゼで 5 分間反応させてから、リン酸緩衝液に移し、一次抗体 (bNOS 1: 3000、iNOS 1: 10000) を室温で 60 分間反応させた。リン酸緩衝液で洗浄した後、ビオチン化二次抗体を室温で 20 分間反応させた。リン酸緩衝液で洗浄した後、アピジン・ビオチンペルオキシダーゼ複合体と 20 分間反応させた。洗浄の後、顕微鏡で観察した。マウス血清を negative control、vimentin (Sigma, USA) を positive control とした。

5) 一酸化窒素合成酵素阻害剤の効果

一酸化窒素合成酵素阻害剤の効果をみるために、まず培養後 2 日目の網膜神経節細胞を用い、一酸化窒素合成酵素阻害剤で前処置した後に虚血負荷および興奮性アミノ酸負荷に晒した。それぞれの方法は以下の通りである。

(1) 一酸化窒素合成酵素阻害剤の前処置

網膜神経節細胞を、一酸化窒素合成酵素の選択的阻害剤である N ω -nitro-L-arginine (NA) で処理した。0~5mM の NA で 6 時間処理した後、虚血負荷および興奮性アミノ酸負荷を行った。

(2) 虚血負荷

網膜神経節細胞を虚血状態に暴露した。虚血状態は、無酸素ガス (95%N₂-5%CO₂) を密閉した容器内に 1~24 時間港流させて低酸素状態を維持した。培養液の酸素分圧は酸素感受性金属電極 (Diamond General, USA) を用いて測定した。酸素分圧は容器を密閉した後 30 分間で安定した。容器内の温度は温水を循環させ 37°C に維持した。低酸素状態にした後、培養皿をインキュベーターに戻して、低酸素負荷による遅発性神経細胞死の影響を考慮してさらに 24 時間培養してから観察した。

(3) 興奮性アミノ酸負荷

網膜神経節細胞に、興奮性アミノ酸のグルタミン酸と NMDA を負荷した。NMDA チャネルに対する膜電位依存性の特異的ブロックを防ぐために Mg イオンを除いた培養液に興奮性アミノ酸濃度が 10 μ M となるように調整した。対照となる細胞にはアミノ酸を除いた培養液を用いた。低酸素負荷と同様に遅発性神経細胞死の影響を考慮して、さらに 24 時間培養してから観察した。

6) 細胞の生死の判定

網膜神経節細胞の生存率は、死細胞を染色するトリバンプルーに染色されず培養皿の底部に付着しているかどうかで判定した。生存している網膜神経節細胞の数は、位相差顕微鏡下 200 倍の倍率で培養皿をそれぞれ 30 視野をカウントした。虚血や興奮性アミノ酸処理をしなかった対照も同様に行った。結果は、対照と比較した生存率を平均 \pm 標準偏差 (n = 培養皿の数) で表した。統計処理は Student's t-test を用いた。

III 結果

1. 網膜神経節細胞の標識

網膜神経節細胞は、DiI を注入後 2 日目の網膜の伸展標本で DiI で染色された細胞として確認された。DiI は細胞の形質膜や細胞質顆粒を染めた。神経膠細胞単層培養上で標識した網膜神経節細胞を 1 週間培養した後でも、DiI が細胞質内に顆粒状に染色されているのが確認できた。網膜神経節細胞浮遊液中の網膜神経節細胞の割合は約 200 分の 1 個であった。

2. 生存率

網膜神経節細胞は、脳皮質星状膠細胞上で長期間生存が可能であった。網膜神経節細胞は単層培養なしでは2~3日以上生存しなかった。培養後2日目では培養後2時間を100%とすると網膜神経節細胞は $35.3 \pm 3.4\%$ に減少していた。生存率は4日目で $25.1 \pm 1.6\%$ 、7日目で $17.4 \pm 3.2\%$ であった。

3. 一酸化窒素合成酵素の同定 (図4)

脳皮質星状膠細胞の単層培養は免疫組織学的に抗 bNOS 抗体には陽性を示し、抗 iNOS 抗体、negative control であるマウス血清には陰性を示した。

4. 虚血に対する一酸化窒素合成酵素阻害剤の効果

種々の濃度の NA (0, 1, 10, 100, 1000, 5000 μ M) で前処置した網膜神経節細胞を、低酸素 (O_2 濃度 2%以下) 状態で6時間培養した。NA を加えず低酸素処置したものの生存率は、低酸素処置しなかったものを対照として $31.0 \pm 3.1\%$ であった。

NA を加えると濃度依存性に生存率は上昇し、NA 濃度が 100 μ M で $61.4 \pm 9.3\%$ と最もよい生存率を示した。ただし、100 μ M 以上 NA 濃度をあげても生存率は改善しなかった。

虚血負荷時に NA 100 μ M で前処置した網膜神経節細胞の生存率は $30.1 \pm 3.1\%$ で、NA で前処置しなかった生存率 $11.0 \pm 2.3\%$ に比べ改善し、統計学的に有意差 ($p < 0.01$) を認めた。

5. 興奮性アミノ酸に対する一酸化窒素合成酵素阻害剤の効果

NA を 100 μ M 6時間前処理した網膜神経節細胞を、2種類の興奮性アミノ酸 (グルタミン酸 100 μ M・NMDA 100 μ M) で処理した。興奮性アミノ酸負荷した生存率は NMDA $30.6 \pm 3.3\%$ 、グルタミン酸 $27.7 \pm 10.0\%$ で、NA で前処理したものはそれぞれ $53.3 \pm 3.3\%$ 、 $68.8 \pm 1.6\%$ と統計学的に有意 ($p < 0.01$) に生存率が改善した。

IV 考察

培養海馬細胞は、虚血・低糖分負荷で興奮性アミノ酸を放出するが、初期の虚血により大量の興奮性アミノ酸が放出され、その後再灌流の際にさらに多くの興奮性アミノ酸が放出されることが報告されている。このシナプス間で放出されるグルタミン酸やアスパラギン酸などの興奮性アミノ酸の放出は、虚血性神経障害を招いていると推察されている。本実験においても虚血負荷や興奮性アミノ酸負荷で容量依存性に網膜神経節細胞の生存率の減少が認められた。

ラットの脳神経組織でグルタミン酸により NMDA 受容体を活性化させると、細胞内の一酸化窒素濃度が上昇することが知られている。Viga らは一酸化窒素が虚血の初期には細胞保護的に働き、再灌流時また再灌流後には細胞を障害させる可能性を示した。一酸化窒素合成酵素を含む神経細胞は nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) で選択的に染色される。一酸化窒素合成酵素は免疫細胞化学的に、また NADPH は組織化学的に、網膜の内境界膜に沿ったアマクリン細胞中に同定されている。アマクリン細胞で産生された一酸化窒素は網膜神経節細胞に拡散し、可溶性のグアニル酸シクラーゼを活性化させる。網膜神経節細胞中の cyclic GMP レベルはグアニル酸シクラーゼによって上昇し、cyclic nucleotide-gated non-selective cation channels を活性化させカルシウムイオンを流入させる。

今回の実験では培地として脳皮質星状膠細胞を単層培養したものをを用いたが、星状膠細

胞に一酸化窒素合成酵素が存在する。この培地における一酸化窒素合成酵素を免疫組織学的に同定したところ、アイソフォームは抗 bNOS 抗体陽性、抗 iNOS 抗体陰性であった。bNOS はカルシウムイオン依存性酵素であり、この培養系における虚血および興奮性アミノ酸障害にもカルシウムイオンチャンネルが関与していると考えられる。

一酸化窒素合成酵素阻害剤として知られている物質はいくつかあるが、実験によく用いられているのは NA と NG-monomethyl-L-arginine (MMA) である。両方ともその阻害効果にアイソフォーム間の特異性はほとんどない。NA は MMA より小脳切片で NMDA 負荷による cGMP 生成量を抑制したとの報告があり、今回は一酸化窒素合成酵素阻害剤として NA を使用した。

Nowicki らは、ハツカネズミの *in vivo* モデルで一酸化窒素合成酵素阻害剤が脳虚血を改善させ、その効果は NMDA 受容体拮抗剤の MK-801 より大きいことを報告している。In vitro では、脳皮質細胞培養系でも NA が虚血障害を軽減することが示され、NA の効果は L-arginine の濃度に反比例し、arginine を除去した培養液は NMDA による細胞死を予防すると報告されている。我々の実験でも、NA は培養網膜神経節細胞においても虚血および興奮性アミノ酸毒性を軽減させることが示された。

虚血および興奮性アミノ酸毒性を軽減する機序として、East らは、NA はグアニル酸シクラーゼ活性化を抑制し NMDA による cGMP の上昇を抑えることを示した。我々の実験でも網膜神経節細胞の生存率が上昇したことは、一酸化窒素合成酵素阻害剤が培地であるグリア細胞中の一酸化窒素合成酵素の活性を押さえ、cGMP の産生を減少させ、網膜神経節細胞へのカルシウムイオンの流入を阻止したためと考えられる。

また、Vige らは NA の神経保護作用は低濃度の時にしか認められないことを示したが、我々の実験でも同様に NA は 100 μ M までは濃度依存性に保護効果があるが、それ以上の濃度では、

、逆に障害作用を示した。

一酸化窒素合成酵素の機能は多岐にわたり、また完全に解明されていないが、中枢神経系での虚血や興奮性アミノ酸による障害に重要な役割を果たしていることは間違いない。今回の実験で、網膜の虚血や興奮性細胞毒性においても同様に一酸化窒素が関連していることが示された。

V 結論

一酸化窒素合成酵素阻害剤の神経保護作用の機序は不明な点が多いが、今回の結果より、一酸化窒素合成酵素阻害剤を前処置することで生存率の改善したことより、虚血や興奮性アミノ酸による神経細胞死には一酸化窒素が関与することが示された。

網膜再生と neuron-glia interaction

両生類などの下等動物では網膜の最周辺部にある毛様体縁部に網膜幹細胞が存在することが知られている。これらの生物では成体においても眼球の大きさに合わせて網膜が成長を続けている。そのため、網膜幹細胞の細胞分裂により、網膜神経細胞が新たにつくられ、既存の網膜神経細胞とネットワークを形成するといわれる。さらに、これらの網膜幹細胞は、特定の網膜神経細胞が障害されると、その神経細胞に分化して障害に補うよう作用するとされる。

成体哺乳類では、網膜は成長することではなく、障害された網膜神経細胞があっても、新たに網膜神経細胞が形成されることはない。そのため、網膜幹細胞は存在しないと考えられていた。しかし、成体マウス毛様体縁部の細胞を単離し、bFGF を添加した無血清培地で浮遊培養を続けると、単一の色素細胞が増殖して neurosphere を形成する。Neurosphere は、網膜神経細胞への分化を促進する培養条件に移行すると、網膜に特異的な神経細胞に分化することが報告された。このことから、成体哺乳類の毛様体縁部に網膜幹細胞の性質をもった細胞が存在することがわかった。Neurosphere は、bFGF を用いた浮遊培養によって形成されるが、poly-D-lysine でコーティングした生着し、BrdU や β -tubulin、GFAP に免疫組織学的に染色され、網膜神経細胞やグリア細胞に分化することがわかっている。そこで、neuron-glia interaction の観点から、培養グリア細胞上に、毛様体縁部から分離した細胞を散布し、網膜幹細胞として、網膜に特異的な神経細胞に分化するか否かを検討した。グリア細胞においては、ニューロトロフィンとして、NGF と BDNF が分泌され、サイトカインとして、VEGF、bFGF、TGF β の産生が確認されている。したがって、グリア細胞と網膜神経節細胞の間には、ニューロトロフィンとサイトカインを介して、neuron-glia interaction が形成されている。neuron-glia interaction が、網膜幹細胞の増殖、分化に寄与していることが想像される。

ラット毛様体から細胞を分離し、bFGF を添加して培養したところ、GABA 陽性細胞、アセチルコリン陽性細胞、tyrosine hydroxylase 陽性細胞、カルビンジン陽性細胞、グリア線維状酸性蛋白 (GFAP) 陽性細胞、Thy-1 抗体陽性細胞、vimentin 陽性細胞が出現した。

さらに、この培養系を用いて、培養液にニューロトロフィン (NGF、BDNF) やサイトカイン (VEGF、IGF、bFGF、PDGF) を組み合わせと濃度を違えて添加し、細胞の分化を試みた。しかしながら、培養7日の経過で、BDNF と bFGF を添加した培養系において、細胞の増殖がわずかに認められるのみであった。培養グリア細胞上に毛様体縁部から分離した細胞は、網膜に特異的な神経細胞に分化はするものの、培養液にニューロトロフィンやサイトカインを添加させて、細胞の増殖を促し、網膜に特異的な細胞への分化・誘導を試みたが、特異的な効果は得られなかった。今後は、遺伝子レベルでの操作を加えて、網膜幹細胞の分化・誘導を検討していく必要があると思われた。