

# 東邦大学学術リポジトリ

Toho University Academic Repository

タイトル	緑内障病態モデルマウスにおけるneuritinの神経保護作用の検討
作成者(著者)	安土, ゆり子
公開者	東邦大学
発行日	2020.03.15
掲載情報	東邦大学大学院理学研究科 博士論文 内容の要旨及び審査結果の要旨.
資料種別	学位論文
内容記述	主査: 齋藤 敦子 /
著者版フラグ	none
報告番号	32661甲第968号
学位記番号	甲第157号
学位授与年月日	2020.03.15
学位授与機関	東邦大学
メタデータのURL	<a href="https://mylibrary.toho u.ac.jp/webopac/TD64850201">https://mylibrary.toho u.ac.jp/webopac/TD64850201</a>

論文審査の要旨及び審査結果の要旨

2017年 入学	研究分野 環境科学	氏名 安土 ゆり子
審査委員	(主査) 准教授 齋藤 敦子 (副査) 教授 大越 健嗣 (副査) 教授 井関 正博 (副査) 講師 大谷 真志 (副査) 連携大学院客員教授 行方 和彦 (東京都医学総合研究所 副参事研究員)	
(論文題目) 緑内障病態モデルにおける neuritin の神経保護作用の検討		
(論文審査の要旨及び審査結果の要旨)  学位申請者である安土ゆり子は、正常眼圧緑内障の治療に有用な神経保護因子を見出すことを目的として、神経栄養因子である neuritin に着目し、緑内障病態との関わりについて調べた。neuritin 欠損マウスを用いて、正常眼圧緑内障の病態モデルである視神経挫滅モデルを作製し、網膜神経節細胞死への影響を検討した。この研究成果をまとめた学位論文は5章からなっている。  第1章は、本論文全体の序論であり、研究の背景と目的が記されている。緑内障は、網膜神経節細胞とその軸索である視神経の変性により不可逆的な視野欠損を呈する眼疾患であり、日本における中途失明原因の第一位を占める。緑内障の病態は、眼圧上昇による視神経軸索の変性と網膜神経節細胞死によって引き起こされるものと考えられてきたが、日本においては眼圧が正常であるにも関わらず緑内障を発症する「正常眼圧緑内障」が緑内障全体の約7割を占める。現在、正常眼圧緑内障を含む緑内障治療としてエビデンスのある唯一の方法は眼圧下降であるが、眼圧を十分に下降させても視野欠損が進行する症例が散見されることから、眼圧以外の病態寄与因子の解明や新たな神経保護療法の開発が求められている。一方 neuritin は、中枢神経系の発達や機能に必要とされるタンパク質であり、神経細胞以外にもグリア細胞を含む多様な細胞から分泌され、神経突起の形成や軸索の分枝および伸長、シナプスの形成などの機能を担っている。近年、neuritin が神経栄養因子として働き、脳虚血モデルマウスや外傷性脳損傷モデルラットにおいて神経保護的に作用することが報告されている。そこで申請者は、神経栄養因子である neuritin に着目し、neuritin 欠損マウスを用いて、正常眼圧緑内障の病態モデルである視神経挫滅モデルを		

作製し、網膜神経節細胞死への影響を検討することにした。

第2章では、研究方法の詳細が記されている。まず、野生型マウスに視神経挫滅を行い、処置後3, 5, 10, 15日目に網膜を採取し、リアルタイムPCRにより視神経挫滅後の *neurtin* mRNA の発現量変化を調べた。次に、野生型マウスおよび *neurtin* 欠損マウスにそれぞれ視神経挫滅を行い、以下の方法により網膜変性を比較した。まず、*in vivo* imaging である光干渉断層計 (SD-OCT) を用いて網膜内層 (GCC) 厚の測定を行った。次にマウス眼球から薄切病理切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色後、網膜神経節細胞層における細胞死を観察した。残存網膜神経節細胞数を計測するために、フルオロゴールドを用いた逆行性ラベリングを行った。フルオロゴールドラベリングの10日後に視神経挫滅を行い、視神経挫滅後7日目および14日目に灌流固定をして網膜を採取した。網膜を蛍光顕微鏡で観察し、フルオロゴールドで標識された網膜神経節細胞数を計測した。また視神経挫滅後3日目で網膜を採取し、細胞保護を促進するシグナルである Akt シグナルおよび ERK シグナルの活性を Western Blotting 法により調べた。

第3章及び第4章では、これらの研究の結果 (第3章) と考察 (第4章) が記されている。野生型マウス網膜における視神経挫滅後の *neurtin* mRNA 発現量変化を調べたところ、視神経挫滅後0日目に対して3日目および5日目には有意な発現量変化は見られなかった。一方、視神経挫滅後10日目および15日目にはそれぞれ0日目に対して *neurtin* mRNA の有意な発現量上昇が見られた。このことから、*neurtin* は網膜において視神経挫滅後の細胞死に関与している可能性が示唆された。

次に OCT による解析から、視神経挫滅後0日目においては、野生型マウスの GCC 厚と *neurtin* 欠損マウスの GCC 厚に有意な差は認められなかったが、視神経挫滅後7日目においては、いずれの系統でも GCC 厚の菲薄化が認められ、野生型マウスに対して *neurtin* 欠損マウスの GCC 厚が有意に菲薄化していることが分かった。ヘマトキシリン・エオジン染色を行った眼球切片における網膜神経節細胞層の残存細胞数を数えたところ、視神経挫滅後0日目には野生型マウスの細胞数と比較して *neurtin* 欠損マウスの細胞数に差は認められなかったが、視神経挫滅後7日目においては、いずれの系統でも細胞数の減少が認められ、残存細胞数は野生型マウスに対して *neurtin* 欠損マウスで有意に減少していた。また、フルオロゴールドで標識された網膜神経節細胞数は、視神経挫滅後0日目には野生型マウスの細胞数と比較して *neurtin* 欠損マウスの細胞数に差は認められなかった。7日目および14日目ではそれぞれ  $1441 \pm 142$  cells/mm<sup>2</sup>、 $1018 \pm 71$  cells/mm<sup>2</sup> であった。一方 KO マウスでは7日目が  $1046 \pm 74$  cells/mm<sup>2</sup>、14日目が  $790 \pm 64$  cells/mm<sup>2</sup> となり、野生型マウスよりも網膜神経節細胞数が減少していることが分かった。さらに Akt および ERK の活性は、無処置時の活性を 100% とした時、野生型マウスの視神経挫滅後3日目で

はそれぞれ  $154.7 \pm 23.7\%$  および  $191.3 \pm 25.6\%$  に上昇した。しかし neuritin 欠損マウスでの 3 日目の活性は Akt で  $101.8 \pm 13.1\%$ 、ERK で  $99.6 \pm 17.9\%$  と、いずれも活性の上昇が見られなかった。

以上の結果から、neuritin は Akt シグナルおよび ERK シグナルを介して視神経挫滅後の網膜神経節細胞の細胞死を抑制している可能性が初めて示された。

最終章の第 5 章では、第 2、3、4 章の結果から導かれる結論を簡潔に述べ、Neuritin の発現量を上げる薬の開発が、正常眼圧緑内障の新しい治療法に寄与する可能性を提示した。

論文審査では、実験内容、結果と考察、今後の展望について質問があり、全体として十分な実験データをもとにした合理的な考察がなされていると評価された。また、本研究成果は、国際学会を含む学会でのポスター発表 4 件と、国際学術雑誌への筆頭著者としての論文掲載 1 報がなされている。その他、申請者が関わった周辺領域の研究成果は、10 報(内 1 報は筆頭著者)の国際学術雑誌に論文として掲載されている。

以上のことから、全審査委員は、論文提出者の安土ゆり子が、博士(理学)の学位を受けるための十分な学力と資格を有することを認めた。

# 論文要旨

氏名 安土 ゆり子

論文題目 緑内障病態モデルマウスにおける neuritin の神経保護作用の検討

## 論文要旨

緑内障は日本における最大の中途失明原因であり、網膜神経節細胞とその軸索である視神経の変性を特徴とし、やがて回復不能な視野障害を引き起こす。緑内障の病態は眼圧上昇によって引き起こされるものと考えられていたが、日本では眼圧が正常であるにも関わらず緑内障症状を発症する「正常眼圧緑内障」が全体の約 7 割を占めている。現在の緑内障に対する治療法で、唯一エビデンスに基づいているものは眼圧下降であるが、その効果は限定的であることから、今後の正常眼圧緑内障の治療においては眼圧以外の病態寄与因子の解明や、直接的な神経保護療法の開発が求められる。

一方、neurtin は神経細胞に発現する GPI アンカー型タンパク質であり、発生期に神経細胞の突起形成や軸索の分枝・伸長を促進させる。また近年では新たに分泌型の neuritin が発見され、神経栄養因子として外傷性脳損傷や脳虚血に対して神経保護的に作用することが報告されている。しかし、緑内障病態下における neuritin の神経保護作用については不明な点が多い。そこで本研究では、緑内障の病態モデルである視神経挫滅モデルを用いて、neurtin 欠損マウスにおける視神経挫滅後の網膜神経節細胞死への影響を明らかにすることを目的とした。

Neurtin 欠損マウスでは、*in vivo* imaging である光干渉断層計による継時的な観察から、視神経挫滅後の網膜内層厚が野生型マウスに対して菲薄化することがわかった。また、網膜内層厚の菲薄化は網膜神経節細胞死によって引き起こされることから、フルオロゴールドを用いた逆行性ラベリングによる組織学的解析を行ったところ、neurtin 欠損マウスでは視神経挫滅後の網膜神経節細胞死が増大することが確認された。さらに神経細胞の保護に関与するシグナルである Akt と ERK1/2 の活性を Western Blotting 法により解析したところ、野生型マウスの網膜では視神経挫滅後に Akt と ERK1/2 の活性化がみられたが、neurtin 欠損マウスの網膜ではそれらの活性化は認められなかった。これらのことから、neurtin は Akt シグナルおよび ERK1/2 シグナルを介して視神経挫滅後の網膜神経節細胞死を抑制していることが示された。