

称号及び氏名	博士（獣医学）	見鳥 光
学位授与の日付	平成30年8月31日	
論文名	Studies on Pathogenesis of Retinal Excitotoxicity in Neonatal Rats (新生児ラットにおける網膜興奮毒性の病理発生に関する研究)	
論文審査委員	主査	山手 丈至
	副査	中村 洋一
	副査	長谷川 貴史

論文要旨

諸言

網膜は組織学的に10層の層構造を有し、多様な細胞が緻密なネットワークを形成し、相互作用することで視覚機能を担っている。ヒトにおいて視覚は外部情報を入力する上で大きな役割を果たしており、視覚機能の異常は著しくQOL（Quality of Life）を低下させる。網膜は非再生性の組織のため、視覚機能を低下させる網膜変性疾患は一旦進行すると治療が困難であり、その患者数は高齢化と共に増加傾向にある。また、医薬品の副作用として網膜障害が生じることがある。網膜毒性は回復性が乏しいこと、QOLへの影響が大きいことから医薬品を研究開発する上で大きな障壁となる。そのため、網膜変性疾患や網膜毒性といった視覚機能に異常をきたす病態の発生機序の解明はQOLの維持・向上のために非常に重要である。

ヒトにおいて網膜変性疾患（特に緑内障）の病態進行に興奮毒性の関与が示唆されている。

網膜興奮毒性の動物モデルの一つとして、グルタミン酸投与によるラット網膜障害がある。新生児ラットにグルタミン酸を投与すると網膜内層の菲薄化が生じるが、投与時の日齢により異なる網膜障害像を示すことが報告されている。

ラット網膜組織は生後も発育・分化を続け、生後約 3 週齢で完了するが、分化完了時期は網膜を構成する細胞により異なる。新生児ラット（5～9 日齢）にグルタミン酸を投与し、内顆粒層を構成するアマクリン細胞と双極細胞への影響を比較すると、早期に分化するアマクリン細胞はほとんどの細胞が消失したのに対し、分化時期の遅い双極細胞は影響が小さく、細胞数がやや減少したのみであった。この結果から、発育・分化過程にある網膜では両細胞のグルタミン酸に対する感受性が異なると考えられた。

しかし、新生児ラット網膜における興奮毒性感受性に関する詳細な知見は未だ乏しく、毒性病理学的な変化は十分には解明されていない。

本研究では、新生児ラットにおける網膜興奮毒性の病理発生を研究することで網膜変性疾患の治療法開発に貢献することを目指し、新生児ラットにおける網膜興奮毒性の病理組織学的解析（第 1 章）及び発現変動遺伝子の解析（第 2 章）を行い、それら結果を踏まえ、網膜興奮毒性に対する抗炎症剤の効果（第 3 章）を検証した。

第 1 章 新生児ラット網膜興奮毒性の病理組織学的解析

第 1 節 投与時日齢によるグルタミン酸感受性差

1～14 日齢の Crl:CD(SD)系ラットにグルタミン酸を単回皮下投与し、21 日齢時に眼球を採材し、組織学的検査に供すると共に、網膜中心部及び辺縁部の網膜各層の厚さを計測した。対照群では、日齢と共に網膜は発達し、21 日齢で成熟ラットとほぼ同様の組織像を示した。網膜の発達は辺縁部に比べ中心部で早かった。投与群では、1 日齢時投与ラットと対照群で差はみられなかったが、2～9 日齢時投与ラットでは、対照群に比べ、網膜の全域にわたって網膜内層（神経線維層～内顆粒層）が薄かった。菲薄化の程度は投与時の日齢が増すにつれ強くなり、8 日齢時投与ラットで最も顕著で、網膜内層をほとんど確認できなかった。10 日齢以降投与ラットでは対照群と明らかな差がなかった。なお、同一個体内では、辺縁部に比べ中心部で菲薄化の程度が強い傾向にあった。以上の結果から、2～9 日齢のラットでグルタミン酸誘発網膜毒性がみられ、8 日齢が最も強い感受性を示すことが明らかになった。

第 2 節 グルタミン酸誘発網膜興奮毒性の経時的变化

4, 6, 8, 10 及び 12 日齢の Crl:CD(SD)系ラットにグルタミン酸を単回皮下投与し、投与後 6 及び 24 時間、及び 21 日齢時に眼球を採材し、病理組織学的検査を実施した。また、投与後 6 時間の標本ではアポトーシス検出のために TUNEL 染色を加えた。投与後 6 時間では 4～8 日齢時投与群で網膜内層に核濃縮像がみられ、その一部が TUNEL 染色陽性を示した。投与後 24 時間では投与後 6 時間に比べ核濃縮像が減少し、僅かに残存するのみで、顕著な炎症細胞浸潤が認められた。21 日齢時では 4～8 日齢時投与群で網膜内層が菲薄化し、8 日齢時投与群で最も顕著であった。なお、10 及び 12 日齢時投与群に変化はなかった。

第3節 内顆粒層におけるグルタミン酸標的細胞の同定

4, 6, 8 及び 10 日齢の Crl:CD(SD)系ラットにグルタミン酸を単回皮下投与し、21 日齢時に眼球を採材後、各種免疫染色 (Pax6, Chx10, PKC α , Calbindin 及び Glutamine synthetase) を実施した。6 日齢時投与群で Pax6 陽性アマクリン細胞が減少し、8 日齢時投与群では Pax6 陽性細胞に加え、Chx10 陽性双極細胞及び PKC α 陽性桿体型双極細胞が減少し、Calbindin 陽性水平細胞は消失した。Glutamine synthetase 陽性ミューラー細胞数に変化はなかった。以上の結果から標的細胞は 6 日齢ではアマクリン細胞、8 日齢ではアマクリン細胞、双極細胞及び水平細胞であることが明らかになった。

第2章 網膜興奮毒性における発現変動遺伝子の解析

第1節 網羅的遺伝子解析

4 及び 8 日齢の Crl:CD(SD)系ラットにグルタミン酸を単回皮下投与後 6 時間で採材し、発現変動遺伝子を網羅的に解析した。4 日齢時投与ラットで 112 遺伝子、8 日齢時投与ラットで 174 遺伝子が 2 倍以上ないし 1/2 以下に発現が変動しており、その中で 68 遺伝子は両日齢で変動していた。Pathway 解析の結果、細胞死/細胞増殖に関連する遺伝子や炎症に関連する遺伝子の発現が増加し、神経発達に関連する遺伝子発現が減少していた。

第2節 投与時日齢による遺伝子発現の変化

4, 6, 8, 10 及び 12 日齢の Crl:CD(SD)系ラットにグルタミン酸を単回皮下投与し、投与後 6 時間で採材し、第 1 節で発現変動が確認された遺伝子の中でアポトーシス関連遺伝子 (*Gadd45b*, *Nfkb1a*, *Xdh*) 及びケモカイン遺伝子 (*Cxcl2*, *Ccl2*, *Ccl3*) の発現量を Real-time PCR にて解析した。*Gadd45b* 及び *Ccl3* は組織学的に顕著な障害が認められた 6~8 日齢で変動率が大きく、10 及び 12 日齢では変動率が小さかった。*Gadd45b* は網膜興奮毒性によるアポトーシスに関与し、*Ccl3* は投与後 24 時間に認められる炎症細胞浸潤に寄与している可能性が示された。

第3章 網膜興奮毒性に対する抗炎症剤の効果

第 1 章で 8 日齢にグルタミン酸を単回皮下投与すると投与後 24 時間では少数の核濃縮像と顕著な炎症細胞浸潤が認められたが、内顆粒層の細胞は多数確認された。一方、8 日齢投与ラットの 21 日齢では内顆粒層を含む網膜内層はほとんど確認されなかった。以上から、炎症がグルタミン酸誘発網膜障害を増悪させていると仮説をたて、第 2 章で炎症との関連が示唆された *Ccl3* 受容体である *Ccr1* 及び *Ccr5* 阻害剤ないし Prednisolone 投与によってグルタミン酸誘発網膜障害が軽減するか検証した。6 日齢の Crl:CD(SD)系ラットにグルタミン酸を単回皮下投与し、グルタミン酸投与 2 時間前及び 4 時間後に BX471 (*Ccr1* 阻害剤), Maraviroc (*Ccr5* 阻害剤), Prednisolone をそれぞれ皮下投与した。グルタミン酸投与後 24 時間及び 21 日齢で採材し、病理組織学的検査を実施すると共に、

網膜中心部及び辺縁部の網膜内層の厚さを計測した。グルタミン酸投与後 24 時間ではグルタミン酸投与によって顕著な炎症細胞浸潤がみられ、各薬剤を投与することで炎症細胞浸潤が軽減した。21 日齢ではグルタミン酸投与によって網膜内層が菲薄化するが、各薬剤を投与することによる網膜菲薄化への影響は認められなかった。

まとめ

新生児ラットを用いた網膜興奮毒性モデルの病理組織学的解析及び遺伝子解析を実施し、各日齢でのグルタミン酸感受性の違い及び標的細胞を同定し、グルタミン酸投与による遺伝子発現変動を明らかにした。この一連の研究から、以下の成績を得た。

- 1) 2～9 日齢のラットでグルタミン酸誘発網膜障害がみられ、8 日齢が最も強い感受性を示した。
- 2) グルタミン酸投与直後に網膜内層にアポトーシスが誘導され、網膜が菲薄化した。
- 3) 内顆粒層におけるグルタミン酸標的細胞は 6 日齢ではアマクリン細胞、8 日齢ではアマクリン細胞、双極細胞及び水平細胞であった。
- 4) 各日齢でグルタミン酸を投与した際に網膜において変動する遺伝子を明らかにし、Gadd45b は網膜興奮毒性によるアポトーシスに関与し、Ccl3 は炎症細胞浸潤に寄与している可能性が示唆された。
- 5) 抗炎症剤投与はグルタミン酸投与による網膜菲薄化に影響しなかった。
- 6) 以上、得られた成果は網膜変性疾患の病態解明の一助となる有用な知見を提供する。

審査結果の要旨

外部情報を視覚的に入手する上で網膜は重要な感覚組織である。その網膜は非再生性の組織のため、視覚機能を低下させる網膜変性疾患は、ヒトにおいて **QOL (Quality of Life)** を著しく低下させる。医薬品の副作用として網膜障害が生じることがあり、それ故に網膜毒性は医薬品を研究開発する上で大きな障壁となる。ヒトにおいて網膜変性疾患の病態進行に興奮毒性の関与が示唆されている。網膜興奮毒性の疾患モデルの一つとして、グルタミン酸投与による新生児ラット網膜障害がある。このモデルでは網膜内層の菲薄化が特徴的に生じることが知られているが、投与時の日齢により異なる網膜障害像を呈するとさ

れる。しかし、新生児ラット網膜における興奮毒感受性細胞やその病理発生機序に関する詳細な知見は未だ乏しい。

この一連の研究では、グルタミン酸を投与した新生児ラットを用いて、網膜興奮毒性の病理組織学的解析に加え、特異的な発現変動遺伝子を追究することで、この毒性発現に関する新たな知見を提示している。

第1章では、網膜興奮毒性の病理組織学的解析を主体に研究を行っている。第1節では、1~14日齢の新生児ラットにグルタミン酸を単回皮下投与（2.4 M溶液を10 μ L/g体重で投与）し、21日齢で採材し、日齢による感受性差を解析している。その結果、1日齢時投与ラットには対照群との間で差はみられなかったが、2~9日齢時投与ラットでは、網膜の全域にわたって網膜内層（神経線維層~内顆粒層）が菲薄化していた。菲薄化の程度は投与時の日齢が増すにつれて強くなり、8日齢時投与ラットで最も顕著で網膜内層をほとんど確認できなかった。10日齢以降投与ラットでは対照群との差は軽微であった。以上の結果は、2日齢時以降のグルタミン酸投与ラットで網膜興奮毒性が生じ、特に8日齢時投与で最も強い感受性を示すことを明らかにしている。第2節では、4、6、8、10及び12日齢のラットにグルタミン酸を同様に投与し、投与後6と24時間、及び21日齢時で出現する網膜の変化を解析している。その結果、4~8日齢時投与では投与後6時間で網膜内層にTUNEL染色陽性の核濃縮像がみられ、投与後24時間では核濃縮像が減少し、炎症細胞浸潤が生じることが分かった。以上の成果は、グルタミン酸投与直後に網膜内層にアポトーシスが誘導され、その後炎症細胞が反応し、網膜の菲薄化が進行することを明らかにしている。第3節では、4、6、8及び10日齢のラットにグルタミン酸を同様に投与し、21日齢での網膜内顆粒層におけるグルタミン酸の標的細胞を免疫組織化学的に解析している。その結果、6日齢時投与群でPax6陽性アマクリン細胞が減少し、8日齢時投与群ではPax6陽性細胞に加え、Chx10陽性双極細胞及びPKC α 陽性桿体型双極細胞が減少し、calbindin陽性水平細胞は消失していることが分かった。なお、この実験ではglutamine synthetase陽性ミューラー細胞数に変化はなかった。以上の結果から、グルタミン酸の標的細胞は、6日齢ではアマクリン細胞、8日齢ではアマクリン細胞、双極細胞及び水平細胞であることを明らかにしている。

第2章では、網膜興奮毒性での特異的な発現変動遺伝子を解析している。第1節では、4及び8日齢のラットにグルタミン酸を同様に投与し、投与後6時間で採材した網膜を用いて網羅的遺伝子発現解析を実施している。その結果、4日齢時投与ラットで112遺伝子、8日齢時投与ラットで174遺伝子が2倍以上ないし1/2以下に発現が変動し、その中で68遺伝子は両日齢で共通した変動を示すことが分かった。変動遺伝子の機能的なpathway解析により、細胞死/細胞増殖あるいは炎症に関連する遺伝子の発現が増加し、神経発達に関連する遺伝子発現が減少していることが示された。第2節では、4、6、8、10及び12日齢のラットにグルタミン酸を同様に投与し、投与後6時間の組織を用いてアポトーシス関連遺伝

子 (*Gadd45b*, *Nfkb1a*, *Xdh*) 及びケモカイン遺伝子 (*Cxcl2*, *Ccl2*, *Ccl3*) の発現量を **real-time PCR**にて解析し、*Gadd45b*及び*Ccl3*は組織学的に顕著な網膜変性が認められる**6**及び**8**日齢で変動が大きいことを見出した。以上の結果は、第**1**章第**2**節で明らかにした組織学的所見と併せて考えると、*Gadd45b*は網膜興奮毒性によるアポトーシスに関与し、*Ccl3*は炎症細胞浸潤に寄与していることを示唆している。

第**3**章では、**6**日齢のラットを用いて、グルタミン酸投与**2**時間前及び**4**時間後に*Ccl3*受容体である**Ccr1**及び**Ccr5**阻害剤ないし**prednisolone**を投与し、グルタミン酸投与後**24**時間及び**21**日齢で網膜を病理組織学的に解析することで、網膜興奮毒性に対する抗炎症効果を検証している。その結果、投与後**24**時間ではグルタミン酸投与による炎症細胞浸潤が、それぞれの抗炎症剤を投与することで軽減したが、**21**日齢での観察ではグルタミン酸投与による網膜菲薄化への影響は各薬剤において認められなかった。以上の結果は、グルタミン酸投与による網膜菲薄化は炎症とは関連しない進行性の病態であることを示唆している。

本研究では、新生児ラットにグルタミン酸を投与することで誘発した網膜興奮毒性の病態を病理組織学的及び遺伝子発現解析により追究することで、網膜毒性の病理発生機序の一端を明らかにしている。この研究成果は、獣医学・医学、特に毒性病理学・実験動物学の研究分野の新たな展開に資するものであり、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。