

## 8. 神経保護薬と軸索伸長薬の併用による中枢神経再生の新しい試み

研究者：(代表) 門本 卓 (医学部・医学科 5年)

笠原 美優 (医学部・医学科 5年)

指導教員：郡山 恵樹 (金沢大学医薬保健研究域医学系・脳情報分子学 助教)

### 1、背景と研究目的

我が国において高齢人口の増加にともない糖尿病網膜症や緑内障による失明が急増しており、それらの病態原因の解明や治療薬の開発が急がれる。特にそれら疾病の最終病態は網膜神経節細胞のアポトーシスとよばれる細胞死と視神経の脱落であるため積極的にアポトーシスを抑制する作用と視神経の脱落回避、あるいは神経再生の作用をもつ治療薬が必要とされる。

ほ乳類中枢神経は損傷後、再生できないことが広く知られている。その理由は損傷後急速に起こるアポトーシスと神経再生分子の欠如にある (Homma et al., 2007, Koriyama et al., 2007)。そこで、強力な神経保護・生存作用を有する新規生理活性物質、N-β-アラニル-5-S-グルタチオニル-3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン (5-S-GAD, Koriyama et al., 2008) と強力な中枢神経再生効果を有する魚類由来新規タンパク質、プルプリン (Matsukawa et al., 2004) を組み合わせると損傷した神経細胞の保護、生存を高め、かつ軸索再伸長させるという理想的な神経再生が促されるのではないかと考え、この説を実証するために本実験をおこなった。

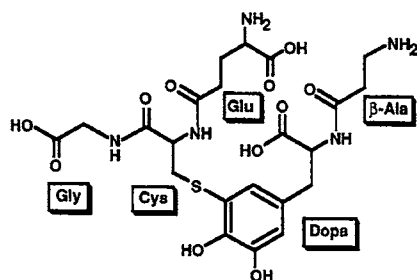


図1. 5-S-GAD の構造

### 2、研究方法

#### ・実験材料と視神経損傷

ラット (SD 350 g) は麻酔後、眼球より 1 cm 以内の視神経をピンセットにより 10 秒間クラッシュさせた。生体内への薬物投与はマイクロシリンジを用いた各薬物眼球内注射により行なった。網膜組織および視神経は眼球、視神経摘出後、4% パラホルムアルデヒドにより固定し、12 μm の凍結切片を作製した。

- TUNEL (TdT-mediated dUTP nick-end labeling) 染色

DNA 損傷をとまなうアポトーシスの検出には TUNEL 法を用いた。網膜組織切片にターミナルトランスフェラーゼと蛍光標識された dUTP 溶液を滴下し 37°C、一晩インキュベート後、蛍光顕微鏡下で観察・評価した。

- 網膜神経細胞死の評価

興奮性アミノ酸 NMDA および視神経損傷で誘導される網膜神経節細胞のアポトーシスは TUNEL 法による陽性細胞カウントした。また、エオジン・ヘマトキシリン染色による神経節細胞のカウント、内網膜層の厚さ測定によって行なった。

- 網膜神経節細胞株および網膜組織切片の培養

網膜神経節細胞株の培養は DMEM 培地と 35 mm ディッシュを用いた。スタウロスポリンによる分化誘導と同時に各薬物を処理し、伸長された軸索の長さを画像解析ソフトにより評価した。

網膜組織切片の培養はコラーゲンゲルを用いた 3 次元培養により行なった。

- 視神経再生効果

視神経損傷と同時に各薬物を眼球内投与した。8 日後に神経トレーサーであるコレラトキシン B を眼球内投与し、再生された神経節細胞軸索に 2 日間取り込ませた。視神経摘出、固定、薄切後、免疫染色を行なった。

- 免疫組織化学染色

視神経切片をクエン酸バッファーで処理後、リン酸緩衝液で洗浄した。3%の牛血清アルブミンでブロッキングし、コレラトキシン B 抗体で 4°C、一晩処理した。洗浄後、蛍光標識された二次抗体で 1 時間インキュベートして蛍光顕微鏡下で観察、撮影した。

### 3、結果と考察

ラット緑内障モデルとして興奮性アミノ酸 NMDA 毒性および視神経損傷毒性モデルを用いた。

眼球に NMDA を投与後 1 週間で網膜神経節細胞に TUNEL 陽性のアポトーシスが検出された。また、5-S-GAD (0.1 μM) は NMDA によるアポトーシスを著しく軽減した (図 2)。エオジン・ヘマトキシリン染色後の各薬物処理網膜における神経節細胞数を定量化すると統計学的にも有意に 5-S-GAD が NMDA による網膜神経節細胞死を抑制していることが分かった。また NMDA 毒性特異的に起こる内網膜層の萎縮も 5-S-GAD により有意に回復することから NMDA の網膜神経節細胞死を回避していることが示唆された。

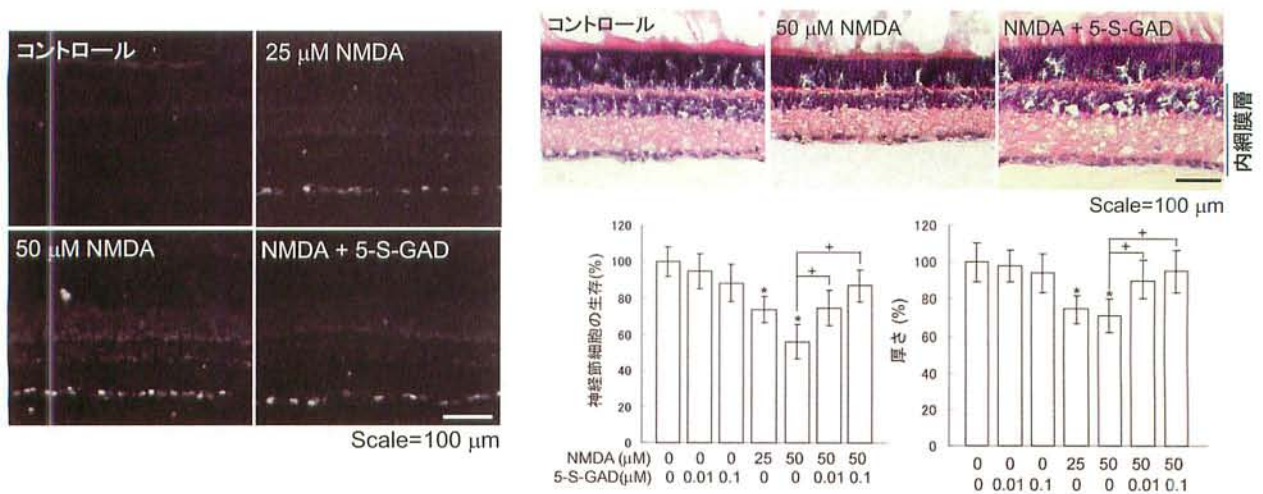


図 2. 5-S-GAD による NMDA 毒性の軽減

また、分化誘導させた網膜神経節細胞株の培養下に 5-S-GAD を添加させても軸索伸長に影響がなかったことから 5-S-GAD には網膜神経節細胞の軸索伸長効果がないことがわかった。

一方、魚類由来のプルプリンは分化誘導させた網膜神経節細胞株の軸索伸長を有意に促進させた(図 3)。同様にラット網膜組織片培養においてもプルプリンはコントロールに対して著しい軸索伸長を示した。

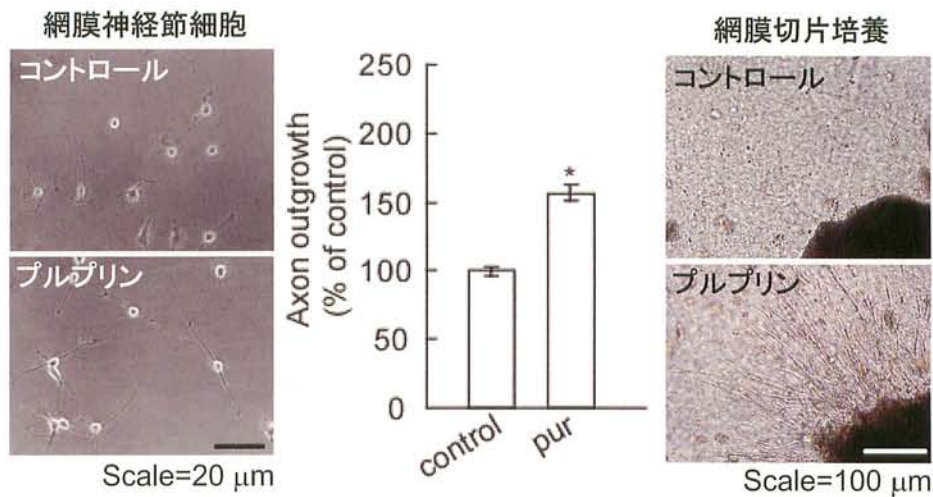


図 3. プルプリンによる網膜神経節細胞および網膜組織片の軸索伸長効果

次に、プルプリンによる視神経再生効果と 5-S-GAD の同時添加によるその相加効果を視神経損傷後のコレラトキシン B による免疫組織化学染色により評価した(図 4)。プルプリン単独は著しい視神経再生を誘導させた。またプルプリンと 5-S-GAD の同時投与はプルプリン単独に加え少しではあるが視神経再生を増強させた。

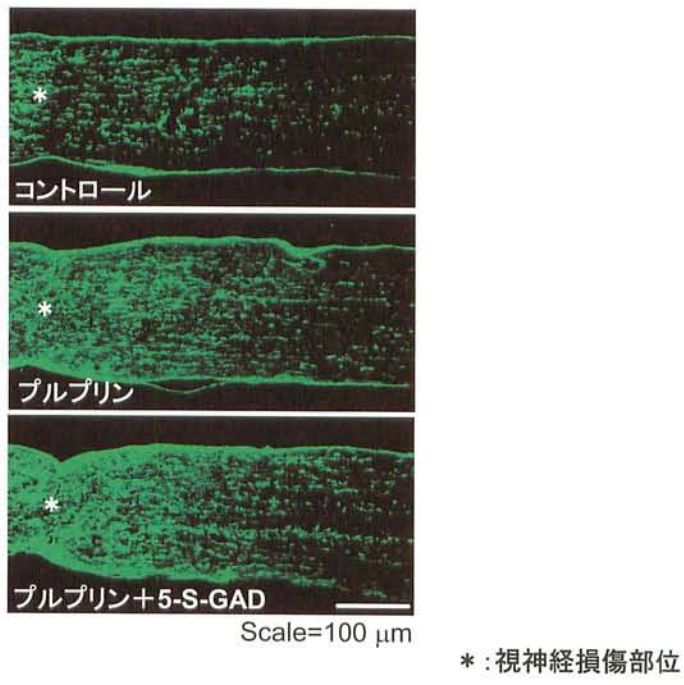


図 4. プルプリンによる視神経再生と 5-S-GAD によるその相加効果

網膜神経節細胞保護薬 5-S-GAD と神経再生薬プルプリンの併用がプルプリンの視神経再生とさほど差が無かった理由のひとつにプルプリンも生存促進効果をもつことが考えられた。プルプリンは視神経損傷後の網膜神経節細胞死を大幅に減少させた(図 5)。

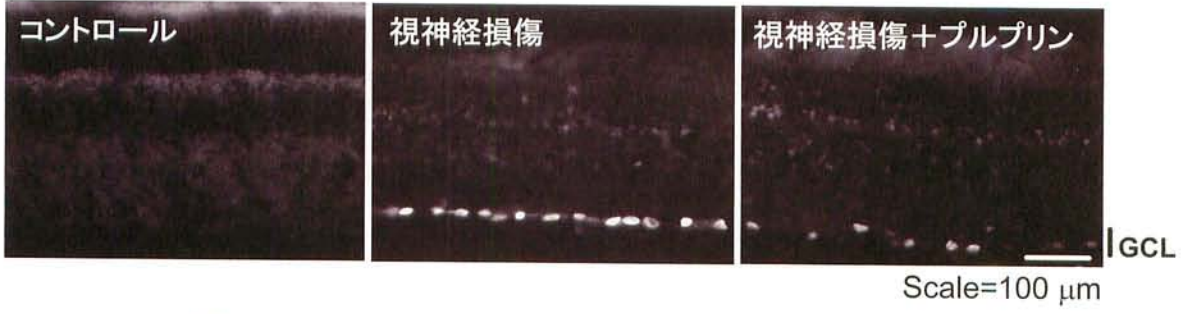


図 5. プルプリンによる神経損傷後神経節細胞死に対する保護作用

#### 4、結論

これらをまとめると以下のような結果となった。

- 5-S-GAD はアミノ酸興奮性毒性および視神経損傷後細胞死に対して強い抑制効果を示した。
- 5-S-GAD は網膜神経節細胞において軸索伸長効果を持たない。
- プルプリンは網膜神経節細胞および網膜組織片において著しい軸索伸長効果を有する。また、プルプリンの眼球内投与は強い視神経再生効果を示した。
- さらに、5-S-GAD とプルプリンの眼球内投与はプルプリン単独に比べ視神経再生を促進させた。

これらのことから神経細胞の生存効果と神経再生分子の軸索伸長効果の両作用をもつ分子は神経保護薬あるいは神経再生薬として臨床応用が期待できる。

また、神経細胞生存・軸索伸長の機能をもつ分子による再生効率上昇は緑内障のみならず脊髄損傷といった難治性中枢神経疾患治療薬の開発に大きく貢献できると考える。

#### 5、参考文献

- Koriyama Y, Tani H, Ohno M, Kimura T, Kato S., A novel neuroprotective role of a small peptide from flesh fly, 5-S-GAD in the rat retina in vivo. *Brain Res.*, **1240**, 196-203 (2008)
- Koriyama Y, Homma K, Sugitani K, Higuchi Y, Matsukawa T, Murayama D, Kato S. Upregulation of IGF-I in the goldfish retinal ganglion cells during the early stage of optic nerve regeneration. *Neurochem. Int.*, **50**, 741-748 (2007)
- Homma K, Koriyama Y, Mawatari K, Higuchi Y, Kosaka J, Kato S. Early downregulation of IGF-I decides the fate of rat retinal ganglion cells after optic nerve injury. *Neurochem. Int.*, **50**, 749-756 (2007)
- Matsukawa T, Sugitani K, Mawatari K, Koriyama Y, Liu Z, Tanaka M, Kato S. Role of Purpurin as a retinol-binding protein in goldfish retina during the early stage of optic nerve regeneration: its priming action on neurite outgrowth., *J. Neurosci.*, **24**, 8346-8353 (2004)