

9. 哺乳類網膜神経節細胞における 生存シグナルによる視神経再生の試み

(代表) 大武陽一 森下慧子 (医学部医学科 5年)

指導教員

加藤 聖 (医学系研究科脳医科学専攻 教授)

1. 背景と研究目的

近年、中枢神経疾患、脊髄損傷、緑内障などといった疾患に対し、対症療法の報告は多いもののそれらを根治する方法は見つかっていない。哺乳類中枢神経が再生しない理由は、中枢神経損傷後直ちにアポトーシスという細胞死を引き起こすためといわれている。

一方、1950年代 Sperry らにより、金魚は視神経を損傷させても再生する能力があることを報告した。しかし、その神経軸索再生の分子機構はほとんど明らかになっていない。本研究は、金魚とラットにおいて視神経損傷後にどのようなシグナルが異なっているかを、特に生存シグナルについて比較検討し、ラットに欠失する因子を補充して視神経再生を試みることを目的とした。また、中枢神経損傷モデルとして網膜からその中枢である視蓋まで伸びる視神経を用いた。

2. 研究方法

・実験材料と視神経損傷

金魚(体長 6-7 cm) とSD ラットはいずれも麻酔後、眼球より 1mm 以下の視神経をピンセットにより 10 秒間クラッシュさせた。

・神経節細胞のカウント

眼球摘出後、4%パラホルムアルデヒドにより固定し、10-12 μ m の凍結切片を作成した。金魚網膜切片は DAPI 染色により神経節細胞層の細胞数をカウントした。ラットの網膜切片は神経節細胞を特異的に認識する、抗チューブリン β III 抗体を用いた免疫組織化学染色により染められた細胞数をカウントした。

・カスパーゼ3の活性測定

視神経損傷後の金魚およびラットの網膜は Tris - HCl バッファーでホモジナイズし、15,000 rpm、1hr、4℃で遠心した上清をサンプルとした。カスパーゼ3の特異的な基質に蛍光標識した Ac-DEVD-AMC とサンプルを 37℃、1hr、インキュベートし、蛍光強度を測定した。

・免疫組織化学染色

視神経損傷後の網膜切片をクエン酸バッファーで処理後、PBS で洗浄した。3% の牛胎児血清でブロッキングし、各一次抗体で4℃、一晚処理した。洗浄後、ビオチン化した二次抗体で1hr、インキュベートしストレプトアビジンを付加させ、発色基質で可視化させた。一次抗体には、抗 p-Akt 抗体、抗 IGF-I 抗体を用いた。

・ラット網膜組織片培養

ラット麻酔後、眼球を摘出して網膜を無菌的に採取する。網膜は0.5 mm 四方に切断し、10% FCS 含有のDMED/F-12 培地を用いて、コラーゲンゲル中にまいた。網膜組織片を1時間静置後、100 nM となるようにIGF-I で処理を行い、5日目に観察および写真撮影を行った。

3. 結果と考察

ラット網膜は視神経損傷、抗チュブリンβ III抗体を用いた免疫組織化学染色により陽性を示した細胞数をカウントしたところ、6日目より有意に神経節細胞の数が減少することが分かった。一方金魚の視神経損傷後、神経節細胞層の細胞数は30日まで変化がなかった。このことからラットでは視神経損傷後に神経節細胞がアポトーシスを起こして減少するが、金魚ではアポトーシスを起こさずに生存が維持されることが示唆された(図1)。

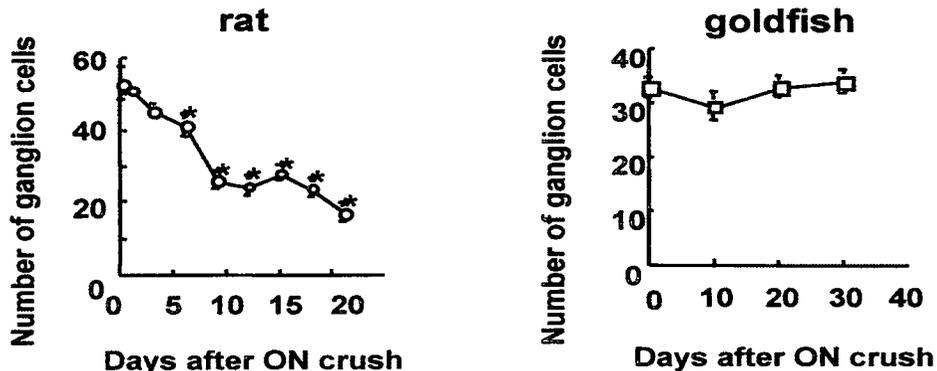


図1 視神経損傷後の神経節細胞のアポトーシス/生存

そこで、アポトーシスシグナルの最も下流で、働くことが知られているカスパーゼ3の活性を両動物の視神経損傷後網膜をサンプルとして測定した。

ラットでは、視神経損傷した4日目よりカスパーゼ3の活性が上昇し、6日目でピークとなった。一方金魚では、10-20日目にカスパーゼ3の活性は有意に低下し、30日目ではコントロールレベルまで戻った。これらのことから、ラットおよび金魚の視神経節細胞の生死には、視神経損傷後のカスパーゼ3の活性化が大きく関わっていることが示された。

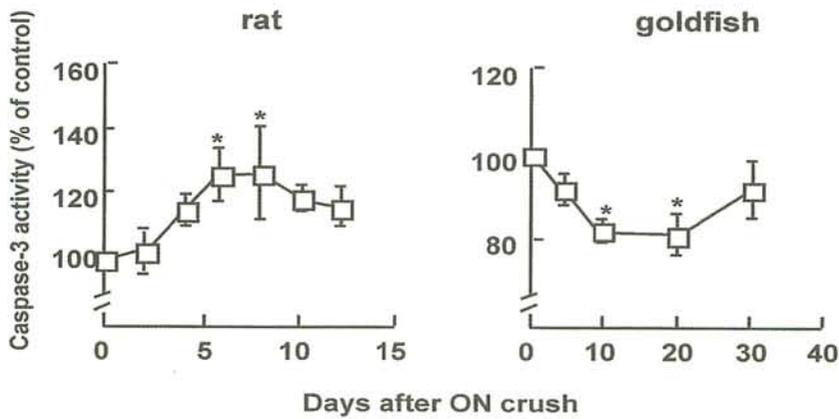


図2 視神経損傷後のカスパーゼ3の活性化

アポトーシスは、その上流にある生存シグナル(Akt)の活性化(p-Akt)によって抑えられ、その活性の有無が細胞の生死を分けることが知られている(図3)。そこで p-Akt 抗体を用いた免疫組織化学染色により、視神経損傷後のラットおよび金魚網膜の p-Akt の活性と局在を調べた。ラット網膜切片では視神経損傷前、神経節細胞に局在していた p-Akt 活性化は6日目で著しく低下していた。一方、金魚網膜では、視神経損傷前ではみられなかった p-Akt 活性化が、視神経損傷後5日目に、神経節細胞で強くみられた。よってラットの視神経損傷後、神経節細胞死が誘導されるのは p-Akt の活性化が抑制されているからであり、金魚では p-Akt の活性化が神経節細胞の生存を維持していることが考えられた。

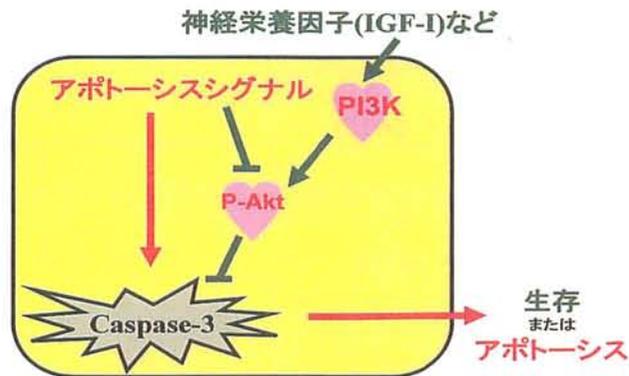


図3 生存シグナルとアポトーシスシグナル

細胞の生存シグナルの活性化は、insulin-like growth factor I (IGF-I) を代表とする神経栄養因子の増加によって起こることが知られているので、IGF-I 抗体を用いた

ウェスタンブロット法と免疫組織化学染色により、視神経損傷後の量的変化と局在を調べた。ラットでは視神経損傷後3日目に、主に神経節細胞で IGF-I の量が著しく減少していた。一方、金魚ではウェスタンブロット法により、視神経損傷後1-2日目は IGF-I の増加が見られ、5日目で約2倍のピークとなることがわかった。さらに、その変化は主に神経節細胞で見られた。

これらのことから、視神経損傷後にラットでは、IGF-I の量が減り、金魚では増えることが、その後の p-Akt の活性化およびカスパーゼ 3 の活性化の有無を引き起こし、神経節細胞の生死を分けていることが予想された。

我々はラット網膜組織片を培養し、培地中にラットで減少する、IGF-I を補充すれば神経節細胞からの突起進展が可能になるのではないかと考えた。その結果、対照群ではほとんど神経突起進展は確認できなかったが、100 nM IGF-I 処理によって著しい突起進展がみられた。

4. 結論

これらの結果と、これまでの仮説は図 4 のようにまとめられる。

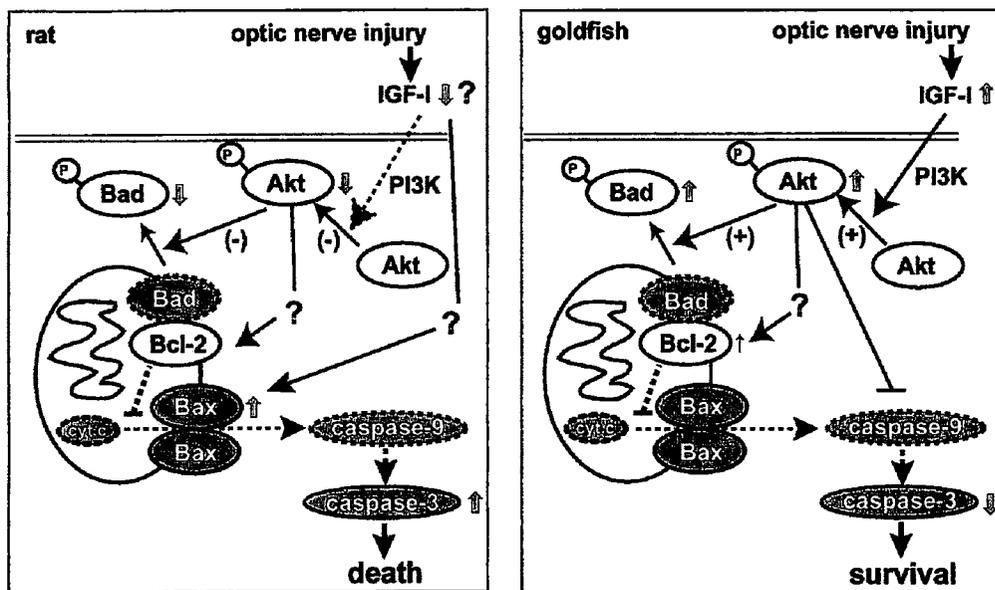


図 4 ラットおよび金魚視神経損傷後のシグナルの違い

まとめると、ラットでは視神経損傷後

- ・ IGF-I の量が減少する。
- ・ p-Akt の活性化が低下する。
- ・ カスパーゼ 3 の活性化が起こる。

以上より神経節細胞がアポトーシスを誘導するため、視神経の再生が起こらない(図 2 左)。

一方金魚では視神経損傷後

- ・ IGF-I の量が増加する。
- ・ p-Akt の活性化が起こる。
- ・ カスパーゼ 3 の活性化が抑制される。

以上により、神経節細胞がアポトーシスを回避し、視神経の再生が維持されている(図 2 右)。

さらに、ラット網膜組織片培養に IGF-I を添加したところ、神経突起進展が促されたことが、それらの結論を強めた。

これらのように、神経再生が起こる動物の神経損傷後にはたらくシグナルを精査し、神経再生できない動物に応用し、近年増加傾向にある中枢神経疾患、脊髄損傷、緑内障治療に役立てられることを期待する。