



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	乙第1848号
学位記番号	論 第1630号
氏名	三宅 孝知
授与年月日	平成 26年 12月 25日
学位論文の題名	Possible implications of acid-sensing ion channels in ischemia-induced retinal injury in rats (ラット網膜虚血傷害に対する酸感受性イオンチャネル作用の検討) Japanese Journal of Ophthalmology. Jan;57(1):120-5. 2013
論文審査担当者	主査： 鶴川 眞也 副査： 飛田 秀樹, 小椋 祐一郎

論文内容の要旨

網膜静脈閉塞症や糖尿病網膜症などの網膜虚血性疾患は、しばしば重篤な視機能低下を招く。これらの疾患に起因する一過性および慢性の毛細血管閉塞は、虚血部位およびその周辺において網膜浮腫や血管新生を引き起こし、広範な重度虚血の場合、神経細胞死による神経網膜変性をも惹起する。

脳の虚血では、神経細胞や神経膠細胞は、ATPの減少とそれに伴う $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPaseの機能不全により脱分極する。その結果、グルタミン酸が過剰放出され、再取り込み機構も働かなくなることから、シナプス間隙にグルタミン酸が蓄積する。この高濃度細胞外グルタミン酸は、シナプス後 *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体を過剰に活性化し、細胞内に過度の Ca^{2+} 流入を引き起こすことで神経細胞死を招く。しかし、最近の臨床研究では、NMDA受容体拮抗剤は脳虚血傷害に対して効果的ではなかった。同様に、NMDA硝子体内注射は網膜神経細胞死を起こすが、一過性網膜虚血眼でNMDA受容体を阻害しても網膜神経保護効果は不完全であった。これらの結果は、虚血による組織障害に他の機序が関与していることを示唆している。

酸感受性イオンチャネル遺伝子ファミリー (acid-sensing ion channels: ASICs) は感覚器を含む神経系に広く発現し、水素イオンによって活性化される陽イオンチャネルをコードしている。ASICsは4つの機能的なサブユニット (ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, ASIC3) とそれ自身は不活性である2つの調節的なサブユニット (ASIC2b, ASIC4) から構成される。ASICsは Na^+ に強い選択性を示すが、ASIC1aは Ca^{2+} にも透過性を示すため、ASIC1aの発現細胞ではASIC1aの活性化で Ca^{2+} 毒性が生じている可能性がある。一般的に、虚血部位では嫌気性糖代謝が優位になり、乳酸の蓄積とATPの加水分解に伴う水素イオンの放出が起こり、病変局所のpHが低下する。ASICsは局所的アシドーシスにおいて活性化されることから、虚血による組織傷害において重要な役割を果たしていると考えられる。

これまでの脳虚血研究では、虚血によるアシドーシスがASICsを持続的に活性化させ神経の変性を引き起こすことが示唆されている。アシドーシスでは、細胞外の H^+ が持続的に局所のASICsを活性化し、 Na^+ 、 Ca^{2+} の流入過剰により細胞障害を起こす。また、ASIC阻害剤であるアミロライドが脳虚血モデルにおいて脳障害を抑制したという報告や、ASIC1aノックアウトマウスの脳が虚血に対し耐性を示したという報告もある。このように、ASICsは虚血による組織障害に関与し、ASIC1aは脳虚血における Ca^{2+} 毒性にも関与する重要なチャネルである。

ASICsは視細胞をはじめ網膜内の細胞にも発現していることが報告されている。本研究では、網膜虚血におけるASICsの関与を調べるため、網膜虚血の動物モデルを使って、アミロライドの網膜神経保護効果を検討した。

ラットの右眼の視神経を60分間直接結紮することにより一過性の網膜虚血を誘導した。視神経結紮直前に2.4 mMアミロライド $2.5\mu\text{l}$ (予想される硝子体内濃度 $100\mu\text{M}$)を硝子体内注射した。7日後に網膜傷害の程度を組織学および網膜電図を用いて検討した。

一過性網膜虚血により網膜内層の菲薄化を伴って網膜変性が生じた。アミロライド投与により著明に網膜の菲薄化は抑制された。網膜電図でも一過性網膜虚血によるa波、b波の振幅の低下はアミロライド投与により著明に改善した。

本研究では、アミロライドの効果により、ASICs が網膜虚血による神経変性において何らかの役割を担っていることが示唆された。ASICs の阻害が眼虚血疾患において神経保護効果を持つ可能性が示唆された。

これまでの報告で、脳卒中患者に使用され、様々な動物モデルでも体内循環に影響を与えずに神経保護効果を持つフリーラジカルスカベンジャーであるエダラボンは、網膜においても虚血性網膜傷害を減少させた。さらに、D-アローゼを硝子体手術時の眼内灌流液に添加することにより細胞外グルタミン酸濃度を下げ、手術に関連する酸化ストレスを減弱させて虚血性網膜傷害から網膜を保護したという報告がある。これらのことより、酸化ストレスは網膜傷害の主要な原因の一つであり、酸化ストレスで誘導される ASICs の活性化を防ぐことで虚血性網膜傷害を抑制することができると考えられる。

本研究において、約 $100\ \mu\text{M}$ のアミロライドが虚血性網膜傷害を抑制したことは、ASICs が虚血による網膜変性に関与しているということと、ASIC 阻害剤が網膜虚血性疾患の新しい神経保護薬剤として期待できること示唆している。また、今後 ASIC のどのサブタイプが虚血性網膜傷害に強く関連しているのか、アミロライドやその他の ASIC 阻害剤による遅発性神経毒性の可能性よりも神経保護効果のベネフィットが上回るかどうかなど、さらなる研究が必要である。

論文審査の結果の要旨

酸感受性イオンチャネル遺伝子ファミリー (acid-sensing ion channels: ASICs) は感覚器を含む神経系に広く発現し、水素イオンによって活性化される陽イオンチャネルをコードしている。ASICs は 4 つの機能的なサブユニット (ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, ASIC3) とそれ自身は不活性である 2 つの調節的なサブユニット (ASIC2b, ASIC4) から構成される。ASICs は Na^+ に強い選択性を示すが、ASIC1a は Ca^{2+} にも透過性を示すため、ASIC1a の発現細胞では ASIC1a の活性化で Ca^{2+} 毒性が生じている可能性がある。一般的に、虚血部位では嫌気性糖代謝が優位になり、乳酸の蓄積と ATP の加水分解に伴う水素イオンの放出が起こり、病変局所の pH が低下する。ASICs は局所的アシドーシスにおいて活性化されることから、虚血による組織傷害において重要な役割を果たしていると考えられる。

これまでの脳虚血研究では、虚血によるアシドーシスが ASICs を持続的に活性化させ神経の変性を引き起こすことが示唆されている。アシドーシスでは、細胞外の H^+ が持続的に局所の ASICs を活性化し、 Na^+ 、 Ca^{2+} の流入過剰により細胞障害を起こす。また、ASIC 阻害剤であるアミロライドが脳虚血モデルにおいて脳障害を抑制したという報告や、ASIC1a ノックアウトマウスの脳が虚血に対し耐性を示したという報告もある。このように、ASICs は虚血による組織障害に関与し、ASIC1a は脳虚血における Ca^{2+} 毒性にも関与する重要なチャネルである。ASICs は視細胞をはじめ網膜内の細胞にも発現していることが報告されている。本研究では、網膜虚血における ASICs の関与を調べるため、網膜虚血の動物モデルを使って、アミロライドの網膜神経保護効果を検討した。ラットの右眼の視神経を 60 分間直接結紮することにより一過性の網膜虚血を誘導した。視神経結紮直前にアミロライドを硝子体内注射した。7 日後に網膜傷害の程度を組織学および網膜電図を用いて検討した。

一過性網膜虚血により網膜内層の菲薄化を伴って網膜変性が生じた。アミロライド投与により著明に網膜の菲薄化は抑制された。網膜電図でも一過性網膜虚血による a 波、b 波の振幅の低下はアミロライド投与により著明に改善した。酸化ストレスは網膜傷害の主要な原因の一つであり、酸化ストレスで誘導される ASICs の活性化を防ぐことで虚血性網膜傷害を抑制することができると考えられる。

本研究において、約 $100 \mu\text{M}$ のアミロライドが虚血性網膜傷害を抑制したことは、ASICs が虚血による網膜変性に関与しているということと、ASIC 阻害剤が網膜虚血性疾患の新しい神経保護薬剤として期待できること示唆している。

審査委員会におけるスライド発表ののち、はじめに第一副査 (飛田秀樹教授) からは、今回の網膜虚血モデルについて、網膜電図記録の条件について等の論文に関する 12 項目の質問、つぎに主査 (鶴川真也教授) からは、ASIC が網膜やそれぞれの細胞のどこに発現しているか、今後この研究をどうやって発展させていくか等の論文に関する 8 項目の質問、第二副査 (小椋祐一郎教授) からは、加齢黄斑変性の治療指針についての質問がなされた。申請者からは、これら質問について満足する内容の回答が得られた。本委員会では、本論文筆頭著者は学位論文の内容を十分理解し大学院博士と同等の学力を有しているものと判断し、博士 (医学) の学位を授与するのに相応しいと判定した。

論文審査担当者 主査 鶴川 真也 教授 副査 飛田 秀樹 教授 小椋 祐一郎 教授