

学位論文題名

N-acetylated- $\alpha$ -linked-acidic dipeptidase inhibitor has a neuroprotective effect on mouse retinal ganglion cells after pressure-induced ischemia

(マウス網膜虚血後再灌流モデルにおける  
NAALADase 阻害剤の網膜神経節細胞保護効果)

学位論文内容の要旨

目的

グルタミン酸は神経系において興奮性伝達の大部分を担う、重要な神経伝達物質である。また学習・記憶など高次機能を支える分子として、シナプス可塑性などにも密接に関与すると考えられている。シナプス前神経細胞が脱分極すると、シナプス間隙に N-acetyl-aspartyl-glutamate (以下 NAAG) が放出される。NAAG は、N-acetylated- $\alpha$ -linked-acidic dipeptidase (以下 NAALADase) によって速やかに N-アセチル-アスパラギン酸とグルタミン酸に加水分解される。それにより NAAG の神経伝達物質としての活性がなくなると同時に、グルタミン酸が産生される。一方、過剰濃度のグルタミン酸には神経毒性があり、虚血などの病的状態における急激なグルタミン酸濃度上昇は、主に N-methyl-D-aspartate 型グルタミン酸受容体 (以下 NMDA 受容体) を介した、不可逆的な神経細胞死を引き起こすことが知られている。

虚血時のグルタミン酸毒性の防御法として、これまでに dextromethorphan (以下 DEX) など多くの NMDA 受容体アンタゴニストが検討されてきたが、その効果はいずれも限定的であった。そこで虚血後のグルタミン酸濃度上昇そのものを抑制するような、新しい薬品の開発が期待されていた。この点で最近開発された NAALADase の阻害剤である 2-(phosphonomethyl) pentanedioic acid (以下 2-PMPA) は、その神経細胞保護作用が強い注目を浴びている。2-PMPA の投与により虚血時のグルタミン酸濃度上昇が抑制されると同時に、細胞外 NAAG 濃度が上昇する。また NAAG は、NMDA 受容体を介したグルタミン酸毒性を抑制するといわれている。したがって 2-PMPA 投与では、NMDA 受容体アンタゴニストを上回る神経細胞保護効果が期待できる。実際ラット中大脳動脈閉塞による脳虚血モデルにおいて、2-PMPA の強い神経細胞保護作用が確認されている。また 2-PMPA は正常時の細胞外グルタミン酸濃度には影響を及ぼさないことから、NMDA 受容体アンタゴニストの投与で問題となる、学習・記憶障害を起こさないことが報告されている。

ところで網膜には網膜中心動脈閉塞症・緑内障など数多くの虚血性疾患があり、その治療法の開発が期待されている。網膜虚血性疾患の研究対象としては、網膜虚血後再灌流モデルがよく用

いられる。これは眼球内圧を急激に高めることで網膜に虚血を負荷し、その後高眼圧を解除して血流を再開するという方法で作成される。一定の期間をおいて観察を行うと、網膜神経節細胞の細胞死に伴い、網膜内層が菲薄化することが知られている。

そこで今回申請者らは、このマウス網膜虚血後再灌流モデルを用いて、2-PMPA と DEX の網膜神経節細胞保護効果を比較検討した。

### 実験方法

実験には体重約 30g の成熟 C57BL/6 マウスを用いた。ペントバルビタール (60mg/kg) 腹腔内投与で麻酔後、右眼前房内に 28 ゲージ針を刺入した。150cm 水柱の圧で生理食塩水を灌流することで高眼圧による虚血を 75 分間負荷した後、血流を再疎通させた。左眼はコントロールとした。2-PMPA および DEX、コントロールとしてリン酸緩衝液(以下 PBS)を虚血負荷 30 分前から 60 分ごとに計 4 回、各々腹腔内投与した。2-PMPA の濃度は 75、100、125mg/kg、DEX は 20、30、40mg/kg とした。各グループ 6 匹の動物を用いた。14 日後に眼球を取り出し、4%および 10% パラホルムアルデヒド-リン酸緩衝液で浸漬固定、パラフィン包埋した後、視神経を含む 7 $\mu$ m 厚の切片を作成し、ヘマトキシリン-エオシン染色を行った。虚血負荷が網膜神経細胞に及ぼす影響を、網膜内層(内境界膜から外網状層まで)の厚さおよび、網膜神経節細胞数の 2 点をパラメータに非虚血眼と比較し、各群間の有意差を検討した。有意差の検定には、スチューデント t 検定を用いた。

### 結果

網膜内層の厚さは、非虚血コントロール群 101 $\pm$ 14 $\mu$ m に対し PBS 投与虚血群で 53 $\pm$ 9 $\mu$ m と菲薄化していたが、DEX 30mg/kg 投与群および 2-PMPA 100mg/kg 投与群ではそれぞれ 64 $\pm$ 11 $\mu$ m、76 $\pm$ 10 $\mu$ m と有意差をもって改善していた。2-PMPA 投与群では DEX 投与群と比較して有意差をもって改善を認めた。DEX 40mg/kg 投与群、2-PMPA 125mg/kg 投与群で更なる改善はなかった。

次に神経節細胞層に存在する神経細胞数を、非虚血コントロール群に対する百分率で検討したところ、PBS 投与虚血群で 41 $\pm$ 8%であったのに対し DEX 30mg/kg 投与群で 59 $\pm$ 9%、2-PMPA 100mg/kg 投与群で 74 $\pm$ 11%といずれも有意差を認めた。2-PMPA 投与群では DEX 投与群とも有意差をもって改善した。DEX 40mg/kg 投与群、2-PMPA 125mg/kg 投与群で更なる有意差は認めなかった。

### 考案

今回の研究から新しい NAALADase 阻害剤である 2-PMPA は、マウス網膜虚血後再灌流モデルにおいて、網膜神経節細胞の保護効果を持つことが明らかとなった。またその効果は DEX を上回るものであった。DEX などの NMDA 受容体アンタゴニストは、虚血後に増加したグルタミン酸の NMDA 受容体への結合を部分的に阻害する。一方 2-PMPA は虚血時のグルタミン酸濃度上昇を抑制すると同時に、NAAG 濃度をも上昇させることによってグルタミン酸毒性を抑制し、DEX 以上に強い網膜神経節細胞への保護効果を及ぼしたものと考えられる。

今後はグルタミン酸興奮毒性が病態と考えられる緑内障など、各種網膜疾患の治療への応用を念頭に、2-PMPA の作用機序に関する詳細な検討が必要と思われる。

## 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 大 野 重 昭  
副 査 教 授 西 信 三  
副 査 教 授 渡 辺 雅 彦

学 位 論 文 題 名

N-acetylated- $\alpha$ -linked-acidic dipeptidase inhibitor has a neuroprotective effect on mouse retinal ganglion cells after pressure-induced ischemia

(マウス網膜虚血後再灌流モデルにおける  
NAALADase 阻害剤の網膜神経節細胞保護効果)

虚血時のグルタミン酸の産生経路として、その前駆物質である NAAG の加水分解酵素 NAALADase が大きな役割を果たしていることが知られている。最近開発された選択的 NAALADase 阻害剤は、その神経細胞保護作用が強い注目を浴びている。NAALADase 阻害剤の投与により脳虚血時のグルタミン酸濃度上昇が抑制されると同時に、細胞外 NAAG 濃度が上昇する。NAAG 自身にも、NMDA 受容体を介したグルタミン酸毒性からの神経細胞保護作用があると云われている。また NAALADase 阻害剤は正常時の細胞外グルタミン酸濃度には影響を及ぼさないことも報告されている。

網膜においても緑内障、糖尿病網膜症や網膜中心動脈閉塞症をはじめとする網膜血管閉塞症など虚血がその病態に深く関与していると考えられる数多くの疾患があり、その治療法の開発が期待されている。申請者らはマウス網膜虚血後再灌流モデルを用いて、NAALADase 阻害剤と NMDA 受容体アンタゴニストの網膜神経節細胞保護効果を比較検討した。網膜虚血後再灌流モデルでは血流再開後数週間のうち網膜神経節細胞の細胞死に伴い、網膜内層の菲薄化が進行する。NAALADase 阻害剤投与群では、内境界膜から外網状層を含む網膜内層の厚さおよび、網膜神経節細胞数の生存率の両方で NMDA 受容体アンタゴニスト投与群と有意差をもって改善を認めた。NMDA 受容体アンタゴニストは、虚血後に増加したグルタミン酸の NMDA 受容体への結合を部分的に阻害するが、増加したすべてのグルタミン酸の作用を阻害することはできない。一方 NAALADase 阻害剤は虚血時にグルタミン酸の産生そのものを抑制し、さらにグルタミン酸毒性を抑制する NAAG を増加させるため、NMDA 受容体アンタゴニストよりも高い効果が得られたものと考えられる。

学位論文の公开发表に際し、副査の渡辺雅彦教授から、2-PMPA が正常時にはグルタミン酸に

よる神経伝達に影響を与えず、虚血時にのみグルタミン酸産生を抑制できる理由、網膜切片の作成と判定法の定量性についての質問があった。これに対し申請者は、NAALADase は虚血などの病的状態にのみ活性化されてグルタミン酸を大量に産生し、一方で正常時のグルタミン酸産生にはほとんど関わっていないと考えられること、網膜組織標本については申請者自身が全て方法を統一して視神経を含む水平断の網膜切片を作成し、視神経から 500 $\mu$ m の部位で網膜内層を計測していることから、その定量的判定法は信頼性が高いと解答した。

次いで副査の西信三教授からは、2-PMPA の構造と酵素を阻害する機序についての質問があった。これに対し申請者は、2-PMPA はグルタミン酸類似物にリン酸基がついた構造であり、NAALADase が NAAG を認識するためにグルタミン酸部位が重要であることから開発された競合的 NAALADase 阻害剤であるという経緯について説明した。また、アスパラギン酸類似物にリン酸基がついた構造の薬剤では NAALADase 阻害活性は 2-PMPA の 1000 分の 1 以下であることも追加して説明した。

更に主査の大野重昭教授からは、虚血後再灌流モデル作成方法、2-PMPA と DEX の同時投与を含む臨床応用に向けての今後の課題について質問があった。これに対し申請者は、虚血後再灌流モデルは申請者らが本研究の以前から使用してきたモデルであり、今回の虚血負荷方法が網膜神経節細胞死の進行を判定する上で最も適切であることを説明した。薬剤の同時投与については、作用機序が異なる薬剤を組み合わせることで、各薬剤の単独投与よりも更に高い神経細胞保護効果が得られる可能性があるとして述べた。また現在はグルタミン酸トランスポーターである GLAST の遺伝子治療実験を開始しており、更に強力な治療法の開発に向けて研究が継続中であることを説明した。

この論文は、NAALADase 阻害剤が虚血後のグルタミン酸毒性からの網膜神経節細胞の保護に関して優れた効果をもつことを示した点で高く評価され、今後の網膜虚血性疾患への応用も期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。