

学 位 論 文 の 要 旨

学 位 の 種 類	博 士	氏 名	高 橋 淳 一
学 位 論 文 題 目			
Effect of nucleotide P2Y ₂ receptor agonists on outward active transport of fluorescein across normal blood-retina barrier in rabbit			
(P2Y ₂ 受容体作動薬の家兎血液網膜関門における外方能動輸送に対する影響)			
共 著 者 名			
Taiichi Hikichi			
Fumihiko Mori			
Atsushi Kawahara			
Akitoshi Yoshida			
Ward M. Peterson			
Experimental Eye Research 78: 103-108,2004			
研 究 目 的			
<p>血液網膜関門 (BRB) の外方能動輸送の障害は、糖尿病黄斑浮腫、加齢黄斑変性、またぶどう膜炎における黄斑浮腫の原因のひとつとして考えられており、中心視力を直接脅かす要因となっている。しかしながら、そのメカニズムは未だ明らかではない。</p> <p>P2Y₂受容体はBRBを形成する網膜色素上皮細胞の網膜側の細胞膜に存在する受容体であり、その刺激は細胞内のCa²⁺を上昇させることでBRBの網膜側から外方の脈絡膜側への液体の能動輸送 (外方透過性) を促進させることが、いくつかの研究で明らかになってきている。¹⁾²⁾</p> <p>我々は、すでに、differential vitreous fluorophotometry(DVF)を用いて、sodium-fluoresceinを静脈注射後、一定時間を経過した時点で硝子体中のfluorescein(F)とfluorescein monoglucuronide(FG)の蛍光強度を同時に測定し、それらの濃度を算出することで得られるF/FG比が、BRBにおける外方透過性 (能動輸送能) の指標となることを報告した。すなわち、F/FG比の低下は外方透過性の亢進を示唆する。³⁾</p> <p>そこで今回我々は、家兎にP2Y₂受容体の作動薬であるINS542を硝子体に投与した際のBRBの外方透過性に対する影響をDVFを用いて評価し、将来これらの薬剤が網膜浮腫の治療薬となるか否かも検討することを目的とした。</p>			

材 料 ・ 方 法

本研究には2.5kg前後の有色家兎を用いた。

1. 0.4% oxybuprocain hydrochlorideによる点眼麻酔後、硝子体への薬剤の投与を行った。
2. Sodium-fluorescien(50mg) を耳静脈から投与した。
3. Sodium-fluorescien 静注180分後にpentobarbital sodium(40mg/kg)とketamine hydrochloride(10mg/kg)の筋肉注射により麻酔し、DVFを用いて硝子体内の蛍光強度の異なるFとFGの蛍光を同時に測定し、それぞれの濃度からF/FG比を算出した。

INS542とUTPのF/FG比に対する影響

0.1mM INS542(n=8)、1mM INS542(n=11)、1mM UTP(n=9)、10mM UTP(n=6)の0.1mlを硝子体内注入した。コントロールとしてPBS(n=10)を0.1ml硝子体注射した。その後180分後にDVFを用いてFとFGの蛍光強度を測定し、その濃度を算出し、F/FG比を求めた。

INS542のF/FG比に対する影響の経時変化

DVF施行の48(n=4)、24(n=4)、12(n=8)、6(n=4)、3(n=11)、1(n=11)時間前および30分前(n=4)に1mM INS542を0.1ml硝子体内注入し、F、FGの蛍光強度を測定し、F/FG比を求めた。反対眼を対照とした。

統計解析

F/FG比に対する影響の比較にはSceffe's multiple comparison testを用いた。またINS542の影響の時間的変化の比較（投与眼と対照）にはpaired student's t-testを用いた。P値が0.05以下を統計学的に有意差ありとした。

成 績

INS542とUTPのF/FG比に対する影響

1. コントロール(PBS)のF/FG比は 0.48 ± 0.09 （平均 \pm 標準偏差）であった。
2. 0.1mM INS542, 1mM INS542, 1mM UTP, 10mM UTPの硝子体投与後のF/FG比はそれぞれ、 0.49 ± 0.14 , 0.19 ± 0.04 , 0.40 ± 0.08 , 0.36 ± 0.05 であった。
3. 1mM INS542のF/FG比のみ、有意に低下していた。

INS542のF/FG比に対する影響の経時変化

1. 1mM INS542を投与した48, 24, 12, 6, 3, 1時間後および30分後のF/FG比はそれぞれ 0.47 ± 0.08 , 0.57 ± 0.29 , 0.22 ± 0.09 , 0.15 ± 0.05 , 0.19 ± 0.04 , 0.20 ± 0.14 , 0.35 ± 0.09 (平均 \pm 標準偏差)であった。
2. 1mM INS542を投与した1, 3, 6, 12時間後のF/FG比は対照と比べ有意に低下していた。

考 案

P2Y₂受容体はATPとUTPの両者に対しほぼ同様の親和性を持つ受容体であり、その活動は細胞内のCa²⁺の上昇を引き起こすことで細胞の基底膜側（脈絡膜側）のCl⁻チャンネルからのCl⁻の脈絡膜側への動きを促進させ、それに伴った液体の脈絡膜側への動きが促進させることが考えられている。

今回我々は合成されたP2Y₂受容体作動薬であるINS542とUTPを用いて正常家兎における、BRBの外方透過性への効果を検討した。今回の検討では1mMのINS542においてのみBRBにおける外方透過性を亢進させる効果があることが示されたが、1mM INS542は硝子体中においては約67μMとなりこのことはINS542と構造上類似しているINS37217を用いた過去の研究結果とも矛盾しない。¹⁾ また、UTPは硝子体注入しても網膜面ではその効果は減衰してしまうことが示唆されているので¹⁾、今回はより安定化されたP2Y₂受容体作動薬のINS542を用いた。これによってUTPでは効果を示さない濃度でも、血液網膜関門における外方透過性を亢進させる効果があることが示された。また、その効果は投与後1時間から12時間有効であることが示唆された。P2Y₂受容体作動薬のこの効果は、今後、中心視力の低下を直接もたらしめている糖尿病黄斑症や加齢黄斑変性やぶどう膜炎に伴う黄斑浮腫などの網膜下液の早期吸収の治療として期待される。

結 論

1. P2Y₂受容体はBRBにおける能動輸送である外方透過性機能に関与している。
2. P2Y₂受容体作動薬であるINS542の硝子体投与は、DVFを用いて検討した結果、BRBの外方能動輸送能を亢進させ、またその効果は1時間から12時間持続する。
3. INS542等のP2Y₂受容体作動薬は、網膜浮腫の治療薬としての可能性があることが示唆された。

引 用 文 献

1. Maminishkis A, et al. The P2Y₂ receptor agonist INS37217 stimulates RPE fluid transport in vitro and retinal reattachment in rat. Invest Ophthalmol Vis Sci. 43, 3555-3566, 2002
2. Meyer C, et al. Effect of INS37217, a P2Y₂ receptor agonist, on experimental retinal detachment and electroretinogram in adult rabbits. Invest Ophthalmol Vis Sci. 43, 3567-3574, 2002
3. Takahashi J, et al. Effect of acetazolamide on outward permeability of blood-retina barrier using differential vitreous fluorophotometry. Current Eye Research 23: 166-170, 2001

参 考 論 文

1. Takahashi J, et al. Effect of acetazolamide on outward permeability of blood-retina barrier using differential vitreous fluorophotometry. Current Eye Research 23: 166-170, 2001
2. Kitaya N, et al. Effect of latanoprost on blood-retinal barrier permeability in rabbits. Ophthalmic Research 35: 276-280, 2003
3. Kawahara A, et al. Adenosine agonist regulation of outward active transport of fluorescein across retinal pigment epithelium in rabbits. Experimental Eye Research 80:493-499, 2005

学位論文の審査結果の要旨

報 告 番 号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	高橋 淳一
<div style="text-align: right; margin-bottom: 10px;">審査委員長 柏 柳 誠 ㊞</div> <div style="text-align: right; margin-bottom: 10px;">審査委員 廣 川 博 之 ㊞</div> <div style="text-align: right; margin-bottom: 10px;">審査委員 鈴 木 裕 ㊞</div> <div style="text-align: right;">審査委員 吉 田 晃 敏 ㊞</div>			
<p style="text-align: center;">学 位 論 文 題 目</p> <p style="text-align: center;">Effect of nucleotide P2Y₂ receptor agonists on outward active transport of fluorescein across normal blood-retina barrier in rabbit</p> <p style="text-align: center;">(和訳)</p> <p>(P2Y₂ 受容体作動薬の家兎血液網膜関門における外方能動輸送に対する影響)</p>			
<p>血液網膜関門 (BRB) には、血管内の物質を網膜組織に移行させることを阻止する機能と、組織内の不要な物質を組織外に排出させる外方能動輸送機能が存在する。後者の外方能動輸送の障害は、糖尿病黄斑浮腫、加齢黄斑変性およびぶどう膜炎における黄斑浮腫発症等の失明に直結する原因の一つとして考えられている。BRB の外方能動輸送機能を評価することは、治療やその効果判定に非常に重要であるが、今日まではその有用な手法が存在しなかった。</p> <p>学位論文提出者は、differential vitreous fluorophotometry (DVF)を用いて測定した fluorescein (F)と fluorescein monoglucuronide (FG)の蛍光比 (F/FG 比) が BRB の外方能動輸送の良い指標となることを報告した。この評価法は、種々の薬剤の BRB における効果を人においても同様に</p>			

評価でき、臨床に応用できる優れた評価法となる可能性が考えられる。

一方、P2Y₂受容体は BRB を形成する網膜色素上皮細胞の網膜側の細胞膜に存在する G 蛋白質共役型受容体である。その刺激は IP₃ の増加を引き起こし、細胞内の Ca²⁺を上昇させ、Ca²⁺依存性 Cl⁻チャネルを開口させることで、BRB の網膜側から外方の脈絡膜側への液体の能動輸送（外方透過性）を促進させる。

提出された学位論文は、DVF を用いて P2Y₂ 受容体作動薬である INS542 の硝子体投与による外方能動輸送に対する効果を評価した。1 mM の INS542 の投与では F/FG 比が有意に低下していたことから、P2Y₂ 受容体が BRB の外方能動輸送に関与していることと、INS542 が BRB の外方能動輸送を亢進させることを示した。さらに、P2Y₂ 受容体に同じく親和性のある UTP の投与では F/FG 比に変化がなかったことから、P2Y₂ 受容体の合成作動薬である INS542 が硝子体中でより安定性があり、臨床性が高いことを示している。また、INS542 の効果が 1 時間後から始まり、12 時間後まで続くという結果も、網膜剥離の網膜下液早期吸収の治療薬として有効である可能性を示しており、本論文は今後の臨床応用に繋がりうる重要な論文であるといえる。

論文内容と関連領域についての各審査委員による試問に対しても適切な回答が得られ、提出者はこの領域において十分な知識を有することが示された。

以上の審査結果から、本審査委員会は、本論文が博士（医学）の学位に値するものであると判定した。