

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	下内 昭人
<p>学位論文題目</p> <p>Neuroprotective effect of water-dispersible hesperetin in retinal ischemia reperfusion injury (網膜虚血再灌流障害における分散ヘスペレチンの神経保護効果)</p> <p>共著者名</p> <p>横田陽匡、大野晋治、松本千恵美、玉井敏博、宅見央子、Subbadra P. Narayanan 木村昭治、小林博也、Ruth B. Caldwell、長岡泰司、吉田晃敏</p> <p>Japanese Journal of Ophthalmology. 2015, in press.</p> <p>研究目的</p> <p>糖尿病網膜症をはじめとする虚血性網膜症は、網膜循環障害や血管壁の変性などの血管病変が主体であると考えられてきた。しかし一方で、血管病変が顕性化するよりも早期から網膜電図の異常や網膜内層の菲薄化が報告されている。また、網膜神経細胞と網膜循環は Neurovascular coupling と呼ばれる緊密な相互関係を有しており、糖尿病において網膜神経細胞を保護することは、網膜循環障害の予防に繋がると考えられる。そこで我々は、フラボノイドの一種であり、多様な効能が報告されてきた分散ヘスペレチン (WD-Hpt) に注目した。¹⁾ 本研究では、虚血性網膜症モデルとして汎用されている網膜虚血再灌流 (I/R) モデルマウスを用いて、分散ヘスペレチンが虚血性網膜症において神経保護作用を発揮するかを検討した。</p> <p>材料・方法</p> <p>1. 網膜虚血再灌流 (I/R) モデル</p> <p>C57BL/6マウスを用いた。500ml生理食塩水ボトルに接続した30G針を右眼前房内に刺入し、ボトルの高さを150cmまで引き上げて眼圧を110mmHgまで上昇させた。網膜が虚血状態であることを確認し、同状態を40分間維持した。その後ボトルの高さを戻して針を抜去することにより再灌流を惹起した。左眼はコントロールとした。</p> <p>2. 分散ヘスペレチン (WD-Hpt) の投与</p> <p>WD-Hpt (0.3 ml, 200 mg/kg/day) をI/Rの30分前および翌日から1日1回腹腔内投与した。対照群には生理食塩水 (NS; 0.3 ml) を同様に腹腔内投与した。</p>			

3. 酸化ストレスの評価

I/R 6時間後の網膜を用いて抗ニトロタイロシン抗体によるWestern blottingを行った。また、凍結切片を作成し、ジヒドロエチジウム (DHE) 染色を行い、蛍光強度を測定した。

4. マイクログリアへの影響の検討

I/R 24時間後の網膜切片を用いて抗Iba1抗体による免疫染色を行い、マイクログリアの形態を観察した。次にマイクログリア細胞株BV-2細胞に対し、抱合型Hpt (血中におけるWD-Hptの代謝物) を3群 (最終濃度 0, 10, 100 μ M) に分けて添加し、その1時間後リポ多糖 (LPS) を添加 (最終濃度 100 ng/ml) した。4時間後にBV-2細胞を回収し、IL-1 β の発現量を定量的real-time RT-PCRを用いて定量した。標準化に β -actinを用いた。

5. グリオシスの評価

I/R 5日後の網膜を用いてWestern blottingおよび免疫染色を行い、glial fibrillary acidic protein (GFAP) の発現を確認した。

6. 神経節細胞死の評価

I/R 7日後の網膜ホルマウントに対して抗NeuN抗体で神経節細胞を標識し、共焦点顕微鏡で撮影した画像を元に神経節細胞数を数値化した。さらに僚眼に関しても、同じ面積内の神経節細胞を数値化し、I/R眼の値を除することによりパーセント表示とした。またI/R 24時間後の網膜切片に対してcleaved caspase-3 (アポトーシス関連蛋白) の免疫染色を、I/R 3日後の網膜切片に対してTUNEL assayを行い、アポトーシスを評価した。

7. mitogen-activated protein kinase (MAPKs) の評価

I/R 6時間後の網膜を用いてWestern blottingを行い、MAPKsの一つであるextracellular signal-regulated kinase (ERK) のリン酸化を比較した。

8. 統計学的解析

多重比較検定ではone-way ANOVAを行い、Tukey testを用いた。二群間の比較にはStudent's *t*-testを用いた。いずれも $P < 0.05$ を有意とした。

成 績

1. WD-Hptは酸化ストレスを減少させた。

ニトロタイロシンの発現は、NS投与群においてI/R眼 (NS I/R) は僚眼 (NS con) に対し約3.5倍増加していた。一方、WD-Hpt投与群のI/R眼 (WD-Hpt I/R) はNS I/Rに対し約54%抑制された ($p < 0.05$)。また、DHE染色における蛍光強度は、NS I/RではNS conに対して約1.7倍であったのに対し、WD-Hpt I/Rでは約24%抑制された ($p < 0.01$)。

2. WD-Hptはマイクログリアの活性化を抑制し、炎症性サイトカインの産生を抑制した。

NS conのマイクログリアは細胞体が小さく、多数の長い突起を有しており、ramified型（不活性型）であった。一方、NS I/Rのマイクログリアは細胞体が大きく、突起が短いamoeboid型（活性型）であった。それに対しWD-Hpt I/Rでは変化が軽度であった。次にBV-2細胞におけるIL-1 β の発現量は、LPS単独投与群ではcontrolと比較して約3.3倍増加した。一方、抱合型ヘスペレチン100 μ M添加群では約59%抑制した（ $p < 0.05$ ）。

3. WD-Hptはグリオシスを制御した。

NS I/Rでは、GFAPの発現がMüller細胞で有意に増加していることが確認された。一方、WD-Hpt I/Rではその発現増加が有意に抑制された（ $p < 0.05$ ）。

4. WD-HptはI/Rによるアポトーシスを抑制し、神経節細胞死を抑制した。

NS conに対し、NS I/Rでは神経節細胞数が37%減少していた。一方、WD-Hpt I/Rでは5%の減少に抑えられた（ $p < 0.01$ ）。また、NS I/Rでは主に神経節細胞層と内顆粒層にcleaved caspase-3の発現を認めた。それに対し、WD-Hpt I/Rではその発現が明らかに減少していた。TUNEL assayを施行したところ、NS I/Rではcleaved caspase-3の発現部位に一致してアポトーシス陽性細胞を多数認めたが、WD-Hpt I/Rではその数が有意に減少していた（ $p < 0.01$ ）。

5. WD-HptはERKのリン酸化を抑制した。

I/Rで誘導されたERKのリン酸化をWD-Hptは有意に抑制した（ $p < 0.01$ ）。

考 案

以前に我々は、虚血性網膜症ではNADPH oxidase 2を介して過剰に活性酸素が産生され、それに伴う酸化ストレスが網膜における神経節細胞死を惹起していることを報告した。本研究では、WD-Hptの強い抗酸化作用を介して、虚血性網膜症においてWD-Hptが神経保護作用を発揮することを初めて明らかにした。

また、今回我々は初めて、WD-Hptが虚血性網膜症におけるマイクログリアの活性化を軽減することを示した。マイクログリアはIL-1 β をはじめとする炎症性サイトカインを放出することで、虚血性網膜症などの慢性炎症を基盤とする疾患の病態に深く関与している。Kumarらは糖尿病ラットにおいてHptがIL-1 β の産生を減弱させることを報告している²⁾が、Hptがマイクログリアに対して直接作用するかは検討していない。本研究では、WD-Hptの代謝物である抱合型HptがLPS刺激下の培養マイクログリアにおけるIL-1 β の発現増加を直接抑制したことから、WD-Hptはマイクログリアに直接作用して抗炎症作用を発揮する可能性が示唆された。

一方、WD-Hptは虚血性網膜症におけるグリオシスを有意に抑制した。グリオシスは虚血や高血糖状態における網膜障害の指標の一つであり、視力低下の原因となる網膜浮腫の形成にも関与していると考えられている。したがって、本研究の結果から、WD-Hptは虚血性網膜症における神経保護のみならず網膜浮腫を改善させる新たな治療薬となりうることが示唆された。さらに、WD-Hptはcleaved caspase-3の発現抑制を介してアポトーシスに対して抑制的に作用

した。また、WD-Hptは虚血性網膜症におけるERKのリン酸化を抑制した。ERKは一般的には細胞の生存シグナルとして働くことが知られているが、既報ではMAPK kinase阻害剤によってERKのリン酸化を抑制することにより虚血性網膜症における神経細胞死を抑制することが報告されている。³⁾したがって、WD-Hptの神経保護効果は少なくとも上述の機序を介していると考えられた。

以上の結果から、WD-Hptが虚血性網膜症モデルにおける酸化ストレス、およびそれに伴う炎症やアポトーシス、ERKのリン酸化を抑制することで網膜神経細胞を保護すると考えられた。今後は全身投与のみならず、硝子体注射や点眼など眼局所への投与方法を検討し、臨床応用に向けた研究が必要であると考えられた。

結 論

1. WD-Hptが虚血性網膜症モデルにおいて神経保護作用を示すことを明らかにした。
2. その機序として抗酸化作用や抗炎症作用、抗アポトーシス作用およびERKのリン酸化抑制などが考えられた。
3. WD-Hptは虚血性網膜症の治療薬として有用であると考えられた。




引 用 文 献

- 1) Takumi H, Nakamura H, Simizu T, et al. Bioavailability of orally administered water-dispersible hesperetin and its effect on peripheral vasodilatation in human subjects: implication of endothelial functions of plasma conjugated metabolites. *Food Funct.* 2012;3:389-398.
- 2) Kumar B, Gupta SK, Srinivasan BP, et al. Hesperetin rescues retinal oxidative stress, neuroinflammation and apoptosis in diabetic rats. *Microvasc Res.* 2013;87:65-74.
- 3) Roth S, Shaikh AR, Hennelly MM, Li Q, Bindokas V, Graham CE. Mitogen-activated protein kinases and retinal ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44:5383-5395.

参 考 文 献

- 1) Yokota H, Narayanan SP, Zhang W, et al. Neuroprotection from retinal ischemia/reperfusion injury by NOX2 NADPH oxidase deletion. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52:8123-8131

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	下内 昭人
審査委員長 船越 洋  審査委員 高井 章  審査委員 廣川 博之 			
学 位 論 文 題 目 Neuroprotective effect of water-dispersible hesperetin in retinal ischemia reperfusion injury (網膜虚血再灌流障害における分散ヘスペレチンの神経保護効果) Japanese Journal of Ophthalmology, 2015, in press.			
<p>糖尿病網膜症をはじめとする虚血性網膜症は、我が国の中途失明原因の上位を占める重要疾患である。この克服には分子機序に立脚した治療戦略の確立が急務である。これまで虚血性網膜症の分子機序として網膜循環障害や血管壁の変性などの血管病変が主体にあると報告されてきた。しかし、この分子機序にのみ立脚した戦略では十分な治療効果が得られておらず、中途失明を完全に防止するには至っていない。</p> <p>一方で、血管病変が顕著化するよりも早期から網膜神経の機能障害や解剖学的変化が報告されている。Neurovascular Coupling と呼ばれる緊密な網膜循環と網膜神経系の相互関係の観点から網膜神経細胞の保護が、網膜循環の予防につながると考えられる。しかしながら、網膜循環の神経細胞変性への効果の解析報告は数多くある一方で、直接的神経保護の効果の解析は未だ十分になされていない。本研究では、虚血性網膜症に対する神経保護効果の意義を、フラボイドの一種であり多様な効能が報告されてきた</p>			

が未だ神経保護効果に関しては未知である「ヘスペレチン」に注目し解析した。虚血性網膜症モデルとしては、汎用されているマウス網膜虚血再灌流 (I/R) モデルを用い、動物愛護および生命倫理の理念にのっとり研究を遂行した。ヘスペレチンの効果の解析のために「分散ヘスペレチン」を用いた。まず、マウス網膜 I/R モデルにおける酸化ストレスについて評価した。ニトリタイロシンとジヒドロエチジウム (DHE) の発現を蛍光強度により評価すると、両者ともに分散ヘスペレチン処理により発現誘導が抑制されたことから、酸化ストレスが改善することが明らかとなった。また Iba-1 免疫染色および IL-1 β の real-time PCR 法による定量解析結果、分散ヘスペレチン処理によりミクログリオシスの抑制と活性化ミクログリアでのサイトカイン産生が抑制されることが明らかとなった。分散ヘスペレチンによる酸化ストレス改善作用が、網膜神経細胞保護効果を示すかを IR 7 日後のホールマウント網膜を用いて評価した。神経細胞マーカーである NeuN の免疫染色による解析結果、分散ヘスペレチン処理により、網膜神経節細胞数の減少が抑制されることが明らかとなった。さらに網膜虚血モデルにおけるプロアポトーシス因子である活性化型カスパーゼ 3 の発現が分散ヘスペレチンにより抑制されたことから抗アポトーシス作用を示すことが明らかとなった。また、分散ヘスペレチンは ERK のリン酸化も抑制する効果を持つことが明らかとなった。以上の結果から、分散ヘスペレチンがマウス虚血性網膜症モデルにおける酸化ストレスおよびそれに伴う炎症やアポトーシス、ERK のリン酸化を抑制することで神経細胞保護効果を示すと考えられた。本研究は、失明の重要な原因の 1 つとして知られる網膜虚血モデルにおいて、分散ヘスペレチンが神経細胞保護効果をもつことを初めて明らかにしたもので、Neurovascular Coupling の観点からの基礎研究レベルでの意義はもとより、将来の臨床応用の可能性をもつ重要な発見である。

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。