



Unoprostone isopropyl rescues retinal progenitor cells from apoptosis in vitro

棕野, 洋和

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2005-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3408

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003408>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 1 2 4 】

氏 名・(本 籍) 椋野 洋和 (大分県)

博士の専攻分野の名称 博士 (医学)

学 位 記 番 号 博い第1677号

学位授与の 要 件 学位規則第5条第1項該当

学位授与の 日 付 平成17年3月31日

【 学位論文題目 】

Unoprostone isopropyl rescues retinal progenitor cells
from apoptosis in vitro
(ウノプロストンイソプロピルの培養網膜前駆細胞に対する
抗アポトーシス作用)

審 査 委 員

主 査 教 授 久野 高義

教 授 南 康博

教 授 錦織 千佳子

はじめに

ウノプロストンイソプロピル（ウノプロストン）は、プロスタグランディン $F_2\alpha$ ($PGF_{2\alpha}$) の代謝物として日本において開発された眼圧降下剤である。点眼により、ぶどう膜強膜流出促進により眼圧下降が得られるだけでなく、視神経乳頭周囲の血流も改善される。さらに最近、ウノプロストンには網膜において神経保護作用があることが報告されている。Hayami と Unoki は持続的光障害により誘発されるラットの網膜障害をウノプロストンが保護することを *vivo* において示した。動物において、眼動脈結紮により誘発される網膜神経節細胞死がこの薬剤を腹腔内注射することで、濃度依存性に抑制されることも報告されている。*vitro* の研究においても網膜神経節細胞に対するグルタミン酸毒性が、ウノプロストンでは抑制されるが、別の $PGF_{2\alpha}$ 代謝物であるラタノプロストではブロックされないことが示されている。他の PG 関連眼圧降下剤と比較して、ウノプロストンとその代謝産物は、FP 受容体に対する親和性、結合性、FP 受容体を介する磷酸化の代謝率、細胞内におけるカルシウムの流動がきわめて低いことが他の実験によって示されている。また、主要骨格における炭素分子の数がドコサヘキサ酸 (DHA) と等しいことで、ウノプロストンはドコサノイドの合成物質であると認識されてきている。ドコサノイドは脂肪親和性の 22 番炭素が酸化された多価不飽和脂肪酸である。ドコサノイドの前駆体は DHA で、これは最も特徴的な $\omega 3$ 多価不飽和脂肪酸であり、脳と網膜に豊富に存在している。DHA には神経保護作用があり、ウノプロストンの神経保護作用は、DHA やドコサノイドとの類似性に基づく可能性がある。しかしながら、ウノプロストンの神経保護作用がいかなる作用機序で発揮されるかは、いまだ明らかではない。

点眼されたウノプロストンは角膜内で、 β 鎖が脱エステル化した型の M1、次に酸化型の M2 に代謝され、活性化される。前者は、薬理作用として眼圧を下降させる、また後者は、副作用として虹彩色素沈着を進行させる。

この研究の目的は、ウノプロストンの活性化代謝産物である M1、M2 が網膜神経グリア細胞において抗アポトーシス作用を発揮するのか、またそれはいかなる細胞内伝達経路を介するのかを調べることである。

方法

この研究では、新生児ラット網膜組織にアデノウイルス E1A 領域を感染させて、継代培養可能にした網膜神経細胞である R28 細胞を使用した。この細胞はグリアと神経の両方の表現型を有し、アポトーシスや神経保護作用の分子メカニズムを解明するのに広く用いられている。R28 細胞をカバーガラス上に 2×10^5 cells/cm² の濃度で培養し、24 時間血清除去することでアポトーシスを誘導した。これに M1、M2 を 0.01~100 μ M の各濃度で添加もしくは非添加のものを用意した。あわせて DMSO (培地、20 μ l/2ml)、コントロールとして代表的な抗緑内障薬の β 阻害剤、チモロールを添加したものを用いた。さらに別の群では、これらを添加する 15 分前に阻害剤を至適濃度で加えた。使用した阻害剤は LY294002 (PI3K 阻害剤)、Ro-31-8220 (PKG 阻害剤)、U0126 (MEK1、2 阻害剤)、KT5823 (PKG 阻害剤)、KT5723 (PKA 阻害剤)、KN-93 (CaMKII 阻害剤) である。1%パラホルムアルデハイドにて固定し、ヘークスト核染色 (Hoechst dye 33258, 0.5 μ g/ml) を行なった後、各カバーガラスから無作為に 5 か所の視野を選択し、細胞総数を数えた。アポトーシスをおこしている細胞の割合を凝縮、濃縮もしくは断片化などの核形態から調べた。活性型カスパー 3 に対するポリクローナル抗体 (1:1000; CM-1) を用いた免疫染色によりカスパー 3 陽性細胞の割合も含わせて調べた。以上の過程を n=3 で 3 回繰り返した。統計学的な検定として分散分析を行い、有意差は $p < 0.01$ とした。

結果

24 時間の血清除去によりアポトーシスを起こした細胞は約 10% と有意に増加した ($p < 0.0001$)。この割合は、血清のある状態では 1% 未満であった。以前の実験で、アポトーシスの割合は血清除去後、16~18 時間でプラトーに達することを確かめていたため、血清除去の時間としては 24 時間を選択した。血清除去により、活性型カスパー 3 の陽性細胞率も約 15% と有意に増加した ($p < 0.0001$)。血清のある状態では活性型カスパー 3 陽性細胞はほとんどなかった。M1 で処理したものは血清除去により誘発されたアポトーシス細胞率を濃度依存性に有意に減少させた。その保護作用は 10.0 μ M でも示されたが ($p = 0.0002$)、100 μ M で最も強かった ($p < 0.0001$)。活性型カスパー 3 陽性細胞数もまた 100 μ M の濃度で有意に減少したが ($p < 0.0001$)、より低い濃度では有意差は認められなかった。対照的に、もう一つの代謝物である M2 はチモロールと同様、100 μ M に至るまでアポトーシス細胞数も活性型カスパー 3 陽性細胞数も減少させなかった。

阻害剤なしの溶媒単独ではアポトーシス細胞数も活性型カスパー 3 陽性細胞数も増加させなかった。KT5723 (168nM)、Ro-31-8220 (30nM)、KN-93 (1.11 μ M)、U0126 (216nM) は、100 μ M における M1 の抗アポトーシス作用を抑制しなかった。一方、PI3K 特異的阻害剤、LY294002 (4.2 μ M) は、100 μ M における M1 の保護作用を有意に抑制した ($p < 0.0001$)。同様に、PKG の阻害剤である KT5823 (10 μ M) は、100 μ M における M1 の保護作用を抑制した ($p = 0.0019$)。

考察

今回の研究により、ウノプロストンの代謝産物である M1 はカスパーズ 3 活性を抑えることで、血清除去により誘発される R28 細胞（網膜神経細胞）のアポトーシスを抑制させることが明らかとなった。

また今回の研究によって、R28 細胞における M1 の保護作用が PI3K と PKG の経路によるものであるという新しい知見が得られた。PI3K は神経系において抗アポトーシス作用としての役割を持つことが vitro においても vivo においても示されている。LY294002 は様々な種類の培養細胞において、PI3K の活動性を特異的に抑制するのに用いられてきた。以前の報告では、インスリンと IGF-1 が血清除去により誘発された R28 細胞のアポトーシスを PI3K/Akt 経路で助け、LY294002 がこの効果を抑制することが示された。このことから、今回の研究によって示された M1 の抗アポトーシス作用が LY294002 によって抑制されたことは、R28 細胞においてウノプロストンが少なくとも PI3K 経路を介して保護作用を担っていることを示唆している。M1 がどのように PI3K とその下流の標的を活性化させるかについては、さらなる検討が必要である。

サイクリック GMP (cGMP) から PKG の伝達経路は、グリアおよび神経細胞における他の神経保護伝達経路として注目を集めてきている。NO は神経の中を拡散していき、可溶性のグアニルシクラーゼと結合し、GTP から cGMP を合成する触媒作用を増加させる。アラキドン酸、一酸化炭素、心房性ナトリウム利尿ペプチド、神経栄養因子もまた cGMP/PKG 経路を活性化させることが知られている。Takuma らは、cGMP が PKG の活性化を介してミトコンドリアの透過性（これはチトクローム c の放出とカスパーズ 3 の活性化を引き起こす）を抑え、最終的に培養星状細胞の生存を促進させ、PKG の阻害剤である KT5823 が細胞透

過型 cGMP を介した抗アポトーシス作用を抑制させることを示した。同様のことは PC12 細胞においても報告されている。KT5823 の抑制作用からして、cGMP から PKG 経路は、R28 細胞における M1 の抗アポトーシス作用のもう一つの経路と考えられる。点眼薬は、以前認識されていたよりも、強膜を通じた経路で脈絡膜や網膜など後眼部により浸透しやすいことが知られつつあるが、ウノプロストンが、点眼によって効果のある濃度で網膜に到達するというエビデンスはない。したがって、今回のデータを直接に臨床応用できない。しかしながら、今回の結果は、将来薬剤投与経路の問題が正しく対処された場合、ウノプロストンが緑内障だけでなく、さまざまな網膜変性疾患に対する神経保護的な治療となることへの、重要なベースになると確信している。

結論として、ウノプロストンの代謝産物である M1 は、PI3K か PKG に依存した伝達経路で、また、少なくともカスパーズ 3 を介して網膜培養細胞を保護する。ただ、網膜においてその作用がどのような情報伝達機構で発揮されているかを正確に解明するためには、さらなる研究が必要である。

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第 1675 号	氏 名	棕野洋和
論文題目 Title of Dissertation	Unoprostone isopropyl rescues retinal progenitor cells from apoptosis in vitro. ウノプロストンイソプロピルの培養網膜前駆細胞に対する抗アポトーシス作用		
審査委員 Examiner	主 査 久野高義 Chief Examiner 副 査 南 康博 Vice-examiner 副 査 錦織千佳子 Vice-examiner		
審査終了日	平成 17 年 3 月 10 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

ウノプロストンイソプロピル(ウノプロストン)は、プロスタグランジン $F_{2\alpha}$ (PGF $_{2\alpha}$) の代謝物として開発された眼圧降下剤で、点眼されると角膜内で β 鎖が脱エステル化した型の M1、酸化型の M2 に代謝される。最近、ウノプロストンには網膜において神経保護作用があることが報告されているが、その作用がいかなる機序で発揮されるかは、いまだ明らかではない。

この研究の目的は、ウノプロストンの活性化代謝産物である M1、M2 が網膜神経グリア細胞においていかなる細胞内伝達経路を介して抗アポトーシス作用を発揮するのかを調べることである。

この研究では、新生児ラット網膜組織にアデノウイルス E1A 領域を感染させて、継代培養可能にした網膜神経細胞でありグリアと神経の両方の表現型を有する R28 細胞を使用した。R28 細胞を 24 時間血清除去することでアポトーシスを誘導し、M1、M2 を 0.01 100 μ M の各濃度で添加もしくは非添加のもの、DMSO (培地) を添加したものを用意した。さらにこれらを添加する 15 分前に LY294002 (PI3K 阻害剤)、Ro-31-8220 (PKC 阻害剤)、U0126 (MEK1、2 阻害剤)、KT5823 (PKG 阻害剤)、KT5723 (PKA 阻害剤)、KN-93 (CaMKII 阻害剤) を至適濃度で加えた。1%パラホルムアルデヒドにて固定し、ヘーグスト核染色を行なった後、各カバーガラスから無作為に 5 か所の視野を選択し細胞総数を数えた。また、アポトーシスをおこしている細胞の割合を核形態から調べた。活性型カスベース 3 に対するポリクローナル抗体を用いた免疫染色によりカスベース 3 陽性細胞の割合も合わせて調べた。以上の過程を $n=3$ で 3 回繰り返し、統計学的な検定として分散分析を行い、有意差は $p<0.01$ とした。

24 時間の血清除去によりアポトーシスを起こした細胞は約 10%と有意に増加し ($p<0.0001$)、活性型カスベース 3 の陽性細胞率も約 15%と有意に増加した ($p<0.0001$)。M1 で処理したものはアポトーシス細胞率、活性型カスベース 3 陽性細胞数を 100 μ M の濃度で有意に減少させた。 ($p<0.0001$)。対照的に、もう一つの代謝物である M2 は 100 μ M に至るまでアポトーシス細胞数も活性型カスベース 3 陽性細胞数も減少させなかった。

阻害剤ないし溶媒単独ではアポトーシス細胞数も活性型カスベース 3 陽性細胞数も増加させなかった。KT5723、Ro-31-8220、KN-93、U0126 は、100 μ M における M1 の抗アポトーシス作用を抑制しなかった。一方、PI3K の特異的阻害剤 LY294002 は、100 μ M における M1 の保護作用を有意に抑制した ($p<0.0001$)。同様に、PKG の阻害剤である KT5823 は、100 μ M における M1 の保護作用を抑制した ($p=0.0019$)。M1 の抗アポトーシス作用が LY294002 によって抑制されたことは、R28 細胞においてウノプロストンが少なくとも PI3K 経路を介して保護作用を担っていることを示唆している。M1 がどのように PI3K とその下流の標的を活性化させるかについては、さらなる検討が必要である。

サイクリック GMP (cGMP) から PKG の伝達経路は、グリアおよび神経細胞における他の神経保護伝達経路として注目を集めてきている。KT5823 の抑制作用からして、cGMP から PKG 経路は、R28 細胞における M1 の抗アポトーシス作用のもう一つの経路と考えられる。

結論として、ウノプロストンの代謝物である M1 は、PI3K か PKG に依存した伝達経路で、また、少なくともカスベース 3 を介して網膜培養細胞を保護する。ただ、網膜においてその作用がどのような情報伝達機構で発揮されているかを正確に解明するためには、さらなる研究が必要である。

本研究は、ウノプロストンイソプロピルの眼圧降下作用のメカニズムを検討したものであるが、これまで明らかではなかったアポトーシス抑制作用を明らかにした初めての論文で、重要な価値ある業績であると認められる。よって本研究者は、博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。