



Loss of Aquaporin 9 Expression Adversely Affects the Survival of Retinal Ganglion Cells

Miki, Akiko

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2014-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6238号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006238>

※ 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。



(課程博士関係)

学 位 論 文 の 内 容 要 旨

Loss of Aquaporin 9 Expression Adversely Affects the Survival of Retinal Ganglion Cells

アクアポリン9の発現低下は網膜神経節細胞の生存に悪影響を及ぼす。

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
眼科学
(指導教員：中村 誠教授)

三木 明子

[目的]

アクアポリン9 (AQP9) はアクアポリン水チャネルファミリーに属し、乳酸などの水以外の分子も通過させるアクアグリセロポリンである。グルコースは神経組織やアストロサイトに輸送されエネルギー源として代謝される。アストロサイトに輸送されたグルコースは一部、乳酸に変換された後に神経組織へ輸送され、神経組織の燃料として使用されることが提唱されており (astrocyte-neuron lactate shuttle hypothesis)、その輸送に AQP9 も関わっていると考えられている。また、神経組織において、乳酸はピルビン酸へ変換されてエネルギー基質となる。その際に生じる副産物、還元型 NAD (NADH)は活性酸素 (ROS) の除去に関わることが知られている。これまでに我々は正常ラット眼では視神経乳頭部と網膜神経節細胞 (RGC) に AQP9 が発現していること、ならびに緑内障モデル眼ではその発現が減少することを報告した (Naka et al., IOVS, 2010)。サルおよびヒトの眼を用いた研究においても同様の変化を認めたことを報告した (Mizokami et al., Curr Eye Res 2011)。しかし、AQP9 発現変化の RGC 生存に及ぼす影響は未解明であった。本研究では視神経挫滅モデルを用いて AQP9 発現と RGC 死の経時的関連ならびに培養網膜神経節細胞を用いて AQP9 発現抑制の RGC 生存に及ぼす影響を検討した。

[対象および方法]

RGC5 細胞を血清除去により、細胞死とアポトーシスを誘導した。細胞死の評価は Live/Dead assay、アポトーシスと AQP9 発現の経時的変化は免疫組織染色と Western blotting を用いて検討した。RNA 干渉により選択的に AQP9 の発現を阻害した RGC5 細胞に、血清除去によりアポトーシスを誘導し、ROS 産生細胞率ならびに RGC5 細胞内の酸化型 NAD(NAD⁺)/NADH 比を検討した。雄 Sprague-Dawley ラットの右眼視神経を挫滅し、視神経挫滅モデルとした。挫滅後一定期間の後、両眼の網膜を摘出し、左眼網膜をコントロールとして用いた。RGC 数の経時的変化は、網膜展開標本を用いて、逆行性標識により検討した。網膜 AQP9 の発現変化は western blotting、real-time RT-PCR で検討した。網膜神経節細胞層(GCL)における RGC の細胞数および RGC 内 AQP9 発現の経時的変化について、免疫組織染色を用いて検討した。

[結果]

血清除去により RGC5 細胞死とアポトーシスは有意に増加し、RGC5 細胞における AQP9 蛋白発現は有意に減少した。
AQP9 の発現を選択的に阻害したところ、血清除去による RGC5 細胞死およびアポトーシスは有意に増加し、ROS 産生細胞率および NAD⁺/NADH 比の有意な増加も認めた。
視神経挫滅による RGC 数は、挫滅3日後には変化なかったが、7日後には有意に低下した。また、視神経挫滅後の GCL における NeuN 陽性細胞数は、3日後には変化しなかったが、7日後には有意に減少していた。網膜内 AQP9 の蛋白発現および遺伝子発現はともに3日

後に低下し、GCLのNeuN陽性細胞におけるAQP9の発現率は、挫滅3日後より低下し、RGC数の減少に先行していた。

[考察]

AQP9発現を抑制することにより、RGC死の増加が見られたことや、視神経挫滅モデルにおいてRGC死に先行してAQP9発現低下が見られたことから、AQP9発現はRGCの生存に必要であると考えられる。AQP9は、神経細胞のミトコンドリアと細胞膜に発現すること、乳酸輸送を担うアクアグリセロポリンに属すること、乳酸は神経細胞のエネルギー基質として利用されること、などが知られている。今回の結果は、AQP9がRGCにおいてエネルギー基質の輸送に関与していることを間接的に示すものと考えられる。

また、RGC5細胞のAQP9の発現を強制抑制すると、活性酸素産生細胞率とNAD⁺/NADH比が増加した。神経組織では、グルコースがピルビン酸に代謝されるが、解糖系好気性回路の最終産物として乳酸に変換され、ミトコンドリアに輸送された後、ピルビン酸に再変換されTCA回路に使用される。また、アストロサイトから輸送された乳酸もピルビン酸へ変換されるが、これらの乳酸からピルビン酸への変換では、NADHが副産物として生成され、ROSのスカベンジャーとして機能することが推察されている。RGCの、おそらくはミトコンドリアにおけるAQP9の低下により乳酸輸送が低下すると、生成されるNADHが減少することで、ROSが過剰に産生されることでRGC死が増加するのではないかと考えられた。

[結論]AQP9発現低下はRGC死と関連している可能性があり、その機序として、エネルギーならびにROSスカベンジャーの基質としての乳酸の輸送が減少することが考えられた。

| 論文審査の結果の要旨 | | | |
|----------------------------------|--|----|-------|
| 受付番号 | 甲第 2450 号 | 氏名 | 三木 明子 |
| 論文題目 Title of Dissertation | Loss of Aquaporin 9 Expression Adversely Affects the Survival of Retinal Ganglion Cells アクアポリン9の発現低下は網膜神経節細胞の 生存に悪影響を及ぼす。 | | |
| 審査委員 Examiner | 主 査 寺島 俊雄 Chief Examiner 副 査 丹生 隼一 Vice-Examiner 副 査 青井 貴之 Vice-Examiner | | |
| 審査終了日 | 平成 26 年 8 月 21 日 | | |

(要旨は1, 000字～2, 000字程度)

アクアポリン 9 (AQP9) はアクアポリン水チャネルファミリーに属し、乳酸などの水以外の分子も通過させるアクアグリセロポリンである。グルコースは神経組織やアストロサイトに輸送されエネルギー源として代謝される。アストロサイトに輸送されたグルコースは一部、乳酸に変換された後に神経組織へ輸送され、神経組織の燃料として使用されることが提唱されており (astrocyte-neuron lactate shuttle hypothesis)、その輸送に AQP9 も関わっていると考えられている。また、神経組織において、乳酸はピルビン酸へ変換されてエネルギー基質となる。その際に生じる副産物、還元型 NAD (NADH) は活性酸素 (ROS) の除去に関わることが知られている。本研究では視神経挫滅モデルを用いて AQP9 発現と網膜神経節細胞 (RGC) 死の経時的関連ならびに培養網膜神経節細胞を用いて AQP9 発現抑制の RGC 生存に及ぼす影響を検討した。

RGC-5 細胞を血清除去により、アポトーシスを誘導し、AQP9 発現の経時的变化を検討した。24 時間以降、AQP9 蛋白発現は有意に減少し、アポトーシスは有意に増加した。次に、RNA 干渉により選択的に AQP9 の発現を阻害し、細胞死への影響、ROS 産生細胞率ならびに RGC-5 細胞内の酸化型 NAD (NAD⁺)/NADH 比を検討したところ、細胞死の割合、ROS 産生細胞率および NAD⁺/NADH 比は有意に増加を認めた。

雄 Sprague-Dawley ラットの視神経を挫滅し、RGC 数の経時的变化および網膜 AQP9 の発現変化について、そして網膜神経節細胞層 (GCL) における RGC の細胞数および RGC 内 AQP9 発現の経時的变化について検討した。視神経挫滅による RGC 数は、挫滅 3 日後には変化なかったが、7 日後には有意に低下した。また、視神経挫滅後の GCL における NeuN 陽性細胞数は 3 日後には変化しなかったが、7 日後には有意に減少していた。網膜内 AQP9 の蛋白発現および遺伝子発現はともに 3 日後に低下し、GCL の NeuN 陽性細胞における AQP9 の発現率は、挫滅 3 日後より低下し、RGC 数の減少に先行していた。AQP9 発現抑制が RGC 死を増加させたこと、視神経挫滅モデルにおいて RGC 死に先行して AQP9 発現低下が見られたことから、AQP9 発現は RGC の生存

に必要であると考えられた。AQP9 は、神経細胞のミトコンドリアと細胞膜に発現すること、乳酸輸送を担うアクアグリセロポリンに属すること、乳酸は神経細胞のエネルギー基質として利用されること、などが知られており、今回の結果は、AQP9 が RGC においてエネルギー基質の輸送に関与していることを間接的に示すものと考えられた。

RGC-5 細胞の AQP9 の発現を抑制すると、ROS 産生細胞率と NAD^+/NADH 比が増加した。神経組織ではグルコースはピルビン酸に代謝後、解糖系最終産物として乳酸に変換される。乳酸はミトコンドリアに輸送された後、ピルビン酸に再変換され TCA 回路に使用される経路が指摘されている。アストロサイトから輸送された乳酸もピルビン酸へ変換されるが、このような乳酸からピルビン酸への変換時に NADH が副産物として生成され、ROS のスカベンジャーとして機能することが推察されている。AQP9 発現低下による RGC のミトコンドリアへの乳酸輸送が低下すると、生成される NADH が減少し、ROS が過剰に産生されることで RGC 死が増加するのではないかと考えられた。

本研究は、視神経挫滅モデルと培養網膜神経節細胞モデルを用いてアクアポリン 9 の発現低下が神経節細胞における活性酸素の蓄積と NAD^+/NADH 比の上昇をきたし、その細胞死を誘導することを明らかにしたもので、従来明らかでなかった網膜におけるアクアポリン 9 の機能について重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認める。よって本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があるものと認める。