

論文題目

培養網膜神経節細胞における BDNF 軸索輸送の動的画像解析  
(Dynamic Imaging of Axonal Transport of BDNF in Living Retinal Ganglion Cells)

日本人成人における視覚障害原因疾患の第1位である緑内障性視神経症において、軸索損傷に伴う、神経栄養因子軸索輸送障害が網膜神経節細胞(RGC)アポトーシスの機序であることが示唆されてきた。Peaseらは、組織学的検討により緑内障モデルにおける brain-derived neurotrophic factor (BDNF) の逆行性軸索輸送減少を示した。そのため、申請者は RGC の BDNF 軸索輸送動態評価により、軸索障害 RGC の活性評価、および将来の、緑内障患者における RGC 軸索障害の検出ができる可能性に着目した。しかし、これまでの RGC における BDNF 軸索輸送評価は固定標本による静的評価に限定されていた。本研究では、RGC 軸索障害による軸索輸送減少と細胞死との関連を明らかにするために、*in vitro* 生細胞イメージングを用いて、RGC の BDNF 軸索輸送の検出、評価を行うことを目的とした。

方法として、ラット RGC を two-step immunopanning 法により単離、培養し、Green fluorescent protein (GFP) 標識した BDNF の発現プラスミドを導入後、軸索内と樹状突起内に発現した BDNF-GFP の動態を 5 秒間隔のタイムラプス法により撮影した。1 mM コルヒチンを投与後、BDNF 軸索輸送の変化を経時的に観察し、その軸索輸送の変化がエチジウムホモダイマー1 陽性の細胞死よりも前にみられる現象かを検討した。その結果、培養 RGC の軸索、樹状突起において BDNF-GFP の発現は小胞状であった。タイムラプス法により、軸索輸送平均速度は、 $0.86 \pm 0.37 \mu\text{m/s}$  (最高速度 =  $2.03 \mu\text{m/s}$ ) であり、樹状突起内輸送平均速度  $0.49 \pm 0.19 \mu\text{m/s}$  に比べて有意に速かった ( $P < 0.0001$ )。コルヒチン投与前に比べて、投与 2 時間後 ( $P = 0.003$ )、3 時間後 ( $P = 0.0002$ ) では、有意に BDNF 軸索輸送が減少したが、細胞死は 24 時間後に観察された。

本研究で評価した BDNF-GFP は、内因性 BDNF 同様に、発現パターンが小胞状であり、活動電位依存性に放出された。このことより BDNF-GFP 動態は内因性 BDNF 動態を反映していることが示唆された。生細胞イメージングにおいて、BDNF-GFP 小胞の、軸索輸送、樹状突起内輸送動態は大きく異なっており、両者の微小管配列極性の違いが原因と思われた。RGC 細胞死前に検出された、コルヒチン投与による経時的 BDNF-GFP 軸索輸送減少は微小管重合阻害による軸索内微小管消失の進行を反映していると考えられた。これらの結果より申請者は、*In vitro* 生細胞イメージングにより、培養 RGC における BDNF 軸索輸送動態は樹状突起内輸送動態と大きく異なること、さらに軸索障害をうけた RGC の細胞死前には軸索輸送が減少することを見いだした。

審査では、①単離した培養 RGC と生体内での RGC との環境の違いが軸索輸送に及ぼす効果、②緑内障の病態における BDNF の役割、③RGC における BDNF の役割、④緑内障の早期診断において BDNF に着目する理由、⑤順行性輸送と逆行性輸送の役割、⑥軸索傷害部位と軸索輸送が強く障害される部位との関係、⑦RGC を単離する方法、⑧臨床応用に向けて今後解明すべき課題、などについて質疑応答がなされ、発表者から適切な回答が得られた。

本論文は、軸索輸送評価が緑内障性視神経症による RGC の細胞死を予知する手段として有用であることを明らかにしたもので、今後、緑内障の早期診断と治療方法の発展に大いに寄与する有意義な研究として高く評価できる。

# 審査結果

学位申請者名：瀧原 祐史

分野名：視機能病態学

学位論文題名：

培養網膜神経節細胞における BDNF 軸索輸送の動的画像解析

(Dynamic Imaging of Axonal Transport of BDNF in Living Retinal Ganglion Cells)

指 導： 谷原 秀信 教授

判定結果：

可

不可

不可の場合：本学位論文名での再審査

可

不可

平成22年2月9日

審査委員長 頭頸部感覚病態学担当教授

湯本 英二

印

審査委員 脳機能病態学担当教授

池田 学

印

審査委員 代謝内科学担当教授

荒木 栄一

印

審査委員 細胞病理学担当教授

町居 元裕

印