

論 文 内 容 要 旨

Functional analysis of Semaphorin 3A in retinal

ganglion cells under hypoxia in vitro

(低酸素下における網膜神経節細胞での

セマフォリン 3A の機能解析)

Biology Bulletin, 2022, in press.

主指導教員：木内 良明教授

(医系科学研究科 視覚病態学)

副指導教員：川崎 裕美教授

(医系科学研究科 地域・学校看護開発学)

副指導教員：高 知愛准教授

(医科学研究科 視覚病態学)

小松 香織

(医系科学研究科 医歯薬学専攻)

緑内障は主要な失明原因の一つである。緑内障の病態は網膜神経節細胞 (RGC) と視神経軸索の変性や死滅によって起こるため、それによる視覚障害は進行性であり非可逆である。眼圧の上昇が主要な危険因子であり、薬物や外科的加療で眼圧を下げるのが現在の治療の主軸だが、眼圧が低くても進行する場合がある。そのため近年緑内障治療は視神経保護薬の開発にも焦点が当てられている。また RGC 変性の原因として、眼圧以外に低酸素、グルタミン酸レベルの上昇、加齢なども危険因子としてあげられる。特に酸化ストレスは緑内障の進行に関与する重要な因子と考えられている。

一方、神経系では神経誘導因子の一つにセマフォリンが多数報告されている。セマフォリンは分泌型および細胞膜結合型のシグナル伝達分子で、500 アミノ酸の「セマ」ドメインという共通の構造によって定義される 8 クラスのファミリーである。分泌型のクラス 3 セマフォリンはラットの網膜に発現しており、哺乳類の視覚系の発達に影響を与えられている。また、クラス 3 セマフォリンは軸索誘導分子と知られ、その他にもアポトーシス、細胞移動、免疫や器官形成、腫瘍抑制に関与すると言われており、さらにセマフォリン 3A 抗体は、RGC を細胞死から守る働きが報告されている。今回我々は低酸素が RGC に及ぼす影響と、神経誘導分子セマフォリン 3A の発現について検討した。

RGC は 2 段階の免疫パンニング法で細胞を回収し、初代培養を行った。4-5 日齢のラットから網膜を取り出し、パパイン酵素で網膜細胞を解離させ、抗マクロファージモノクローナル抗体でマクロファージを除去した後、抗 Thy-1 抗体で RGC を回収し、21%O₂ の 37°C インキュベータで 4 日間培養した。その後コントロール群と低酸素群に分け、低酸素群を 1%O₂ のインキュベータに移動させてそれぞれ 3 日間培養を行った。培養した RGC を回収し、RT-PCR、免疫染色、ウエスタンブロットを行った。

RT-PCR ではクラス 3 セマフォリンのうち、セマフォリン 3A の発現のみが低酸素条件下の RGC で増加し、その他のクラス 3 セマフォリン (3B、3C、3F) では変化がなかった。ウエスタンブロットと免疫染色において、RGC 分化マーカーである TUJ1 は低酸素下で培養した場合に発現が低下した。また siRNA によりセマフォリン 3A をノックダウンしたところ、TUJ1 の発現の低下が抑制された。

さらにセマフォリン以外に、様々なサイトカインの動きを見るために Multi-Assay を行った。その結果から低酸素下では血管増殖因子である VEGF が増加していた。VEGF はセマフォリン 3A とニューロピリン 1 の受容体が共通しているため、両者は競合していると予測されたが、siRNA でセマフォリン 3A ノックダウンしたところ、VEGF も低下した。つまり当初の予測に反して、セマフォリン 3A と VEGF は競合しているわけではないということが分かった。セマフォリン 3A と VEGF の明らかな相互関係は現時点では不明だが、ニューロピリン 1 を介してセマフォリン 3A のシグナル伝達が VEGF にどのように影響を与えているのか今後解明していく必要があるだろう。

以上の実験から、セマフォリン3Aの発現が低酸素下で上昇すること、siRNAでセマフォリン3AをノックダウンするとTUJ1の発現と神経突起伸長の阻害が抑制されることが分かった。

今回の実験を通して、セマフォリン3AはRGCの生存と機能において重要な役割を果たしていることが示された。今後はセマフォリン3Aとそれに関連する因子がどのように影響しているかを解明していくことが求められる。