

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	小松 香織
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1、2 項該当		
論文題目			
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）			
論文審査担当者			
主 査	教授	酒井 規雄	印
審査委員	教授	相澤 秀紀	
審査委員	講師	山崎 雄	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>緑内障は主要な失明原因の一つである。緑内障では網膜神経節細胞（retinal ganglion cell; RGC）がアポトーシスを起こし、それに連なる視神経軸索が変性する。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である。しかし、緑内障は多因子性の疾患であり、循環障害、酸化ストレス、眼球剛性、睡眠時無呼吸発作などが眼圧非依存性の危険因子として知られている。実際、これらの危険因子と RGC 障害との関わりに着目した研究が近年積極的に行われており、それを応用した視神経保護薬の研究開発も緑内障制圧に向け加速している。</p> <p>一方、神経系ではセマフォリンが神経誘導因子として報告されている。セマフォリンは 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、分泌型と膜型がある。セマフォリンは神経誘導以外にアポトーシス、血管・骨・心臓形成、免疫応答や腫瘍増殖等に関与すると言われている。クラス 3 セマフォリンは分泌型で、軸索誘導反発因子として知られる。RGC からのセマフォリン分泌は、autocrine もしくは paracrine で行われる。視神経の切断は RGC の細胞死を誘導するが、ラットの眼内にセマフォリン抗体を投与すると、視神経切断後の RGC の生存率が上昇する。また眼圧を上昇させると、眼内では特異的に RGC にセマフォリンが上昇するという報告もある。RGC の生存にセマフォリンが影響を及ぼしている可能性は高い。緑内障に関連するゲノム解析が行われているが、緑内障に関連する遺伝子のうちセマフォリンと関係するものはない。</p> <p>今回の研究では緑内障の病態モデルとして、低酸素下 RGC 培養モデルを用いた。低酸素状態は眼灌流圧の低下、加齢ともなる眼血流量の低下、睡眠時無呼吸発作による低酸素血症などを模したものである。低酸素が RGC の生存率に及ぼす影響と、RGC における神経誘導反発分子セマフォリン 3A の発現とその意義について検討した。</p> <p>4 日齢のラットから網膜を摘出し、パンニング法で RGC を回収した。回収した RGC を 21% O₂ 下で 37°C インキュベータを用いて 5 日間培養後、コントロール群と 1% O₂ 低酸素群に分け、さらに 3 日間培養した。パンニング法を用いた RGC の培養は確立された手技で、免疫染色でみると既報と同じく 2 割程度グリア細胞が混入していた。軸索マーカーとして Tuj1、樹状突起マーカーとして Map2 をもちい各群における発現をイムノブロットにより定量した。また、siRNA を用いたセマフォリン 3A のノックダウンにより、Tuj1 や VEGF、セマフォリン 3A 受容体蛋白量がどのように変化するかを同様に定量し検討した。ノックダウン実験には 2 種類の異なる siRNA を用い、t 検定を用い 2 群間比較を行った。さらに、上記実験条件における炎症反応や免疫応答に関わる CINK、IFN-γ、IL、MIP、MIG、TNF-α や増殖因子である VEGF など、計 29 種類のサイトカインの網羅的定量を目的に Multi-Assay を行った。</p>			

結果は以下のごとくまとめられる。低酸素条件下ではクラス 3 セマフォリンのうち、セマフォリン 3A が増加し、その他のクラス 3 セマフォリン (3B、3C、3F) では変化がないことが RT-PCR で明らかになった。軸索マーカーである Tuj1 は低酸素下で発現が低下したが、樹状突起マーカーの Map2 の発現には低酸素の影響がなかった。siRNA によりセマフォリン 3A の発現をノックダウンすると、低酸素下での Tuj1 の発現の低下が抑制された。Multi-Assay では、低酸素下で血管増殖因子(VEGF)が増加していた。VEGF とセマフォリン 3A の受容体にはニューロピリン 1 が共通して存在しており、両者はそこで競合していると予測した。しかし、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。ニューロピリン 1 を介してセマフォリン 3A が VEGF の発現を調整している可能性がある。今後はセマフォリン 3A と VEGF がどのように関連しているかを明らかにするために、ニューロピリン 1 を介したセマフォリン 3A のシグナル伝達機構を解明していく必要がある。

以上の結果から、神経誘導反発分子セマフォリン 3A が網膜神経節細胞の生存において重要な役割を果たしていることが示唆された。本研究成果はセマフォリン 3A を標的とした視神経保護薬探索研究の礎になり得るものであり、本論文は緑内障制圧の観点からも価値があると考えられた。

よって審査委員会委員全員は、本論文が小松香織に博士 (医学) の学位を授与するに十分な価値があるものと認めた。