

学位論文

脳由来神経栄養因子による視細胞保護機構の解析

岩手大学大学院 連合農学研究科
生物資源科学専攻 生物機能開発学連合講座

浅井 信晴

2009年3月

目次

第1章	緒論	2 頁
第2章	連続光照射ラット網膜における TrkB のアイソフォーム発現の 変化と視細胞変性過程との関わり	
1.	はじめに	7 頁
2.	実験材料および実験方法	8 頁
3.	結果	13 頁
4.	考察	18 頁
第3章	新規網膜器官培養法の確立	
1.	はじめに	23 頁
2.	実験材料および実験方法	25 頁
3.	結果	29 頁
4.	考察	33 頁
第4章	新規網膜器官培養法を用いた BDNF 投与により培養上清中に分 泌されるタンパク質の解析	
1.	はじめに	38 頁
2.	実験材料および実験方法	38 頁
3.	結果	45 頁
4.	考察	47 頁
第5章	総合考察	51 頁
引用文献		53 頁
図表		69 頁
謝辞		

第1章 緒論

網膜は光を受容する中枢神経系の組織である。脊椎動物の網膜は、複数の層で構成されており、内側から内境界膜(ILM)、神経繊維層(NFL)、網膜神経節細胞層(GCL)、内網状層(IPL)、内顆粒層(INL)、外網状層(OPL)、外顆粒層(ONL)、外境界膜(OLM)、視細胞内節(IS)、視細胞外節(OS)および網膜色素上皮細胞層(RPEs)となっている(図.1)。網膜には特殊に分化した神経細胞が存在し、視細胞、双極細胞、水平細胞、アマクリン細胞および網膜神経節細胞と5種に大別される。また、網膜にはミュラー細胞と呼ばれる他の神経細胞の支持や生理調節を行うグリア細胞が存在している。ミュラー細胞は網膜全層に渡り縦に存在しており、視細胞の内節と呼ばれる部分の縁から、網膜内層の縁にまで及び、その基底膜により外境界膜および内境界膜が構成される。各層に分布して存在する神経細胞にはそれぞれ特殊な役割があるが、光を受容できるのは視細胞のみである。角膜や水晶体を通過して眼内に到達した光は、網膜の視細胞の外節と呼ばれる部分で受容される。視細胞で補足された光情報は電気信号として双極細胞および網膜神経節細胞に伝達され、網膜神経節細胞の軸索で構成される視神経を通して脳に到達する。水平細胞やアマクリン細胞は光情報伝達の細やかな調節を行っていると考えられている。

網膜の主要なグリア細胞であるミュラー細胞は広範囲な機能を有している。当初、ミュラー細胞は神経細胞の間隙を埋め、物理的な支持をしている細胞と考えられていたが、現在では多くの生理機能で網膜維持に重要な役割を担っている事が明らかになっている。主な機能として、神経細胞での老廃物であるアンモニアの代謝や、神経伝達物質として放出されたグルタミン酸や γ -アミノ酪酸(GABA)の取り込みとリサイクル、さらには細胞外イオン環境の調節などが挙げられる[1-16]。また、網膜色素上皮細胞(RPE)は視細胞機能に特に重要である。RPEは視細胞外節を貪食し、外節の構造および機能の維持を担っている[17-19]。さらには光受容に必要なレチノイドの代謝と供給も行っている[20-23]。

視細胞は光を補足する重要な細胞である。一方で難治性網膜疾患である網膜色素変性症や加齢黄斑変性症などで引き起こされる失明時には視細胞のアポトーシスが起こる事が報告されている[24-26]。網膜色素変性症は視細胞や RPE に特異的に発現している遺伝子の異常で起こるとされており、現在までに、ロドプシン、杆体 cGMP ファオスフォジエステラーゼ、杆体サイクリックヌクレオチド感受性イオンチャネル、グアニル酸シクラーゼ、アレスチン、および RPE65 などの原因遺伝子が同定されている[26-34]。しかし、これらの同定された遺伝子も網膜色素変性症の極一部であり、多くは原因不明である。また、加齢黄斑変性症は高齢者の黄斑部に生じる疾患である。老化などにより引き起こされる RPE の機能低下により、脈絡膜毛細血管から新生血管が生じ、その新生血管が RPE 細胞下さらには視細胞と RPE 間に侵入する。その結果、漿液性もしくは出血性の網膜剥離を引き起こし、黄斑機能の消失による中心暗点さらには視力の喪失が起こる。いずれの網膜疾患も効果的な治療法はなく、その病態解明および治療法の開発が望まれている。また、高強度の光の連続照射が視細胞特異的な障害をもたらし、視細胞死を誘導することが報告されており[35]、この光障害は網膜色素変性症などの視細胞死が原因となる網膜疾患のモデルとして広く用いられている。この光傷害モデルでは、視細胞のアポトーシス、視細胞の核から成る外顆粒層の厚さの減少ならびに網膜電位図(ERG)における振幅の減少などが観察される[36-41]。一度、変性や脱落した視細胞の機能を取り戻すことができないため、視細胞の変性を抑制、遅延させること、さらには視細胞の機能を再生させるような治療法が望まれている。

そんな中、塩基性繊維芽細胞増殖因子(bFGF)、毛様体神経栄養因子(CNTF)などの神経栄養因子、さらには神経成長因子(NGF)、ニューロトロフィン 3(NT-3)および脳由来神経栄養因子(BDNF)といったニューロトロフィンファミリー分子が、網膜神経細胞の保護に有効である事が多くの研究で報告されている。中でも BDNF は 1982 年に精製された栄養因子であり[42]、分子量は約 14kDa で生体内ではホモ二量体で働く。BDNF は脳内のみならず眼内を含めた神経系で広く発現されている[43-47]。BDNF は神経細

胞の生存、軸索および樹状突起成長やシナプス形成を含む、神経発生の様々な側面を調節していることが示されている[48-56]。網膜においては、BDNF は網膜神経節細胞の形態的成熟やアマクリン細胞の形態および神経化学的表現型に影響することが報告されている[57-59]。BDNF が様々な培養神経細胞の生存を促進することが報告されたことから、神経網膜への応用も検討されてきた。BDNF の硝子体腔への投与により、光傷害モデル動物における視細胞死を抑制し、外顆粒層や網膜電位図(ERG)振幅の保護効果が示された[60-64]。また BDNF は視細胞のみならず虚血障害[65]やグルタミン酸毒性[66-68]などの網膜内層におこる傷害に対しても神経網膜保護効果を有することや、軸索切断後の網膜神経節細胞の生存および軸索再生を促進することが報告されてきた[69-76]。さらには BDNF の投与方法として、硝子体腔への投与だけでなく、BDNF 遺伝子を導入した RPE や虹彩色素上皮細胞の網膜下への移植やアデノ随伴ウイルスによる遺伝子導入による方法なども有効であることが報告されており、臨床応用へのアプローチが多数なされてきている[77-84]。

ニューロトロフィンは分泌タンパク質であり、その機能を発揮するには受容体が必要である。ニューロトロフィン受容体は大きく二種類に分類される。1 つは高親和性チロシンキナーゼ型受容体 Trk 受容体である。Trk 受容体は 3 種同定されており(TrkA、B、C)、それぞれ特定のリガンドと結合する。TrkA は NGF, TrkB は BDNF と NT-4/5 そして TrkC は NT-3 と結合し、その解離定数(Kd 値)は約 10^{-11} M である[85]。もう一方は腫瘍壊死因子受容体のファミリーで低親和性受容体 p75NTR であり、こちらはすべてのニューロトロフィンと結合する。Kd 値は約 10^{-9} M である[85](図 2)。網膜神経節細胞に発現する p75NTR は NGF との結合によってアポトーシスを誘導することが報告されているが[86]、このことは Trk 受容体と p75NTR は同じニューロトロフィン受容体でありながら、逆の機能を果たしている可能性を示唆する。しかしながら、p75NTR による網膜神経節細胞のアポトーシス誘導は胎生期に限定されており、成熟網膜における網膜神経節細胞数には影響を与えない。つまり、両者の発現と機能は、発現部位や時

期により微妙な調節がなされていると考えられ、Trk 受容体と p75NTR が同時に存在する意義については、さらなる検討が必要と考えられる。

BDNF は主に TrkB を介して機能を発揮する。TrkB には複数のアイソフォームが存在し、細胞内ドメインを有する全長型 (TrkB-FL) と細胞内ドメインを欠失している型 (TrkB-T1) が知られている[87、88]。TrkB-FL に BDNF が結合すると二量体化し、細胞内に存在するチロシンキナーゼ領域が活性化し、細胞内ドメインのリン酸化が起きる。その細胞内リン酸化部位を介して Ras/MAPK ならびに PI3K/Akt カスケード、または PLC- γ が活性化され、その生理的作用が発揮される[89-92]。TrkB-FL を介して起こる生理作用として、神経突起伸長の促進、神経細胞アポトーシスの抑制など多岐に渡る報告がなされている[89、91]。一方、TrkB-T1 には細胞内チロシンキナーゼドメインが無く、TrkB-FL のドミナントネガティブまたはリガンドの隔離をしていると考えられてきたが、近年、TrkB-T1 独自のシグナル伝達を介して、海馬ニューロンにおける糸状仮足の形成、グリア細胞での Ca^{2+} シグナルへの関与などが報告されてきている[93-97](図3)。

TrkB は成熟ラット網膜においては網膜神経節細胞層ならびに内顆粒層での発現が確認されている[98-100]。そのため、BDNF がこれらの層に対して保護効果を示すことが想定され、実際に虚血や軸索切断などでその効果が示されている[65、69-76]。一方で、視細胞での TrkB 発現は確認されていない。また、視細胞の培養細胞に対しても BDNF は保護効果を示さない[101]。しかしながら、生体内においては BDNF の投与は視細胞死の抑制効果を示す[60-64、77、78、80-84]。これらの結果は、BDNF のもたらす視細胞保護効果が、解剖学的に視細胞に接している細胞を介して、あるいはパラクリン作用が可能な因子などを介して誘導されていることを推測させる。この考えは、BDNF が網膜内層やミュラー細胞での細胞内シグナル伝達物質の活性化を誘導するが、視細胞内ではこれまでに知られた細胞内シグナル伝達を活性化させないという報告からも支持される[102]。また、KCN-誘導性の網膜細胞死において、BDNF の KCN 処

理直前での投与では神経保護効果が観察されないが、二日前の投与では細胞死抑制が見られることから、BDNF が間接的に働いているという考えは支持される[103]。しかしながら、BDNF が誘導する視細胞保護因子の同定はなされていない。また、異なる機構として、傷害を受けた網膜の視細胞で TrkB 発現が起こり、TrkB 発現をした視細胞が BDNF を受容するという可能性が考えられた。

連続光照射による網膜変性時に bFGF や CNTF の mRNA の発現上昇が起こることや、ミュラー細胞でのグリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)の受容体が発現上昇されることが報告されている[104-106]。また、光傷害網膜において、マイクログリア細胞とミュラー細胞間の相互作用が神経栄養因子の生成を調整し、視細胞の生存に関わっていることを示唆した論文も発表されている[107]。これらの報告から、栄養因子やその受容体の発現は網膜保護に重要な役割をしている可能性があり、ミュラー細胞がその役割を演じる主要な細胞である可能性が示唆される。

本研究では、BDNF の視細胞保護機構の解明を目的とした。BDNF による視細胞保護機構の解明は、栄養因子を利用した難治性網膜疾患の治療法開発の糸口になると期待される。そこで、始めに連続光照射後のラット網膜において BDNF や TrkB 発現が変化しているかどうかを検討した。次に、網膜器官培養法の検討を行い、最後に網膜器官培養を用いた BDNF 投与で分泌が誘導されるタンパク質の解析を行った。

第2章 連続光照射ラット網膜における TrkB アイソフォーム発現の変化と視細胞変性過程との関わり

1. はじめに

白色ラットを使用した連続光照射による網膜傷害は1966年にNoellらにより初めて発表されて以来[35]、今日までに視細胞変性モデル動物として広く研究に用いられている。この視細胞変性モデルは、難治性網膜疾患である網膜色素変性症や加齢黄斑変性症と同じ、視細胞のTUNEL-陽性のアポトーシスを引き起こすことから、これらの疾患の病態解明や、治療法確立の研究材料として有用である。

脳由来神経栄養因子(BDNF)はニューロトロフィン3 (NT-3)などを含むニューロトロフィンファミリーの一員である。ニューロトロフィンファミリー分子は主に神経細胞で発現しており、中枢や末端神経系の両方でニューロンの分化、成熟、そして生存を調節している[43-47]。このBDNFは主に高親和性チロシンキナーゼ受容体TrkBを介して機能を発揮すると考えられている[85]。TrkBには複数のアイソフォームが存在し、細胞内ドメインを有する全長型 (TrkB-FL)と細胞内ドメインを欠失している型 (TrkB-T1)が知られている[87、88]。BDNFによる細胞内シグナル伝達はTrkB-FLを介して誘導されていると考えられてきたが、近年ではTrkB-T1も独自のシグナルで機能を発揮することがわかってきた[93-97]。

BDNFを始めとする神経栄養因子の視細胞保護効果は形態学的分析を中心に報告されてきたが[60-64、77、78、80-84]、視細胞自身はTrkBを発現していない。そのため、BDNFがどのような機構で視細胞を保護しているかは不明である。考えられる機構として、主に2つ挙げられる。1つは、解剖学的に視細胞に接している細胞を介して、あるいはパラクリン作用が可能な因子などを介して誘導されているという間接的な機構である。この考えはBDNFが網膜内層やミュラー細胞での細胞内シグナル伝達物質の活性化を誘導するが、視細胞内ではこれまでに知られた細胞内シグナル伝達を活性化させないという報告から支持される。もう一方は、傷害を受けた視細胞がTrkBを発現

するようになるという直接的な機構である。これらの機構に関して、詳しい説明は未だなされていない。しかしながら、光傷害後の網膜ミューラー細胞で他の栄養因子受容体 (GDNF receptor) が up-regulation されることが報告されている[106]。このことから、栄養因子がもたらす視細胞保護にミューラー細胞が間接的に作用していることが示唆される。栄養因子やその受容体発現は網膜保護に重要な役割をしている可能性があり、その中で BDNF-TrkB シグナルも重要な役割を担っていると考えられる。

そこで本研究では、連続光照射ラット網膜において、BDNF および TrkB アイソフォームの発現が変化するか検討した。

2. 実験材料および実験方法

2-1 抗体

ウザギポリクローナル抗 BDNF 抗体(sc-546)、ウサギポリクローナル抗 TrkB-FL 抗体(sc-12)、ウサギポリクローナル抗 TrkB-T1 抗体(sc-119)、ヤギポリクローナル抗 TrkB 細胞外ドメイン抗体(sc-20542)、マウスモノクローナル抗 Thy-1 抗体(sc-19614)、マウスモノクローナル抗 GAPDH 抗体(sc-32233)およびウサギ通常免疫グロブリン G (sc-2027)はそれぞれ Santa Cruz 社から購入した。マウスモノクローナル抗 S-100 β サブユニット抗体(SH-B1)は SIGMA 社より購入した。tetramethylrhodamine isothiocyanate isomer R (TRITC)-標識ブタ抗ウザギ免疫グロブリン G 抗体、fluorescein isothiocyanate isomer 1 (FITC)-標識ヤギ抗マウス免疫グロブリン G 抗体、horseradish peroxidase (HRP)-標識ヤギ抗ウザギ免疫グロブリン G 抗体および alkaline phosphatase(AP)-標識ヤギ抗ウサギ免疫グロブリン抗体は DAKO 社より購入した。

2-2 実験動物

以下の動物実験は、弘前大学動物実験に関する指針に則って行った。

Sprague-Dawley ラット(200-250g)をチャールスリバー社より購入した。これらのラットを 12 時間点灯、12 時間消灯の条件下で飼育した。飼料は固形飼料 MF(オリエンタル酵母工業)を不断給餌し、飲料水はオートクレーブ(121℃, 15 分)で滅菌した水道水を与えた。床敷にはホワイトフレーク(オリエンタル工業)を用いた。

2-3 連続光照射処理

連続光照射の前の少なくとも 2 日間は約 100 ルクスの白色光下のケージで飼育した。連続光照射実験として、ケージ内が 2500~3000 ルクスになるような白色光を 6、12、24、48 および 168 時間連続して照射した。連続光照射後、ラットはジエチルエーテル(和光純薬)にて安楽死させた。ラットより眼球を摘出し、各実験に用いた。比較検体には連続光照射を行っていないラットを用いた。

2-4 凍結切片の作製

摘出した眼球をダルベッコリン酸緩衝塩類溶液(DPBS)で洗浄後、4%パラホルムアルデヒドを含む 0.1M リン酸緩衝液(PB, pH 7.4)で 20 分間固定した。固定後の眼球から前眼部(硝子体を含む)を除去し、後眼部を再び固定液に戻し 4℃で一晩固定した。サンプルを 10%および 20% ショ糖を含む PB に各 2 時間浸した後、OCT compound(サクラ精機 Tissue-Tek 4583)中で凍結包埋した。凍結サンプルからクリオスタット(ライカ、CM3050)で 10 μ m の切片を作製し、卵白アルブミンコートしたスライドガラスにマウントした。切片は使用するまで-20℃で保存した。

2-5 TdT-dUTP terminal nick-end labeling (TUNEL)

アポトーシスを起こした細胞を同定するため、アポトーシス検出キット(ApopTag™ Peroxidase In situ Apoptosis Detection Kit, CHEMICON, S7100)を使用した。手順はキットの説明書通りに行い、対比染色としてメチルグリーン染色を行った。ONL の長

さ 200 μ m あたりの TUNEL-陽性細胞数を無作為に選んだ 12 箇所計測し、TUNEL-陽性細胞数(mean \pm SD)を決定した。

2-6 ウェスタンブロッティング

光照射後のラット眼球から DPBS 中で網膜を実体顕微鏡下で摘出し、溶解緩衝液 (137mM 塩化ナトリウム(NaCl), 20mM トリス塩酸緩衝液(Tris-HCl) pH 7.6, 1% ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル, 10% グリセロール, 1mM PMSF, 10 μ g/ml アプロチニン, 1 μ g/ml ロイペプチン)に浸した。網膜を超音波処理で破碎し、10,000 \times g で 4 $^{\circ}$ C, 5 分間の遠心分離後、上清を回収した。上清のタンパク質濃度を BCA protein assay kit (PIERCE)で決定し、-20 $^{\circ}$ Cで保存した。7.5%アクリルアミドゲルで SDS-PAGE を行い(30 μ g/lane)、分子量マーカーとして Precision Plus Protein Dual Color Standards (BIO-RAD, #161-0374)を使用した。電気泳動後、PVDF 膜 (BIO-RAD)に分離したタンパク質を転写した。

転写後の膜を TBST(10mM Tris-HCl pH 8.0, 150mM NaCl, and 0.1% Tween 20)で洗浄後、非特異的結合を防ぐため Block Ace (大日本製薬, 2x)に浸し、一時間震盪した。TBST で三回洗浄後、一次抗体を含む溶液に浸し 4 $^{\circ}$ Cで一晩震盪した。一次抗体にはウサギ抗 BDNF 抗体(1:500)もしくはヤギ抗 TrkB 細胞外ドメイン抗体(1:500)を使用した。TBST で三回洗浄後、AP-標識ヤギ抗ウサギ免疫グロブリン抗体(1:1000)に浸し、室温で二時間の震盪後、CDP-Star detection reagent (Amersham Bioscience)を使用し、X-線フィルムにバンドを現像した。TrkB 抗体の特異性を調べるため、抗体の 5 倍量のブロッキングペプチド(Santa Cruz, #sc-20542P)を加え、4 $^{\circ}$ Cで一晩の吸収処理した抗体で同様の実験を行った。我々はこれらの実験を 4~6 回繰り返した。

2-7 mRNA 回収と cDNA 合成

光照射後のラット眼球から網膜を摘出した。摘出した網膜より QuickPrep micro

mRNA Purification Kit (Amersham Biosciences 社)で mRNA を回収した。得た mRNA より First-Strand cDNA Synthesis Kit (Amersham Biosciences 社)を用いて cDNA を合成した。各キットは付属の説明書通りに用いた。

2-8 リアルタイム PCR を用いた半定量性 RT-PCR 法

ラット BDNF、TrkB-FL、TrkB-T1 および GAPDH 特異的プライマーは表 1.A に示す配列を用いた。

PCR 反応は Ex taq polymerase (TaKaRa, Kyoto, Japan)を用いて行った。PCR 反応産物は SYBR Green I dye (BMA, Rockland, ME)を用い、蛍光検出システム付きサーマルサイクラー(Smart Cycler; TaKaRa)により定量した。PCR 反応条件は以下の通りである。BDNF、TrkB-FL および TrkB-T1; 1 サイクル-94°C 30 秒, 35 サイクル-94°C 15 秒, 57°C 30 秒, 72°C 30 秒, 87°C 10 秒、GAPDH; 1 サイクル-94°C 30 秒, 35 サイクル-15 秒, 60°C 30 秒, 30 秒, 87°C 10 秒) PCR 反応後、PCR 反応生成物の特異的増幅は、アガロースゲルによる電気泳動から確認した(写真未掲載)。

2-9 TrkB 免疫染色

作製した凍結切片を 0.05% Tween-20 を含むリン酸緩衝塩類溶液(TW-PBS)で洗浄後、非特異的結合を防ぐため 3%ヤギ血清を含む TW-PBS(以下、ブロッキング溶液)で 30 分間処理した。TW-PBS で洗浄後、一次抗体を含むブロッキング溶液で 4°C にて一晩処理した。一次抗体にはウサギ抗 TrkB-FL 抗体(1:100)、ウサギ抗 TrkB-T1 抗体(1:100)、マウス抗 S-100 β サブユニット抗体(1:500)、マウス抗 Thy-1 抗体(1:200)を使用した。陰性コントロールとしてウサギ通常免疫グロブリン G(1:200)を使用した。TW-PBS でのサンプル洗浄後、二次抗体を含むブロッキング溶液で室温にて二時間処理した。二次抗体には TRITC-標識ブタ抗ウサギ免疫グロブリン G 抗体(1:100), FITC-標識ヤギ抗マウス免疫グロブリン G 抗体(1:100)および HRP-標識ヤギ抗ウサギ免疫グロ

ブリン G 抗体(1:250)を使用した。蛍光標識二次抗体で処理したサンプルは TW-PBS で洗浄し、VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI (Vector 社、H-1200)でカバーガラスをかけて封入し、蛍光顕微鏡(Leica, DMI6000B)で観察し、デジタルカメラで撮影した写真を画像解析ソフト (Leica, FW4000)で画像処理した。HRP 標識二次抗体で処理した切片は 0.02%diaminobenzidine (DAB)と 0.005%過酸化水素を含む 50mM Tris-HCl pH 7.5 で、室温にて 5 分間の反応で、抗原を視覚化した後、メチルグリーンでの核染色、エタノールによる脱水処理をした。疎水性封入剤(松浪硝子工業社、MGK-S)でカバーガラスをかけて封入し顕微鏡観察した。

2-10 In situ hybridization

TrkB-FL および TrkB-T1 それぞれに特異的な領域をラット網膜 cDNA より PCR で増幅した。使用した primer は表 1.B の通りである。塩基配列をシーケンサーで確認したのち、Digoxigenin-UTP labeled RNA プローブを DIG RNA Labeling Kit (Roche 社)を用いて作製した。キットは付属の説明書通りに用いた。

連続光照射後のラットより摘出した眼球を DPBS で洗浄後、4%パラホルムアルデヒドを含む 0.1M リン酸緩衝液(PB, pH 7.4)で 4℃で 16 時間固定した。固定後の眼球から前眼部(硝子体を含む)を除去し、後眼部を 10%および 20% ショ糖を含む PB に各 2 時間浸した後、5% CMC compound (株式会社ファインテック)中で凍結包埋した。凍結サンプルからクリオスタット(ライカ、CM3050)で 10 μ m の切片を作製し、卵白アルブミンコートしたスライドガラスにマウントした。切片は使用するまで-20℃で保存した。

凍結切片は前述の RNA プローブと ISHR Starting Kit (株式会社ニッポンジーン)を用いて in situ hybridization 法を行った。キットは付属の説明書通りに用いた。得た標本を蛍光顕微鏡(Leica, DMI6000B)で観察し、デジタルカメラで撮影した写真を画像解析ソフト (Leica, FW4000)で画像処理した。

2-11 統計解析

結果は means \pm standard deviations (SD)で示した。統計学的解析には Fisher' s PLSD を利用した。P< 0.05 を有意差があるとした。

3. 結果

3-1 TUNEL 法による連続光照射による視細胞死の検討

連続光照射による視細胞死を確認するため、TUNEL 法でアポトーシスを起こしている細胞を検出した。図 4 に示す通り、通常網膜においては TUNEL-陽性細胞はまったく検出されなかった。連続光照射 24 時間では外顆粒層(ONL)で測定視野に数個の TUNEL-陽性細胞が観察された(2 ± 1 個/ $200\mu\text{m}$ ONL)。さらに長時間の連続光照射では多数の視細胞が TUNEL-陽性を示した(48 時間; 42 ± 14 個、72 時間; 49 ± 10 個)。168 時間の連続光照射では ONL の厚さは著しく減少し、TUNEL-陽性細胞も 10 数個に減少していた(10 ± 3 個)。本条件の連続光照射では24時間から視細胞死が認められ、ピークは 48~72 時間であった。

3-2 連続光照射ラット網膜における BDNF のタンパク質発現量の変化

連続光照射後の網膜における BDNF 発現量をウエスタンブロッティング法で検討した結果、14kDa の BDNF のバンドが検出された(図 5)。BDNF は連続光照射 6、12 および 24 時間で通常網膜と比べて BDNF 発現量が減少していた。しかしこの減少は一時的で、連続光照射 48 時間で通常網膜と同程度の発現量に回復した。連続光照射 72 時間や 168 時間でも通常網膜と同程度の発現量が観察された。

3-3 連続光照射ラット網膜における TrkB アイソフォームのタンパク質発現量の変化

TrkB-FL と TrkB-T1 の両方のアイソフォームを検出するため、両方に共通である細胞外ドメインに対する抗体を用い、ウェスタンブロッティング法を行った。正常ラット網膜において約 250, 140-145 および 95kDa の 3 本のバンドを検出した。抗原ペプチドで吸収した抗体で行った場合には 140-145kDa と 95kDa のバンドは検出されなかった(図 6 A)。これらの結果から、250kDa バンドは非特異的なバンドであると考えられ、さらに 140-145kDa が TrkB-FL、95kDa は TrkB-T1 であると考えられた。

連続光照射処理したラット網膜において、TrkB-FL は照射 24 時間で通常網膜と比較して有意に減少した(図 6B, 6C)。また、連続光照射 168 時間では TrkB-FL が up-regulation されて観察されたが、連続光照射 168 時間では視細胞死が著しく、網膜全体の細胞組成が大きく正常と異なるため、完全な比較とは言えない。その他の照射時間では有意的な差は認められなかった。

TrkB-T1 は連続光照射 6 時間でわずかな減少を示したが、通常網膜との比較では有意差は認められなかった。また、48 時間以上の連続光照射では通常網膜と比較して、わずかな上昇を示したが、同様に有意差は認められなかった(図 6B, 6D)。しかしながら、連続光照射によって TrkB アイソフォームは一時的に down-regulation され、その後は回復することをこの結果は示唆すると考えられた。

3-4 連続光照射ラット網膜における BDNF および TrkB アイソフォームの mRNA 発現量の変化

連続光照射後の網膜で BDNF および TrkB アイソフォームの mRNA 発現量を調べるため、リアルタイム PCR 法による比較を行った(図 7)。BDNF mRNA 発現量は連続光照射 72 時間までは通常網膜とほぼ同レベルであった。168 時間の連続光照射後では BDNF mRNA 発現は上昇していたが、この時間の照射では著しい視細胞死が起こっているため、正確な比較ではない。TrkB-FL mRNA 発現も BDNF mRNA と同様の結果を示し、TrkB-FL mRNA 発現の著しい変化は見られなかった。対して、TrkB-T1 mRNA 発

現量は連続光照射後 6 時間から上昇を示した。しかしながら、この上昇に有意差は認められなかった。

3-5 連続光照射ラット網膜における TrkB-FL のタンパク質発現局在の変化

連続光照射処理をしたラット網膜で TrkB-FL および TrkB-T1 発現局在が変化するかどうか、免疫組織化学法で調べた。TrkB アイソフォームを区別するために、TrkB-FL と TrkB-T1 では細胞内ドメインが異なるため、それぞれに特異的なアミノ酸配列に反応する抗体を用いた。

正常ラット網膜において、TrkB-FL 免疫反応は神経繊維層(NFL)、網膜神経節細胞層(GCL)、内網状層(IPL)、内顆粒層(INL)および外網状層(OPL)で観察された(図 8A)。これらの反応は、一次抗体の代わりにウサギ通常免疫グロブリン G を用いた陰性コントロールでは観察されなかった(写真未掲載)。外顆粒層(ONL)、視細胞および網膜色素上皮細胞層(RPE)では TrkB-FL は検出されなかった。

網膜神経節細胞(RGCs : GCL に細胞体が局在し、軸索は NFL を構成している)のマーカである Thy-1 抗体との二重染色で、NFL、GCL そして IPL に二重染色性が観察された(図 8B)。この結果は RGCs が TrkB-FL 発現細胞であることを示す。NFL で観察される大きな免疫反応は軸索の束であると考えられた(図 8B, 矢じり)。また、INL の最も内側に局在する細胞での TrkB-FL 反応は Thy-1 とは重ならなかった(図 8B, 矢印)。その局在と合わせて考えると、この TrkB-FL はアマクリン細胞由来と推測される。また、ミュラー細胞のマーカである S-100 β サブユニット抗体との二重染色も行った。正常ラット網膜において、S-100 β は NFL から外境界膜(OLM)まで伸びる突起と INL 中央に位置する細胞体で観察された(図 8C)。また、OPL, OLM でも強い免疫反応が観察された。これらの免疫反応パターンはミュラー細胞特有のものである。S-100 β との二重染色で、INL 中央に局在する細胞体および OPL で二重染色性が観察された(図 8C, 矢印)。この結果から、ミュラー細胞も TrkB-FL 発現細胞であることが示される。通

常ラット網膜における TrkB-FL 発現局在はこれまでの報告と一致し、視細胞での TrkB-FL 発現は認められなかった。

連続光照射 6~24 時間では正常網膜と発現局在は変化しなかった。しかし、72 時間の連続光照射では正常網膜での発現局在に加えて、OLM での発色と、ONL で縦走する発現が観察された。これらの発色は連続光照射 168 時間でも観察された(図 8A, 矢印)。これらの連続光照射後に出現した TrkB-FL 局在がミュラー細胞の形態と類似していたため、S-100 β との二重染色を行った。連続光照射 168 時間処理したラット網膜での二重染色で、ONL を縦走する多数の黄色の蛍光が観察された(図 8D, 矢じり)。また、OLM でも二重染色性が確認された。これらの結果、連続光照射 72 時間以降に、ミュラー細胞の突起、特に視細胞周辺、で TrkB-FL が up-regulation されていることを示す。

さらに詳しく TrkB-FL 局在を調べるため、IPL を中心に DAB 発色による TrkB-FL 検出を行った(図 8E)。蛍光染色では IPL 全域で点状の発色が検出され、観察時にそれらが混ざり合い IPL 全域が蛍光発色していたために詳しい観察が困難であったので、DAB 染色を用いた。DAB による TrkB-FL 検出で、正常ラット網膜において IPL の内側(GCL に近い部位)で突起状の発色を観察した(図 8E, 矢印)。これらの突起状発色は GCL に局在する細胞から伸びていることがわかる場合もあった。GCL の細胞から伸びているという方向性や IPL の内側に主に局在していることから RGCs の突起であると考えた。連続光照射処理が 6 時間の網膜ではこの RGCs 突起様発色が観察されないか、もしくは著しく減少していた。連続光照射 24 時間でもこの発色はあまり観察されなかった。連続光照射 72 時間や 168 時間で、RGCs 突起状発色が再び観察された(図 8E, 矢じり)。これらの結果は、連続光照射によって、RGCs 突起において TrkB-FL の一時的な減少が起こることを示す。

3-6 連続光照射ラット網膜における TrkB-T1 のタンパク質発現局在の変化

連続光照射処理をしたラット網膜で TrkB-T1 発現局在が変化するかどうか、TrkB-T1 の細胞内ドメインに特異的に反応する抗体を用いて、免疫組織化学法で調べた(図 9)。

正常ラット網膜において、INL の内側に局在する細胞の cytoplasm と OPL で TrkB-T1 免疫反応が観察された(図 9B, 9C)。また、RPE でも TrkB-T1 が観察された(図 9B, 9D)。S-100 β と TrkB-T1 での二重染色では、OPL で一部二重染色が観察された(図 9G, 矢印)。この結果は OPL での TrkB-T1 免疫染色結果がミュラー細胞由来であることを示す。また INL の内側に局在するという特徴と、S-100 β との二重染色性がないことから、アマクリン細胞が TrkB-T1 発現細胞であると推測される。GCL や ONL に局在する細胞では TrkB-T1 免疫反応は観察されないか極端に発現が少ないと考えられた。これらの結果から、TrkB-T1 はアマクリン細胞、ミュラー細胞、RPE で発現されていると考えられる。

連続光照射を与えたラット網膜において、連続光照射 3-12 時間では TrkB-T1 は通常網膜の場合と同様であった(写真未掲載)。しかし、光照射 24 時間ではその INL 中央での免疫反応性が上昇し、より長時間の照射でも、この反応性は維持されていた(図 9E, 9F, 矢印)。アマクリン細胞や RPE での TrkB-T1 発現は連続光照射で変化することはない。連続光照射処理した網膜における TrkB-T1 と S-100 β との二重染色で、INL 中央の二重染色性が部分的に観察された(図 9H, 9I, 三角)。これらの結果から、連続光照射によってミュラー細胞は TrkB-T1 を up-regulation する主要な細胞である可能性を示唆する。

3-7 連続光照射ラット網膜における TrkB アイソフォームの mRNA 発現局在の変化

TrkB アイソフォームのタンパク質発現局在の変化が免疫組織化学法で明らかになったが、さらに mRNA 発現局在を調べるため、それぞれのアイソフォームに特異的な RNA プローブを用いた in situ hybridization 法を行った(図 10)。

通常網膜において、TrkB-FL mRNA 発現は主に RGCs で観察された。連続光照射 24 時間までは TrkB-FL mRNA 発現局在は変化しなかった。しかし、連続光照射 48 時間後以降では INL における TrkB-FL mRNA 発現が認められた(図 10A)。この連続光照射を受けた網膜における INL での TrkB-FL mRNA 発現の出現は、免疫組織化学法で観察された TrkB-FL タンパク質のミュラー細胞での発現上昇と一致する。

通常網膜において、TrkB-T1 mRNA 発現は主に INL で観察された。また、GCL でも若干の mRNA が認められた。連続光照射 6 時間では INL での TrkB-T1 mRNA 発現が上昇していた。その TrkB-T1 mRNA 発現上昇は連続光照射 168 時間後までも続けて観察された(図 10B)。この連続光照射を受けた網膜における INL での TrkB-T1 mRNA 発現の上昇も、免疫組織化学法で観察された TrkB-T1 タンパク質の INL での発現上昇と一致することから、ミュラー細胞での発現上昇が起こっていると考えられる。

4. 考察

本研究において、ラット網膜における TrkB アイソフォームの発現局在を明らかにし、さらに連続光照射による視細胞変性時におこる TrkB 発現について検討した。正常ラット網膜では TrkB-FL は RGCs, アマクリン細胞およびミュラー細胞で発現し、TrkB-T1 はアマクリン細胞、ミュラー細胞そして RPE で発現しているが、視細胞ではどちらの TrkB も発現していないことを示した(図 8 および 9)。これらの結果は様々な文献で報告されている TrkB mRNA や protein 発現局在とよく一致している[98-100]。しかし、これまでに TrkB-FL と TrkB-T1 を区別しての網膜での局在を示す報告がなかったが、今回はそれぞれの網膜内での局在を明らかにした。また、ミュラー細胞が TrkB-FL と TrkB-T1 の両方を発現しているが、それぞれ発現局在が異なることも示した。

視細胞変性モデルとして、連続光照射による視細胞アポトーシスの誘導を行った。これまでの報告通り、視細胞の TUNEL-陽性アポトーシスが観察された[35-41]。連続光

照射による視細胞変性誘導は、難治性網膜疾患モデルとして広く用いられているものであるが、光の強度や照射時間によりその変性進行度は変わってくる。今回、我々が用いた条件では連続光照射 24 時間後から TUNEL-陽性細胞が検出され、そのピークは 48 ～72 時間であった(図 4)。168 時間の連続光照射では ONL の厚さの著しい減少が見られた。ONL の厚さの減少は視細胞死の結果起こるものであり、多くの論文で報告されている[35、78、80]。

連続光照射ラットにおいて、照射 24 時間までは BDNF および TrkB-FL タンパク質発現量が減少していた(図 5 および 6)。また TrkB-T1 タンパク質も連続光照射 6 時間で発現量の減少が見られた(図 6)。しかしながら、これらの減少は一時的であり、連続光照射 72 時間以降は通常網膜と同レベルの発現量に回復していた。これらの一時的な減少の理由は定かではないが、TrkB-FL に関しては連続光照射 6 時間から 24 時間の間で、RGCs 突起での発現が一時的に減少していることを免疫組織化学法で明らかにした(図 8C)。連続光照射 6 時間から 24 時間では視細胞死が出現する前であり、RGCs が網膜の中では視細胞から最も遠くに位置する細胞であることから、この一時的な減少は視細胞保護に関与するものであるとは考えにくい。一つの可能性として、光刺激で視細胞から双極細胞などの他の細胞を介して RGCs にシグナル伝達が行われ、最終的に脳に光情報が到達するが、その光刺激によるシグナル伝達機構に BDNF-TrkB が関与していることが考えられる。このことは BDNF が TrkB-FL と平行して連続光照射で一時的に減少しているという今回の結果に加えて、BDNF が神経伝達物質の一つであるドーパミンの分泌を調節するという報告からも[108]、BDNF-TrkB の網膜神経活動における役割を示唆する。また、NMDA 受容体の活性化が生後のラット網膜における BDNF と TrkB 両方の発現を増加させることが示されており[109]、このことは視細胞から RGCs にシグナル伝達するグルタミン酸システムと BDNF-TrkB シグナルが何らかの相互作用をしていることを示唆する。TrkB-T1 もウエスタンブロッティング法で一時的に down-regulation されることが推測されるが、どの細胞がその down-regulation に寄

与しているかは免疫組織化学法では識別できなかった。しかし、TrkB-FL と同時期に down-regulation されていることから、TrkB-T1 も正常の光刺激応答に関与しているのかもしれない。

連続光照射ラット網膜における BDNF および TrkB アイソフォームの mRNA 発現量の変化については、TrkB-T1 で上昇傾向が見られたものの、有意差は認められなかった(図 7)。これらの結果は他の論文での連続光照射 1-7 日では TrkB mRNA 発現量が変化しないという報告と一致している[104]。タンパク質発現量の一時的な減少が観察されたが、こちらも有意差は無かった。これらの結果から、BDNF-TrkB 発現は微妙な調節がなされていると考えられた。

連続光照射を与えたラット網膜において、TrkB-FL がミュラー細胞突起で発現が見られるようになること、そして、その発現変化が傷害部位である視細胞周辺で起こっていることを免疫組織化学法で明らかにした(図 8)。また、連続光照射傷害後のミュラー細胞で TrkB-T1 も発現が上昇することを示した(図 9)。これらの結果は視細胞傷害を受けたラット網膜でミュラー細胞が TrkB アイソフォーム発現を変化させることを示す。このことは in situ hybridization 法での結果と一致する(図 10)。これらの結果や、傷害後の網膜ミュラー細胞で他の栄養因子である GDNF 受容体が上昇するという報告から[106]、ミュラー細胞が網膜機能維持における重要な役割を担っていることを示唆する。

一方、BDNF による視細胞保護機能の可能性として、傷害を受けた視細胞が TrkB を発現するようになるということが考えられたが、今回の結果から、傷害を受けた視細胞でも TrkB が発現することはなかった。このことから、BDNF の視細胞保護効果は直接的に視細胞に作用しているのではなく、間接的な機構で発揮されていることが考えられる。そのため、間接的な機構として、網膜のほぼ全域に存在するミュラー細胞が視細胞近くで TrkB を発現することから、BDNF がもたらす視細胞保護効果はミュラー細胞を介して調節されている可能性が考えられる。

一方、視細胞外節の貪食など視細胞機能維持に重要な役割を持つ RPE が TrkB-T1 発現をしていることが今回の結果から示された。連続光照射による発現の変動は見られなかったが、RPE も BDNF の効果に関与している可能性がある。連続光照射により TrkB-FL と TrkB-T1 の両方がミューラー細胞で発現変化されるが、それぞれ発現時期が異なる。アポトーシス出現時期と比較すると、TrkB-T1 は視細胞のアポトーシスが観察され始めた比較的早期(今回の条件では連続光照射 24 時間)から、TrkB-FL はアポトーシス出現頻度がピーク(連続光照射 48~72 時間)と思われるくらいの TrkB-T1 よりも遅れた時期から視細胞近くで発現されるという違いがあった。この TrkB-FL と TrkB-T1 局在と発現時期の違いは、それぞれの TrkB アイソフォームによって機能が違うことを強く示唆する。すなわち BDNF の刺激が同じ細胞に違う機能をあたえることが推測される。この TrkB アイソフォームによる機能の違いは、海馬ニューロンや神経芽細胞腫でも示されており[93-97]、網膜においても機能の違いがある可能性が高い。

網膜における BDNF 発現細胞として RGCs、アマクリン細胞およびミューラー細胞が報告されている[98、99、110]。また、培養 RPE でも BDNF 産生が行われている[84]。BDNF 産生細胞と TrkB 発現細胞が一致することから、これらの細胞がオートクリン作用で BDNF-TrkB シグナル伝達を行っている可能性が考えられる。また、これらの細胞が隣接して存在することからパラクリン作用の可能性があり、まだまだ多くの検討が必要であると考えられた。

今回は網膜変性モデルとして連続光照射を利用した視細胞変性ラットモデルを利用した。この変性モデルは視細胞の TUNEL 陽性細胞の出現など他の網膜変性疾患と共通する視細胞変性機序を持つと考えられるが、今回の我々の検討より BDNF と TrkB 受容体の発現および視細胞のアポトーシス出現の時間的關係をおおまかに、3 つにわけて考えた。すなわち、視細胞のアポトーシスが全く出現しない早期 (I)、アポトーシスの出現が急速に増加する時期 (II)、視細胞が消失する時期 (III) である。Stage I は TrkB や BDNF が一過性に減少し、stage II では TrkB-FL や BDNF の発現量は回復するが、

TrkB-T1 の発現がアポトーシスの出現に一致するように増加する。Stage III では視細胞が徐々に消失し TrkB-FL が遅れて増加してくる。この経過の中で TrkB の発現増加はミュラー細胞を中心におこっていると考えられた。

視細胞死による網膜変性時にミュラー細胞が応答し、栄養因子受容体の発現を変化させると考えられた。ミュラー細胞は網膜を構成する主要なグリア細胞であるが、神経網膜を保護する機能やグルタミン酸代謝等の網膜維持に重要な役割を果たす一方、臨床的には増殖性硝子体網膜症などの疾患に関与することが知られている[111]。そのため、網膜変性の時期も考慮したミュラー細胞の反応を検討することが重要であると考えられた。

第3章 新規網膜器官培養法の確立

1. はじめに

網膜は視覚を担う中枢神経系組織である。網膜には特殊に分化した神経細胞が存在し、視細胞、双極細胞、水平細胞、アマクリン細胞および網膜神経節細胞と5種に大別される。また、網膜にはミュラー細胞と呼ばれる他の神経細胞の支持や生理調節を行うグリア細胞が存在している。

加齢黄斑変性や網膜色素変性症などの難治性網膜疾患では視細胞のアポトーシスが原因で失明に至る[24-26]。しかしながら、これらの疾患に対しては効果的な治療法が確立されていない。これら疾患は先進諸国における失明原因の上位であり、病態解明および治療法の開発が望まれている。そんな中、神経栄養因子が治療応用に期待されている。神経栄養因子は様々な傷害による網膜変性を抑制することが知られているタンパク質である。中でも脳由来神経栄養因子(BDNF)は網膜を含めた中枢神経系で広く分布しており、中枢神経系の発生や成熟、さらには生存といった多岐に渡り機能を発揮している[43-47]。

BDNF を始めとする神経栄養因子の視細胞保護効果は形態学的分析を中心に報告されてきたが、通常網膜において視細胞自身はBDNF受容体であるTrkBを発現していない[60-64, 77, 78, 80-84]。また、培養した視細胞に対してもBDNFは効果を示さない[101]。さらには傷害を受けた視細胞でもTrkB発現は起こらないことを第2章で示した[112]。これらのことから、BDNFのもたらす傷害後の視細胞保護効果が、解剖学的に視細胞に接している細胞を介して、あるいはパラクリン作用が可能な因子などを介して誘導されていることを推測させる。この考えは、BDNFが網膜内層やミュラー細胞での細胞内シグナル伝達物質の活性化を誘導するが、視細胞内ではこれまでに知られた細胞内シグナル伝達を活性化させないという報告からも支持される[102]。また、視細胞変性過程でミュラー細胞におけるTrkB発現局在が変化すること、その変化が傷害部位である視細胞周辺で起こったことから、ミュラー細胞がBDNFのもたらす視

細胞変性の抑制に重要な役割を担っていると考えられた。すなわち、BDNF を受容したミューラー細胞が視細胞保護効果を持った何らかの因子を放出すると考えられる。

本研究では BDNF がもたらす視細胞保護効果にミューラー細胞が重要な役割を担うと考え、BDNF 刺激でミューラー細胞から放出されるタンパク質の解析を計画した。しかしながら、ミューラー細胞のみを単離することが困難であることや、培養ミューラー細胞では、通常網膜で発揮されているミューラー細胞の機能が損なわれてしまう可能性があるという問題点が挙げられた。また、細胞培養モデルは新しい処理法の研究に用いられる最初のステップとしてしばしば用いられているが、この方法にはいくつかの重要な限定がある。細胞の分化の程度は、その自然の組織特異的環境から移されているために生体内の状況とはかなりの違いがあり、そのため、細胞内の相互作用の効果は減少しているかもしくは消失している可能性が高い。実際、培養ミューラー細胞でも、CRALBP などの *in vivo* でのミューラー細胞の特徴を維持しているが、正常網膜では起こらない GFAP 発現上昇、さらには未成熟神経細胞で発現されるような Tuj1 の発現が起こるなど、正常網膜のミューラー細胞とは異なる性質を示すという報告がなされている[113-119]。さらには細胞培養モデルは、単一の細胞種での調査でしかない。

これらのことから、我々は網膜器官培養を計画した。器官培養法は、培養した組織が生体内と同様な分化、正常な生理機能や組織特異性の維持をしながら培養を行う方法である。しかしながら、細胞培養と比べて、高度に分化し、多層状の組織である網膜は従来の静的な培養では、不十分な栄養と酸素供給のため、その維持は困難である。初期の網膜の器官培養は、全眼球のままや剥離網膜で試みられており、これらの報告では発生段階の網膜を用いて生体内と同様に分化できるかを試みている[120-123]。また、培養方法も様々検討され、脈絡膜-RPE-網膜複合体を用いるものなども報告されてきた[124]。以来、胚からの網膜発生または遺伝子欠損動物の網膜の発生異常などの解析に器官培養は用いられ、BDNF を始めとする栄養因子や他の因子の網膜発生への関与なども検討されてきた[109,125-128]。

我々は成熟網膜への BDNF 投与で培地中に放出されるタンパク質の解析を目的としている。そのため、これまでの報告のような発生段階の網膜を用いたものや、脈絡膜-RPE-網膜複合体での培養などは適さない。また、これまでの網膜を含む器官の培養例では培地に血清などのタンパク質成分を多量に含む栄養の添加を行っており、無血清培地での報告例はない。しかし、培地中に放出されるタンパク質の解析には、外来性のタンパク質成分は解析を困難にする。網膜のように多種の神経細胞が一定の配列で機能を発揮している組織では、全層の構造を保ったままで培養することが理想であり、そのために培養器および培養環境の至適条件を見いだす必要がある。

そのため、我々は無血清培地での成熟網膜器官培養法を確立することとした。始めに通常の単一細胞での培養で用いられる培養ディッシュでの培養を検討した後、透析膜を利用した新規の器官培養方法を開発し、網膜に適した培地および酸素濃度の検討、さらに *in vivo* での機能を維持できているかを検討した。

2. 実験材料および実験方法

2-1 培養ディッシュによる網膜器官培養

屠殺場より購入したブタ眼球より余分な肉を除去し、70% エタノールで5秒間滅菌した。DPBSで3回洗浄後、前眼部を除去し、アイカップにした。使用する培地中でアイカップを2等分した。2等分したアイカップから約2cm²角の網膜を摘出した。摘出した網膜を2mlのEagle's MEM (Nissui, Tokyo)を入れた3.5cm dish (greiner bio-one, Tokyo)に、視細胞側を下にしておいた。胎児ウシ血清(FBS)を加える場合には最終濃度を5%とした。DishをCO₂インキュベーターに置き、5% CO₂、37℃で培養した。培養開始後12および24時間後に培養網膜は組織観察を行うため、凍結切片作製に用いた。

2-2 透析膜前処理

適当な大きさに切った透析膜を 70%エタノール(1 時間、3 回), 10mM 炭酸水素ナトリウム溶液(1 時間、2 回), 1mM EDTA 溶液(1 時間)および蒸留水(1 時間)に順に浸した。その後、ミリ Q 水で軽く洗浄し、ミリ Q 水中でオートクレーブ(121℃、20 分間)した。オートクレーブ後、室温に冷却したものを培養に用いた。

2-3 透析膜系網膜器官培養

屠殺場より購入したブタ眼球より余分な肉を除去し、70% エタノールで 5 秒間滅菌した。DPBS で 3 回洗浄後、前眼部を除去し、アイカップにした。使用する培地中でアイカップを 2 等分した。2 等分したアイカップから約 2cm² 角の網膜を摘出した。あらかじめ前処理をした透析膜に 2ml の培地を入れ、透析膜中に網膜片を加え、両端を結び培養バッグとした。培養バッグに重りを縛り付け、300ml の培地中に沈めた。培養バッグを入れたビーカーを密閉可能なチャンバーに置き、チャンバー内を滅菌水で埋めた。酸素濃度を調節したガス(50ml/分)を繋いだチューブを培地内に通し、培養中は常にチャンバーを 37℃に設定したウォーターバスに設置し、培養開始とした(図 11)。

2-4 培地の検討

無血清培地での網膜器官培養を行うにあたり、培地の検討を行った。基本培地として Eagle's MEM (Nissui, Tokyo)を用いた。また添加栄養として、グルコースを添加する場合、最終グルコース濃度を 3g/L (3 倍量)、5g/L (5 倍量)もしくは 10g/L (10 倍量)とした。各グルコース濃度の培地での 24 時間の培養後、培養網膜は凍結切片作製に用いた。

2-5 酸素条件の検討

成熟網膜の透析膜器官培養における気相条件を検討するにあたり、95%酸素／5%二

酸化炭素(酸素ガス)と 95%窒素/5%二酸化炭素(窒素ガス)を用いて条件を設定した。酸素濃度 20%では酸素ガス：窒素ガス=1：3、酸素濃度 50%では1：1、酸素濃度 70%では2：1、酸素濃度 95%では酸素ガスのみを用いた。各酸素条件で 24 時間の培養後、培養網膜は凍結切片作製に用いた。

2-6 培養時間の検討

検討した条件での透析膜系器官培養において、どのくらいの期間の培養が可能であるかを検討した。培養は 24、48 および 72 時間行い、培養後の網膜を凍結切片の作製に用いた。

2-7 器官培養における連続光照射による視細胞変性誘導と BDNF 投与

生体内での現象を器官培養網膜でも観察されるかどうか検討するため、器官培養においても連続光照射による視細胞変性誘導が可能か検討し、さらに外来性の BDNF が視細胞死を抑制するかどうか検討した。

連続光照射処理として、白色光でチャンバー内の光強度を約 3000~4000 ルクスに調整した。暗条件では培養開始後にチャンバーに光が当たらないように遮光した。BDNF 投与実験では培養バッグの中にリコンビナントヒト BDNF(rhBDNF, Alomone Labs Ltd.) 10ng/ml を加えた。これらの条件での培養後、網膜は凍結切片作製に用いた。

2-8 凍結切片作製

培養後の網膜を取り出し、2.5% グルタルアルデヒドを含む 0.1M PB pH 7.4 に浸して室温で一晩の固定を行った。固定した培養後網膜より 5mm² 角の網膜片を得てサンプルとした。培養には約 2cm² 角の網膜を用いているが、網膜片の端はハサミで切断した部位であり、物理的なダメージが大きいと考えられたため、中央部からサンプルを取った。サンプルを 10%および 20% ショ糖を含む PB に各 2 時間浸した後、OCT

compound(サクラ精機 Tissue-Tek 4583)中で凍結包埋した。凍結サンプルからクリオスタット(ライカ、CM3050)で $8\mu\text{m}$ の切片を作製し、卵白アルブミンコートしたスライドガラスにマウントした。切片は使用するまで -20°C で保存した。

2-9 ヘマトキシリン／エオジン染色

凍結切片で組織観察を行うため、ヘマトキシリン／エオジン染色法を用いた。作製した凍結切片をリン酸緩衝食塩水(PBS)で洗浄後、ヘマトキシリン溶液に 15 分間浸した。水道水で十分に洗った後、エオジン溶液に 5 分間浸した。再び水道水で十分に洗浄した後、70、80、90 および 100%エタノールに順に浸し脱水処理をした。最後にキシレンに浸した後、疎水性封入剤(松浪硝子工業社、MGK-S)でカバーガラスに封入し顕微鏡観察した。各培養条件による実験を少なくとも 3 回行い、そのうち、最も良く網膜層構造が保存された箇所を用いて組織評価を行った。

2-10 網膜タンパク質の回収

以下の操作は 4°C もしくは氷上で行った。培養前もしくは培養後の網膜を回収し、DBPS で洗浄した。網膜を 1mM EDTA, 1mM EGTA, 5mM 2-メルカプトエタノールおよび 0.25M スクロースを含む 20mM Tris-HCl pH 7.5 中で、ガラス-テフロンホモジナイザーで破碎した。遠心管に移し、 $1,500\times g$ で 5 分間、 $4,500\times g$ で 10 分間、 $20,000\times g$ で 20 分間の遠心分離を順に行った。上清を $100,000\times g$ で 1 時間の超遠心を行い、得られた上清を試料として回収した。網膜から放出されたタンパク質濃度はトリクロロ酢酸-コール酸(TCA-cholate)沈殿法と Lowry 法[129]を組み合わせた方法により測定した。TCA-cholate 沈殿法は Bensadoun らのデオキシコール酸ナトリウムを使用する方法[130]を改変したタンパク質沈殿法である。1.5ml エッペンドルフチューブに放出されたタンパク質を入れ、蒸留水で $550\mu\text{l}$ に合わせた。1%コール酸溶液を $50\mu\text{l}$ 加え攪拌し、15 分間、室温で静置した。その後、24%トリクロロ酢酸溶液を

200 μ l 加え攪拌し、12,000 \times g, 2 分間, 15 $^{\circ}$ Cで遠心した。遠心後、アスピレーターにより上清を吸引し、続けて Lowry 法を行ない、タンパク質濃度を決定した。得られた試料はグルタミン合成酵素活性に用いた。

2-11 グルタミン合成酵素(GS)活性の測定

グルタミン合成酵素活性測定は Meister A.の方法を参考に行った[131]。90 μ l の反応液(100 μ M ADP、5 μ M MnCl_2 、5mM L-グルタミン、25mM PB pH 7.2、50 μ M イミダゾール-塩酸緩衝液 pH 7.2 および 100 μ M ヒドロキシルアミン-水酸化ナトリウム pH 7.2) に 2-10 で得た試料 10 μ l を加え、37 $^{\circ}$ Cで2時間反応させた。150 μ l の塩化鉄溶液(370 μ M FeCl_3 、200mM TCA および 670 μ M 塩酸)を加え、攪拌した後、10,000 \times g で5分間の遠心分離を行った。上清を回収し、波長 535nm の吸光度を測定した。本条件下で生成反応物(γ -glutamylhydroxamic acid)が 1 μ モルのとき 535nm の吸光度が 0.34 であるとして、本条件下での酵素活性を μ mol/15 分間/mg protein として算出した。

2-12 TUNEL 法

アポトーシスを起こした細胞を同定するため、アポトーシス検出キット(ApopTagTM Peroxidase In situ Apoptosis Detection Kit, CHEMICON, S7100)を使用した。手順はキットの説明書通りに行い、対比染色としてメチルグリーン染色を行った。染色後のサンプルを顕微鏡観察した。

3. 結果

3-1 培養ディッシュによる網膜器官培養

通常の細胞培養に広く用いられている培養ディッシュによる網膜器官培養を試みた。無血清培地による培養では12時間の培養後、視細胞外節の脱落が見られた(図 12, 赤

矢印)。また、INL での空洞が多数観察された(図 12, 黒矢印)。24 時間の培養ではさらに網膜全体で空洞が観察され、さらに膨潤化が見られた。一方、FBS を添加した場合、12 時間培養後も網膜層構造は良く保存されていた。しかし、24 時間の培養では網膜内層、特に IPL での膨潤が起こっていた。これらの結果から、培養ディッシュを用いた培養では無血清培地での培養は不可能と考えられた。また、栄養成分として FBS を投与した場合でも長時間の培養が不可能であることから、網膜の器官培養には新たな培養系が必要であると考えられた。

3-2 透析膜系網膜器官培養

無血清培地での網膜器官培養を確立するため、透析膜を利用した培養系を考案した。透析膜の分子量 12,000~16,000 以上の分子を透過させないという性質で組織を包むことにより微小空間を作り出し、その微小空間内で組織自身から放出されたタンパク質などは微小空間中に留まるが、主な老廃物であるアンモニアや二酸化炭素は外に透過させることができるため、組織の維持に最適であると考えた(図 11)。気相は直接培地に設定したガスを吹き込むことで、酸素供給を満たした。ガスを直接吹き込むことによって透析膜のバッグが浮かんでしまうのを避けるため、重りをつけた。また、温度条件を一定にするため、ウォーターバスにチャンバーを入れた。

始めに、作製した透析膜系の器官培養で網膜の層構造が維持されるかを検討した。新しい系での培養のため、最適条件は不明であったので、まずは、Tamai らの文献を参考に、酸素濃度は 50%、温度は 37℃で培養を行った[121]。培地には標準的な細胞培養で用いられている Eagle's MEM をそのまま用いた。本器官培養での培養後の網膜より凍結切片を作製し、組織観察を行った。

培養前の網膜ではきれいな核の 3 層構造(GCL, INL および ONL)が観察された(図 13)。24 時間の培養後の網膜でも 3 層構造は見られた。しかしながら、INL での空洞化が多数観察された(図 13, 矢印)。さらに網膜内層(ILM~INL)の膨潤が起こっていた。これ

らのことから、無血清培地中 24 時間の器官培養でもある程度の層構造維持は可能であるが、網膜内層、特に INL に局在する細胞にダメージが起こったと考えられた。

3-3 網膜器官培養における最適培地の検討

透析膜系の器官培養において、無血清培地を用いてもある程度の組織維持が可能であることがわかった。そこで、さらに最適な条件を検討するため、まずは培地の改変を試みることにした。網膜は中枢神経系の組織であり、ニューロンが豊富な組織である。また、網膜は酸素要求性が高い組織であると考えられているが、グルコース貯蔵が少ない組織である。そこで、我々は非タンパク質性の栄養成分としてグルコースの添加を検討した。通常の Eagle's MEM でのグルコース濃度は 1 g/L であるが、我々は 3 および 5 倍量(最終濃度 3g/L、5g/L)のグルコースを添加した培地での器官培養を行った(図 14)。

通常の Eagle's MEM での培養では網膜内層での空洞化や膨潤が見られたが、3 倍量のグルコース添加した場合、INL での空洞が減少した。また、内層の膨潤も改善されていた。さらに 5 倍量のグルコース添加した培地では空洞化や膨潤はほとんど観察されず、培養前のような構造が観察された。これらの結果から、グルコースの添加は網膜器官培養に効果的であることが示された。

3-4 網膜器官培養における最適酸素濃度の検討

透析膜系の網膜器官培養において、グルコースを添加した無血清培地での培養が可能であることがわかった(図 14)。これまでの検討では Tamai らの文献を参考に酸素濃度を 50%に設定して培養を行ってきた[121]。網膜は酸素要求性が高いことが知られ、また本器官培養でも主要なエネルギー源であるグルコースの添加が有効であったことから、好気呼吸に必須である酸素の供給は網膜機能維持に重要な要因であると考えられた。そのため、次に供給するガスの酸素濃度を検討した(図 15)。

酸素濃度 50%では前述の通り、培養による著しい傷害のない網膜層構造の維持が観察される。50%より低い、酸素濃度 20%では INL で空洞が多数観察された。また、網膜内層の膨潤も観察された。この結果から、地上気相よりも高濃度の酸素が必要であることが示唆された。

酸素濃度 50%よりも高い酸素濃度 70%では INL の空洞はほとんどないものの、網膜内層、特に ILM~GCL、での膨潤が観察された。さらに高濃度の酸素濃度(95%)では INL での空洞、網膜内層での膨潤に加えて、OPL および ONL での空洞も観察された。これらの結果から、網膜器官培養における最適酸素濃度は 50%であることが示された。

3-5 網膜器官培養の培養時間

本器官培養系を用いた培養で、どのくらいの期間の培養が可能か検討した(図 16)。培養条件はグルコース添加(5g/L)Eagle's MEM、酸素濃度は 50%、温度は 37℃で行った。72 時間の培養でも 3 層構造は良く保たれており、空洞化や膨潤は観察されなかった。しかしながら、TUNEL 法による細胞死を調べた結果、72 時間の培養後では GCL および INL で TUNEL-陽性細胞が検出された(図 16 矢印)。この結果から、本器官培養系で、48~72 時間の培養が可能であると考えられた。

3-6 培養後網膜における GS 活性の維持

網膜生理機能維持を調べるため、グルタミン合成酵素(GS)活性を測定した。GS はミューラー細胞に存在し、神経伝達物質であると同時に興奮毒性を有するグルタミン酸を無毒なグルタミンに変換する酵素であり、生体内で網膜機能維持に重要な役割を担う酵素の一つである。そこで、我々は器官培養後の網膜でも GS 活性が維持されているかどうか検討した(図 17)。培養前の網膜では $18.81 \pm 2.10 \mu\text{mol}/15 \text{ 分間}/\text{mg}$ の GS 活性を示した。器官培養後の網膜でも培養前の網膜と同程度の GS 活性を示した(24 時間 ; 18.45 ± 1.56 、48 時間 ; 18.71 ± 0.94)。これらの結果から、無血清培地での透析膜

系器官培養で、網膜生理機能が維持されていることが示された。

3-7 網膜器官培養における連続光照射による視細胞死の誘導と BDNF 投与

透析膜系網膜器官培養法により無血清培地での培養が可能であることを層構造の観察および GS 活性測定で示した。次に生体内での現象を器官培養網膜でも再現できるか検討するため、連続光照射による視細胞死誘導が可能であるか調べた(図 18)。細胞死の判別には TUNEL 法を用いた。

培養前の網膜では TUNEL-陽性細胞は検出されなかった。連続光照射条件下で 48 時間の培養後でも ONL における TUNEL-陽性細胞はほとんど検出されなかった。しかし、72 時間の培養後では ONL で多数の TUNEL-陽性細胞が検出された(図 18, 矢印)。また INL でも TUNEL-陽性細胞が検出された(図 18, 矢じり)。一方、連続光照射の対照実験として暗条件下で 72 時間の培養を行った場合、ONL では TUNEL-陽性細胞は検出されなかったが、INL に局在する細胞で TUNEL-陽性細胞が検出された。この結果から、器官培養網膜でも生体内で起こるような連続光照射による視細胞死が起こることが示された。また、BDNF を投与した場合、連続光照射による ONL での TUNEL-陽性細胞は著しく減少した。しかし、INL での TUNEL-陽性細胞数には変化がなかった。これらの結果から、本器官培養においても BDNF が視細胞死抑制効果を示すことが示された。

4. 考察

本研究において成熟網膜への BDNF 投与で培地中に放出されるタンパク質の解析を行うため、無血清培地での器官培養系の確立を試みた。これまでの報告では成熟網膜単体でかつ無血清培地での器官培養を行った例はなく、新規の方法が必要であると考えられた。始めに通常の細胞培養に広く用いられている培養ディッシュでの器官培養を検討した。培養ディッシュを用いた器官培養において、無血清培地では視細胞外節の脱落など、網膜傷害が見られた。また、FBS を投与した場合でも 24 時間以上の培養では網膜

内層での傷害が観察された。これらの結果から、新しい培養系を構築する必要があると考えられた。

そこで我々は透析膜を利用した培養系を考案した。本器官培養系では透析膜で組織を包むことにより微小空間を作り出している。分子量 12,000~16,000 以上の分子を透過させないという透析膜の性質により、包まれた組織自身から放出されたタンパク質などは微小空間中に留まるが、主な老廃物であるアンモニアや二酸化炭素は外に透過させることができる。また、これまでの報告例から、十分なガス供給が網膜には必要であることが考察されていたが、本器官培養系では直接的にガスを培地に吹き込むことで、その条件を満たした。

本器官培養系を用いた網膜の無血清培養を試み、最適な条件として、グルコースを添加した培地、そして酸素濃度 50%という条件を見いだした。本器官培養では剥離網膜を培養に用いている。しかし、生体内で網膜剥離が起こると視細胞死が起こる[132-134]。また、視神経切断は RGCs の傷害となり、網膜内層の変性が起こる[69-76]。そのため、単離した網膜を用いた本器官培養においても、RGCs および視細胞に多大な傷害が起こると考えられた。しかしながら、24 時間の培養後に見られたのは主に INL での空洞化であり、予想された RGCs や視細胞の脱落などは特に観察されなかった。生体内でも多種の細胞で構成される網膜には 1 つの要因に対して脆弱な部位とそうでない部位が存在すると考えられるが、本器官培養は RGCs や視細胞の維持に適したものであった可能性が示唆される。INL での空洞化を改善するため、タンパク質成分以外の栄養を添加することとし、主要なエネルギー源であるグルコースを添加した。生体内において、網膜内層には毛細血管が存在し、その血管を通じて網膜内層への栄養供給を行っている。しかし、摘出した網膜では血液循環がなく、そのために起きるエネルギー欠乏が INL での空洞化を引き起こしていると考えられたこと、また、網膜にはグリコーゲン貯蔵が他の組織に比べて少ないことから、エネルギー源となるグルコースを選択した。グルコースの添加により濃度依存的に INL での空洞化が改善された。24 時間の培養で

は 5g/L で十分な効果が見られたが、さらに長時間の培養を見据え 10g/L のグルコース添加を最適濃度とした。

また、網膜は酸素要求性が高い組織であるため、酸素濃度の検討も行った。地上気相に近い 20% では INL での空洞が多数観察された。この結果は、グルコース添加前の培養と同様の結果であった。このことから、十分なグルコースが存在してもエネルギーとして利用する好気呼吸が十分に行われていない可能性が考えられたため、地上よりも高い酸素濃度が必要と考えられた。そのため、酸素濃度 50% で培養を行ったところ、培養前と同様の組織像が観察された。この結果から、酸素供給が重要であると考えられたが、さらに高濃度の酸素(70 および 90%)では、網膜に空洞化が見られた。このことから、70%以上の高濃度の酸素条件下での培養では酸化ストレスが起こり、INL に傷害を与える結果となったと考えられた。これらの結果から、本器官培養では酸素濃度は 50% が最適であるとした。

これまでのグルコースを添加した培地で酸素濃度 50%の条件下でどのくらいの期間の培養が可能であるか調べた。培養後の組織切片の観察では 72 時間の培養後でも網膜層構造は良く保たれていた。しかし、TUNEL 法での細胞死の観察では GCL および INL の最も内側に局在する細胞にアポトーシス細胞が認められた。これらの局在から、RGCs とアマクリン細胞がアポトーシスを起こしていると考えられた RGCs は軸索切断を受けているため、生体内と同様に細胞死を起こしたと考えられた。生体内における軸索切断では切断した後、数日後から RGCs のアポトーシスが起こるが、我々の器官培養では 48 時間の生存が見られた。この結果は、本器官培養系において網膜が生体内とほぼ同様の現象を示すと考えられる。アマクリン細胞のアポトーシスの原因は不明であるが、直接相互作用していると考えられる RGCs の脱落により、何らかの影響を受けたためと考えられる。少なくとも、これまでの検討から、透析膜培養法を用いた無血清培地による網膜器官で、48 時間の培養が可能であることが示された。

さらに我々は、器官培養中の網膜が生体内と同様の機能や動向を示すかどうか検討し

た。生体内における網膜ではグルタミン酸は主要な興奮性の神経伝達物質として機能しているが、一方では過剰なグルタミン酸は NMDA 型受容体を介した興奮毒性を示し、神経細胞死を引き起こすことが知られている[67]。その興奮毒性およびアンモニア毒性に対する生体防御として、グルタミン合成酵素(GS)が重要な働きを担っている。GS はグルタミン酸とアンモニアを代謝して無毒なグルタミンにする酵素である。網膜内ではミュラー細胞が GS を発現している[135,136]。シナプス間に分泌され、その神経伝達物質としての機能を果たしたもの、また過剰に分泌されたグルタミン酸を、ミュラー細胞が細胞膜で発現しているグルタミン酸トランスポーターを介して細胞内に取り込み、取り込んだグルタミン酸を GS で無毒化している。この GS 活性が器官培養後の網膜でも保たれているかを調べたところ、48 時間の培養後の網膜でも培養前と同程度の GS 活性を示した。次に生体への連続光照射で視細胞のアポトーシスが起こることは第 2 章でも示したが、器官培養網膜でも同様に視細胞死が起こるか検討した。連続光照射を与えた器官培養で、48 時間では ONL での TUNEL 陽性細胞は検出されなかったが、72 時間の培養では ONL に多数の TUNEL-陽性細胞が観察された。対照実験で行った暗条件下での培養では 72 時間でも ONL に TUNEL-陽性細胞は認められなかった。この結果から、本器官培養においても連続光照射による視細胞死が誘導できることが示された。また、器官培養においても BDNF が視細胞保護効果を発揮するか検討したところ、図 18 で示すように BDNF 投与により器官培養網膜における連続光照射による視細胞死を抑制された。これらの結果から、本器官培養で、網膜生理機能が保たれていることが示された。

網膜のように多種の神経細胞が一定の配列で機能を発揮している組織では、全層の構造を保ったままで培養することが理想であるが、我々は成熟網膜でそれを可能にする新規の器官培養方法を確立した。また、網膜に関しては、成熟網膜を用いた無血清培地での培養が可能を示した。無血清培地を用いることができれば、外来性でかつ不明な成分が多いウシ胎児血清などを用いることなく、目的の試薬の効果を純粋に評価できる。

実際、我々は器官培養網膜において BDNF の投与による視細胞死の抑制を観察した。本研究で、新規の網膜器官培養法を確立したが、48 時間以上の培養では細胞死が多数観察された。培養に用いたのは視神経切断され、かつ RPE との剥離がなされている単一網膜である。視神経は網膜からの光情報を脳に伝達するだけでなく、脳からの栄養分を輸送する重要な役割を持っている。この視神経切断は、栄養供給を途絶えさえるとともに、視神経は RGCs の軸索で構成されているため、この細胞に物理的な傷害を与える。また、視細胞の外節部分は通常では RPE と結合しており、RPE は外節を貪食している[17-19]。この貪食作用は外節の維持に必要であり、貪食作用の欠損は外節の崩壊を引き起こし、最終的には視細胞のアポトーシスを誘導する[137]。摘出した網膜単体ではこれらの傷害を受けることとなり、いくら栄養分を添加しても外部環境の機能不全のために、長期間の培養は困難である可能性が高い。実際、血清を添加した培地を用いた場合でも、視細胞外節の脱落や RGCs アポトーシスが起こる事が報告されている[138]。しかしながら、今回のように 48 時間の培養が可能であれば、投与した試薬の短期的な効果だけでなく、試薬に応答した遺伝子発現なども観察できると考えられ、非常に有用であると考えられる。本研究では網膜以外の組織は検討していないが、この透析膜を利用した器官培養系は他の組織にも応用が可能であると考えられ、新規の培養系として期待される。

第4章 新規網膜器官培養法を用いた BDNF 投与により培養上清中に分泌されるタンパク質の解析

1. はじめに

先進諸国における失明原因の上位である加齢黄斑変性症や網膜色素変性症などでは、視細胞の不可逆的な変性が起こるため、失明に至る。これらの疾患に対しては効果的な治療法がなく、その病態解明および治療法の確立が望まれている。そんな中、脳由来神経栄養因子(BDNF)が治療応用に期待されている。BDNF は視細胞保護効果を有するが、通常網膜において視細胞自身は BDNF 受容体である TrkB を発現していない。また、傷害を受けた視細胞でも TrkB 発現は起こらないことを第2章で示した[112]。さらには、視細胞変性過程でミュラー細胞における TrkB 発現局在が変化すること、またその変化が傷害部位である視細胞周辺で起こったことから、ミュラー細胞が BDNF のもたらす視細胞変性の抑制に重要な役割を担っていると考えられた[112]。すなわち、BDNF を受容したミュラー細胞が視細胞保護効果を持った何らかの因子を放出する可能性が考えられた。

しかしながら、ミュラー細胞単体での解析は、培養ミュラー細胞では生体内とは異なる性質を示すことなどから、解析には不向きと考えられた。そのため、我々は BDNF 刺激で網膜から放出される視細胞保護タンパク質の解析を計画し、新規網膜器官培養系を確立した。次に、本章では新規網膜器官培養系を用い、BDNF 刺激で培地中に放出されるタンパク質の同定を試みた。

2. 実験材料および実験方法

2-1 成熟網膜の透析膜系器官培養

透析膜の前処理および透析膜系器官培養は第2章 2-2 および 2-3 と同様に行った。培養条件には、培地は 10g/L グルコースを含む Eagle's MEM、酸素濃度 50%、培養

温度 37℃で行った。BDNF 投与群には終濃度 10ng/ml の rhBDNF (Alomone Labs Ltd.) を透析膜バッグに投与した。

2-2 培養上清の回収

48 時間の器官培養後の培養バッグより培養上清を回収した。回収した上清を 1,500 ×g で 5 分間の遠心分離を行い、細胞片を除いた。上清を 20,000 ×g で 20 分間の遠心分離にかけ、上清を回収した。さらに 100,000 ×g で 1 時間の超遠心を行い、上清を回収した。上清を DPBS 中で透析した。透析した上清を限外濾過 (filter YM10, MILLIPORE) で濃縮した。濃縮後、Lowry 法でタンパク質定量を行い、タンパク質濃度を決定した。この方法で得た培養上清を試料として解析に用いた。

2-3 網膜の細胞膜タンパク質 (Plasma membrane : PM) の回収とアフィニティーカラム作製

細胞膜タンパク質の回収は Ray らの方法を参考に行った [139]。以下の手順は 4℃で行った。ブタ眼球 30 個から前眼部を除去しアイカップより剥がした網膜に homogenate buffer (0.25M sucrose in 5mM HEPES, pH7.0) を加えた。浮遊している RPE や色素顆粒を取り除き、網膜 1 枚あたり 1ml の homogenate buffer 中で、ガラス-テフロンホモジナイザーにより組織を破碎した。homogenate の上清を 1,500 ×g, 5 分間の遠心分離を行い、核を除いた。その上清を 4,500 ×g, 10 分間の遠心を行い、ミトコンドリアを除いた。その上清を 20,000 ×g, 20 分間で遠心を行い、リソソームを除いた。再び上清を 20,000 ×g, 20 分間の遠心を行い、残存したリソソームを除いた。さらに上清を 100,000 ×g, 1 時間の超遠心を行った。沈殿に 3ml の homogenate buffer を加えて沈殿を再懸濁させた。10 倍量の Hypotonic buffer (50mM mannitol in 5mM HEPES, pH7.0) を加え攪拌し、ホモジナイザーで組織を粉碎した。homogenate に 1/100 量の 1M CaCl₂ を加えて 10 分間、4℃で攪拌した。homogenate を 2,500

×g, 15 分間の遠心を行った。回収した上清を再び遠心した(2,500×g, 15 分間, 4℃)。さらに上清を 40,000×g, 30 分間の超遠心を行った。沈殿(PM 画分)に 1ml の coupling buffer(0.2M NaHCO₃, 0.5M NaCl, pH8.4 in 3% Emulphogene BC-720)を加え攪拌後、氷中で 30 分間静置しタンパク質を可溶化させた。30 分後、15,000rpm, 20 分間の遠心を行い、上清を affinity column の結合リガンドとして用いた。上記の PM 画分と HiTrap™ Affinity columns HiTrap NHS-activated, 1ml(Pharmacia, Sweden) を用いアフィニティーカラムを作製した。手順はキットの説明書通りに行った。ただし、各 Buffer に 3% Emulphogen を添加させたものを使用した。

2-4 視細胞外節(photoreceptor outer segment : POS)の分離とアフィニティーカラム作製

POS の採取は Papermaster らによる方法を参考にして施行した[140]。30 眼のブタの眼球より、網膜を摘出し、50ml の Buffer A (1.23M sucrose , 65mM NaCl, 2mM MgCl₂, 5mM Tris-acetate buffer pH7.4)で懸濁した。網膜をガラス-テフロンホモジナイザーで破碎し、POS を分離するために 1,000×g で 5 分遠心分離した。上清を回収し、沈殿に Buffer A を 80ml 添加して懸濁し、再度ホモジネートを施行後 1,000×g で 5 分遠心分離した。再び上清回収し、回収量の 2 倍量の 10mM Tris-acetate buffer(pH7.4)を添加し、懸濁した。25,000×g で 20 分遠心分離を行い、上清を捨てた。沈殿に buffer A 40ml と 10mM Tris-acetate buffer(pH7.4) 80ml を添加して懸濁し、25,000× g で 20 分遠心分離を行った後、上清を捨て、沈殿に 40ml の Buffer B (0.77M sucrose , 1mM MgCl₂, 10mM Tris-acetate buffer pH7.4)を添加し、ホモジネートした。これを 26 ゲージ針付きシリンジに移して、針を通すことによりさらに外節の断片を粉碎した。これに Buffer B を加えて 45ml にし、外節溶液とした。遠心管に 1.14M、1.00M、0.84M の sucrose(1mM MgCl₂, 10mM Tris-acetate buffer pH7.4 を含む)を 15ml ずつ移して濃度勾配のある層を形成し、その上に外節溶液を注

ぎ、 $100,000\times g$ で 45 分の遠心分離を施行した。 $0.84M$ と $1.00M$ の間に存在する物質の層をピペットエイドで吸引し(分離された外節)、2 倍量の $10mM$ PBS で懸濁した。 $20,000\times g$ で 20 分遠心分離し、採取された POS を $-20^{\circ}C$ で保存した。

回収した POS を affinity column の結合リガンドとして用い、HiTrap™ Affinity columns HiTrap NHS-activated, $1ml$ (Pharmacia, Sweden) でアフィニティーカラムを作製した。手順はキットの説明書通りに行った。ただし、各 Buffer に 3% Emulphogen を添加させたものを使用した。

2-5 アフィニティーカラムによるタンパク質の分画分け

PM もしくは POS アフィニティーカラムに $10ml$ の DPBS を流してカラムを平衡化した(流速は $0.5ml/min$)。培養上清タンパク質 $500\mu g$ をペリスタポンプで吸ってカラムに流し、吸着させるために 1 時間静置させた。その後、DPBS をカラムに流し、カラムに吸着しない unbound なタンパク質を溶出させて回収した(unbound 分画)。各 $3ml$ の elution buffer ($0.5M$ NaCl in DPBS, $4M$ $MgCl_2$ in DPBS および $0.2M$ Gly-HCl buffer, $pH2.5$) で結合タンパク質を溶出し、フラクションコレクターで 5 ドロップ(約 $250\mu l$) ずつ分取した。その後、 $280nm$ を測定してピークがある試験管を集めて各分画とした。各分画は PBS で透析を行い、SDS-PAGE に用いた。

2-5 SDS-PAGE と銀染色

各アフィニティーカラムで溶出した培養上清タンパク質をそれぞれ限外濾過(filter YM10, MILLIPORE)で濃縮した。濃縮後の各分画は、 $280nm$ の吸光度でタンパク質濃度を測定した。 A_{280nm} が 1.0 を示すときのタンパク質濃度を $1mg/ml$ とした。SDS-PAGE へ用いるタンパク質量は、unbound 分画は $2\mu g$ 、 $0.5M$ NaCl 分画は $5\mu g$ 、 $4M$ $MgCl_2$ 分画は $5\mu g$ 、Gly-HCl 分画は $3\mu g$ になるようにした。15%アクリルアミドゲルを使用し、分子量マーカーには Precision Plus Protein Standards Dual Color

(BIO-RAD)を用いて電気泳動を行なった。泳動終了後、silver strain MS kit (Wako, Osaka)で染色しバンドを検出した。手順はキットの説明書通りに行った。

2-6 二次元電気泳動

培養上清 100 μ g タンパク質分に、等量の 40% TCA 溶液を加え、氷上で 30 分間静置した。その後、15,000 \times g で 15 分間の遠心分離を行い、上清を捨てた。沈殿したタンパク質に冷エタノール 1ml を加え、15,000 \times g で 5 分間の遠心分離を行い、上清を捨て余分な TCA を除去した。この操作を 2 回繰り返した。洗浄したタンパク質沈殿を軽く乾燥させ、125 μ l の二次元電気泳動用サンプルバッファー(7M 尿素、2% CHAPS、2M チオ尿素)に溶解した。その溶液に 2.5 μ l の IPG Buffer pH 3-10 (GE Healthcare UK Ltd.)および 1.5 μ l の 1M DTT 溶液を加え二次元電気泳動サンプルとした。

二次元電気泳動サンプルを空気が入らないようにストリップホルダーに入れ、7cm Immobiline Dry Strip Gel (pH 3-10, GE healthcare)をセットし、シリコーンオイル(信越化学工業株式会社, tokyo)を加えた。そのまま 20 $^{\circ}$ Cで一晩静置し、ゲルを膨潤させた。その後、20 $^{\circ}$ Cでトータル 6300Vh の泳動を行った。泳動後、Dry strip ゲルを蒸留水で洗浄後、平衡化バッファー(2% SDS、6M 尿素、30%グリセロール、0.002%ブロモフェノールブルー、50mM Tris-HCl buffer pH 6.8)に浸し、30 分間震盪させた。その後、Dry Strip ゲルを 12%アクリルアミドゲルにのせ、二次元目の SDS-PAGE を行った。SDS-PAGE のゲルは silver strain MS kit (Wako, Osaka)で染色しスポットを検出した。手順はキットの説明書通りに行った。

2-7 ゲル内トリプシン消化

銀染色したタンパク質バンドもしくは spot をゲルから切り出し、Hellman らの方法に若干の修正を加え、ゲル内トリプシン消化を行った[141]。タンパク質バンドを銀染

色ゲルから切り出し、細片化し、200 μ l の脱色液 (silver strain MS kit の脱色液 A と脱色液 B の等量混合溶液) を加える 15 分間振とうした。脱色液を取り除き、500 μ l のミリ Q 水で 3 回洗い、50%アセトニトリルを含む 25 mM 炭酸水素アンモニウム溶液を 200 μ l 加え、5 分間振とうした。上清を取り除き、100%アセトニトリルを 200 μ l 加え、5 分間静置した。上清を除き、ゲル片の入ったチューブを遠心式濃縮機 (Speed Vac) に約 50°C で 15 分間かけ真空乾燥させた。

200 μ l の還元溶液 (0.1 M 炭酸水素アンモニウム、10 mM ジチオスレイトール: DTT) を加え、ブロック型インキュベーター (Thermo Alumi Bath, Iwaki 社) を用い 56°C で 45 分間保温した。還元溶液を取り除き、200 μ l のアルキル化溶液 (0.1 M 炭酸水素アンモニウム、55 mM ヨードアセトアミド) を加え、遮光し 30 分間静置した。アルキル化溶液を取り除き 500 μ l のミリ Q 水で 2 回洗った後、50%アセトニトリルを含む 25 mM 炭酸水素アンモニウム溶液を 200 μ l 加え、10 分間振とうした。上清を除き 100%アセトニトリルを 200 μ l 加え、室温で 5 分間静置した。上清を除き 0.1 M 炭酸水素アンモニウム溶液を 200 μ l 加え、室温で 5 分間静置した。上清を除き、100%アセトニトリルを 200 μ l 加え、室温で 15 分間静置する。上清を除き、遠心式濃縮機に約 50°C で 30 分間かけ、ゲル片を真空乾燥させた。乾燥させたゲル片に 0.01 μ g/ml のトリプシン溶液 (Promega 社) をゲルが浸る程度加え染み込ませ、37°C に設定した恒温機で 20 時間インキュベートした。

ゲル内トリプシン消化されたペプチドを回収するため、50%アセトニトリルを含む 25 mM 炭酸水素アンモニウム溶液を 200 μ l 加え 15 分間振とうし、上清を回収した。さらに 50%アセトニトリルを含む 5%トリフルオロ酢酸溶液 200 μ l をゲル片の入ったチューブに加え、15 分間振とうし、上清を回収した。回収したペプチドが入ったチューブを遠心式濃縮機 (約 50°C) にかけて、濃縮乾燥させた。

2-8 ペプチド溶液における脱塩操作

ゲル片から回収したペプチドを、0.1%トリフルオロ酢酸 20 μ l で懸濁した。その試料から塩を除くため、ZipTip C18 (standard bed、Millipore 社) を用い脱塩操作を行った。P20 のマイクロピペットに ZipTip をつけ、50%アセトニトリルを吸い上げ、廃液用チューブに捨てた。この操作を 5 回繰り返した。75%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸を吸い上げ、廃液用チューブに捨てた。この操作を 5 回繰り返した。0.1%トリフルオロ酢酸を吸い上げ、廃液用のチューブに捨てた。この操作を 5 回繰り返した。試料をゆっくりと 30 回ピペッティングし、樹脂に添着させた。0.1%トリフルオロ酢酸を吸い上げ、廃液用のチューブに捨てた (5 回繰り返す)。500 μ l チューブに 75%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸を 10 μ l 加え、ペプチド試料を吸着させた ZipTip をそのチューブ内で 10 回ピペッティングし、樹脂から溶出させた。約 50°C で Speed Vac にかかけ、濃縮乾燥させる。0.1%ギ酸を 20 μ l ずつ加え懸濁した。各試料をオートサンプラーバイアルへ移し、キャップをはめた。バイアルを設置し、LC-MS/MS 解析を行った。

2-9 LC-MS/MS 解析

得られたペプチドは、日立液体クロマトグラフ質量分析計 (NanoFrontier LD; 日立ハイテクノロジー社) を使用し、LC-MS/MS 解析した。ゲル内トリプシン消化および脱塩操作を行ったペプチド溶液 (0.1%ギ酸に懸濁) を、C18 キャピラリーカラム (75 mm x 100 mm; GL Science 社) に添加した。キャピラリーカラムに吸着したペプチドは、流速を 200 nL/min に設定し、A 液 (2%アセトニトリル/0.1%ギ酸) および B 液 (98%アセトニトリル/0.1%ギ酸) を用いたリニアグラジエント法で溶出した。3-40%B 液を 42 分間、40%-100%B 液を 3 分間、100%B 液を 5 分間、順に流すことで、グラジエントを作成した。リニアグラジエントによりペプチドがキャピラリーカラムから溶出され、そのマスペクトロメトリーは、NanoFrontier LD マスペクトロ

メーターで行った。

2-10 タンパク質の同定

LC-MS/MS 解析で得られた MS/MS ピークリストから、PEAKS Studio (Infocom 社) を用いて NCBI データベースを基に *de novo* シーケンシングとデータベース解析を行った。

3. 結果

3-1 アフィニティーカラムによるタンパク質の選別

網膜器官培養から得た培養上清に含まれるタンパク質のうち、細胞膜に結合するものを選別するため、細胞膜タンパク質アフィニティーカラム (PM affinity column) を作成し、タンパク質の分画分けを行った (図 19A)。PM affinity column では 5 つのピークが検出され、それぞれ、unbound、0.5M NaCl、4M MgCl₂ および Gly-HCl 溶出 A または B 分画として回収し、SDS-PAGE に用いた。

また、POS に結合するタンパク質を選別するため、POS affinity column を作製し、同様にタンパク質分画分けを行った (図 19B)。POS affinity column では 3 つのピークが検出され、それぞれ unbound、0.5M NaCl および Gly-HCl 溶出分画として回収し、SDS-PAGE に用いた。

3-2 タンパク質ピークにおける検出 band の比較

PM affinity column で得たタンパク質の各ピークを SDS-PAGE にかけて、銀染色で band を検出した。得られた band パターンを、BDNF 投与と非投与で比較した (図 20)。ピーク 1、2 および 4 では band パターンに差はなかった。しかし、ピーク 3 では約 38kDa に BDNF 投与で増加する band が観察された (図 20, band ①)。また、ピーク 5 では 4 つの band で BDNF 投与で増加が見られ、それぞれの分子量は約 130, 58, 37

および 27kDa であった(図 20, band②-⑤)。

POS affinity column で得たタンパク質の各ピークも同様に band の比較を行った(図 21)。ピーク 1 では band パターンに差は見られなかった。ピーク 2 では BDNF 投与で増加している band が 4 つ観察された。それぞれの分子量は約 37、36、27 および 17kDa であった(図 21, band⑥-⑧)。そのうち、37 および 36kDa の band は一つにして MS 解析に用いた(band⑥)。またピーク 3 においても BDNF 投与で増加する band が観察された(図 21, 約 23kDa, band⑨)。これらの 9 つの band を切り出し、LC-MS/MS 解析を行い、タンパク質の同定を試みた。

3-3 二次元電気泳動 spot の比較

培養上清の解析のため、二次元電気泳動を行い、得られたタンパク質 spot を BDNF 投与と非投与で比較した(図 22)。得られた spot で pH4-7 間の 37kDa 以上の領域では多くのタンパク質が集中していたため、詳しい spot 解析は出来なかった。しかしながら、BDNF で増加した spot が 4 つ観察でき、それぞれを spot 1-4 とした。これら 4 つの spot を切り出し、LC-MS/MS 解析を行い、タンパク質の同定を試みた。

3-4 BDNF 投与で増加したタンパク質バンドおよび spot の LC-MS/MS 解析

BDNF 投与で増加の見られた band 9 つと spot 4 つのタンパク質の同定を試みた。用いた 9 つの band と 4 つの spot のうち 5 つは同定することが出来なかった(表 2)。しかしながら、他の band および spot からはタンパク質が同定された。同定されたタンパク質は GDP dissociation inhibitor1、Fructose-bisphosphate aldolase C、14-3-3 ファミリータンパク質(Beta, Sigma : stratifin および Zeta)、calbindin、SET (Phosphatase 2A inhibitor I2PP2A)、PHAPI2b protein、peroxiredoxin 1(Prx1)、recoverin、phosphoglycerate kinase 2 および non-metastatic cells 1, protein (NM23A) expressed in isoform b であった。

4. 考察

本研究において、新規網膜器官培養で得られた培養上清中のタンパク質のうち、BDNF 投与で出現もしくは増加したものの同定を試みた。解析した 13 種のタンパク質 band もしくは spot のうち、同定されたものは 8 つであった。一つの band から複数のタンパク質が同定される場合があったが、これは解析に用いた band 中にほぼ同じ分子量のタンパク質が複数存在していたためと考えられた。高いスコアで同定されたタンパク質は全部で 14 種であったが、これらを予想される主な機能で分類すると、エネルギー代謝に関与するもの(3 種)、シグナル伝達に関与するもの(7 種)、Ca²⁺結合タンパク質(2 種)および抗酸化作用タンパク質(1 種)であった。non-metastatic cells 1, protein (NM23A) expressed in isoform b に関しては詳しい解析が行われておらず、主な機能は推定できなかった。

これらの同定されたタンパク質のほとんどは細胞質に局在すると考えられているものであった。このことは本研究における培養上清解析が分泌タンパク質の解析に不向きであった可能性を示唆する。しかしながら、光受容体間マトリックス(interphotoreceptor matrix : IPM)と呼ばれる、視細胞の内節および外節の外周を取り巻いて占める部分に存在するタンパク質の網羅的解析においても、典型的には細胞質に存在すると考えられているタンパク質が同定されている[142]。実際、本研究で同定されたもののうち、GDP dissociation inhibitor1、Fructose-bisphosphate aldolase C、14-3-3 ファミリータンパク質(Beta および Zeta)、calbindin、recoverin および phosphoglycerate kinase 2 は IPM タンパク質の解析でも同定されている[142]。また、peroxiredoxin のアイソフォーム(2 および 5)も IPM で同定されている[142]。IPM は視細胞-RPE 間の代謝産物の輸送や交換を行う場であり、視細胞の機能と維持に必要とされるいくつかの重要な活動に深い関わりを持つとされている。例えば、網膜の接着、光受容体の整列、成長因子の提示、レチノイド輸送、貪食作用における光受容体外節の

認識などである[143-149]。実際、視細胞保護効果が示されている bFGF が IPM に局在することも示されている[146]。また、小胞体タンパク質と考えられていた 78 kDa glucose-regulated protein (GRP78) が IPM に局在していることが免疫組織化学法でも観察されている[142]。これらのことから、IPM には分泌タンパク質や細胞外骨格関連タンパク質以外にも、多種のタンパク質が存在することが示唆される。これらのことは本研究で同定された BDNF で増加したタンパク質も IPM に局在することで、視細胞維持に関与している可能性を示唆する。

同定されたタンパク質のうち、最も視細胞死抑制効果が期待されるものとして peroxiredoxin1 (Prx1) が挙げられる。Prx1 はチオレドキシシン系抗酸化タンパク質ファミリーの一つであり、活性酸素種 (ROS) の除去を担っている。細胞は酸素を利用してエネルギーを得ているため、常に ROS が産生されている。ROS はその高い反応性から、タンパク質、脂質および DNA などの酸化を引き起こし、細胞機能の傷害を誘導する。そのため、細胞は ROS に対する防御機構を備えているが、細胞内外で過剰に産生される ROS を十分に処理できない時、酸化ストレスが生じる。神経性疾患の発症や進展に ROS が関与しているとされており、特に神経細胞の酸化ストレスに対する脆弱性が指摘されてきている。網膜においても、加齢黄斑変性症や糖尿病網膜症などで、酸化ストレスが細胞傷害となることが示唆されている[150-153]。また、光照射は視細胞にとって重要な酸化ストレスであることが指摘されている[154,155]。実際、網膜で発現されているグルタチオンの減少で視細胞のアポトーシスが起ることが報告されている[156]。その網膜における酸化ストレスに対し、 α -トコフェロール[157]、ルテインやゼアキサンチン[158]およびドコサヘキサエン酸[159]などの抗酸化作用を有する物質が、細胞保護効果を示すことが近年報告されている。これらのことから、酸化ストレスに対する抵抗性を高めることは視細胞死の抑制に効果的であることが示唆される。また、BDNF が連続光照射による視細胞死を抑制するが、一方で、rd マウスなどの一部の遺伝性網膜変性動物における視細胞死には BDNF はほとんど効果を示さない

[61,160]。これらのことから、BDNF は酸化ストレスを軽減させる作用で視細胞を保護している可能性が考えられる。今回同定された Prx1 が BDNF 誘導性の視細胞保護に関与している可能性がある。Prx ファミリー分子は細胞質もしくはミトコンドリアに局在していると考えられていたが、Prx 2 および 5 は IPM で発見されていることから[142]、Prx1 も IPM に局在し、視細胞周辺の ROS を減少させることで、視細胞保護効果を発揮していることも考えられる。Prx1 の網膜における発現と局在は不明であるが、脳における発現が確認されている[161]。また、Prx1 が活性化したマイクログリアで発現され、過酸化水素による細胞死を抑制することが報告されている[162]。このことは網膜内の主要なグリア細胞であるミュラー細胞が BDNF で刺激され、Prx1 の発現上昇を起こす可能性を示唆する。

また、同定されたタンパク質で最も多かったのは 14-3-3 タンパク質ファミリーであった。14-3-3 タンパク質は真核細胞生物間で構造が良く保存されたタンパク質であり、特に脳中に高濃度の存在が知られている[163]。また、動物の 14-3-3 タンパク質には 9 つのアイソフォームが知られており、これらは、チロシン水酸化酵素およびトリプトファン水酸化酵素の活性化、プロテインキナーゼ C の阻害等に代表される神経系や細胞内の情報伝達に重要な生理的役割を担っている。さらには 14-3-3 タンパク質は数々のアポトーシス誘導因子と結合して不活性化することで細胞生存を促進している。14-3-3 タンパク質機能の抑制では細胞死が促進され、一方で 14-3-3-タンパク質の発現上昇は細胞死を抑制することが報告されている[164,165]。14-3-3 ファミリータンパク質も IPM で同定されている[142]。また、14-3-3sigma (別名 stratifin) は細胞から分泌されるとの報告もある[165,166]。これらのことから、本研究で BDNF によって発現上昇するタンパク質として同定された 14-3-3 ファミリータンパク質が視細胞死抑制に働いている可能性が示唆される。

さらにはエネルギー代謝に関する酵素群も同定された。これらの発現上昇が細胞にどのような機能を及ぼすかは不明であるが、エネルギー産生は細胞生存に重要であるので、

エネルギー産生の上昇を誘導している可能性がある。網膜は酸素要求性が高く、中でも視細胞は代謝が活発な細胞であると考えられている。これらのことから、エネルギー産生の上昇が視細胞自身を活性化させ、抵抗力を高めているのかもしれない。

また Ca^{2+} 結合タンパク質である calbindin や recoverin も同定された。これらのタンパク質の細胞生存への関与は不明であるが、いずれも網膜での発現が認められ、IPM でも同定されている[142,168-173]。recoverin は光受容物質であるロドプシンの活性調節に関与することが知られている。BDNF は視細胞死の抑制のみならず、その機能の維持にも効果がある。それゆえ、これらの Ca^{2+} 結合タンパク質は視細胞の機能維持に関与している可能性が考えられた。

本研究により、BDNF がもたらす視細胞維持に関与するタンパク質が推定された。これらのタンパク質が網膜内のどの細胞で発現が誘導されているか、また、その機能は不明な点が多いが、さらに解析を進めることで、BDNF のもたらす視細胞保護機構を解明することが可能である。