

第5章 総合考察

加齢黄斑変性症などの視細胞死を伴う難治性網膜疾患に対する効果的な治療法はなく、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、神経栄養因子群が神経細胞死を抑制するという機能から、治療応用への期待が寄せられている。中でも BDNF は様々な細胞死を抑制することが報告されている因子であり、既に、網膜においては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]。

BDNF がその効果を発揮するには、受容体である TrkB が必要である。しかしながら通常の視細胞は TrkB を発現しておらず、また、傷害を受けた視細胞でも TrkB の発現をすることがないことを本研究において明らかにした(第2章)[112]。これらのことから、BDNF のもたらす視細胞保護効果は、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ことを推測させる。実際に視細胞傷害時にミューラー細胞で TrkB 発現が変化することを発見した[112]。

しかし、これまでに BDNF が発現誘導する視細胞保護因子の解析は行われていない。そこで本研究において BDNF により網膜で発現が上昇するタンパク質の解析を行った。

解析を行うにあたり、TrkB 発現が行われている細胞の単層培養系を用いた実験では、増殖が行われるなど、通常の網膜で発揮されている機能とは著しく異なることが考えられたため、網膜の器官培養系を用いることを選択した。しかしながら、網膜器官培養法はほとんど確立されていない。特に培地中に放出されるタンパク質の解析のため、無血清培地を用いることとしたが、無血清培地での培養例はなく、新規の培養方法が求められた。そこで本研究では透析膜を利用した新規の器官培養系を確立した(第3章)。本器官培養系を用いることで、無血清培地においても 48 時間程度の網膜機能維持が可能に

なり、この系を用いることで、調査したい試薬の純粋な効果を観察するだけでなく、培養上清の解析が可能になった。この新規の器官培養系は網膜のみならず、様々な器官に応用が可能と考えられ、非常に有用な培養法である。

本器官培養系を用いた網膜器官培養から得られた培養上清中のタンパク質の解析を行った。BDNF で発現が増加したタンパク質のうち、同定されたのは全部で 14 種であった。これらの予想される主な機能は、代謝に関与するもの、シグナル伝達に関与するもの、 Ca^{2+} 結合タンパク質および抗酸化タンパク質であった。これらの中で、最も視細胞保護効果を発揮すると予想されるのは抗酸化タンパク質である。酸化ストレスで視細胞死が誘導されることが多く示唆されており、この抗酸化タンパク質の発現上昇は酸化ストレスを軽減させると考えられた。またアポトーシス関連タンパク質では 14-3-3 ファミリータンパク質が同定された。14-3-3 タンパク質の発現上昇がアポトーシスを抑制することが報告されており、視細胞に対してもその効果は発揮されているのかもしれない。その他、エネルギー代謝や Ca^{2+} 結合タンパク質も同定され、これらのタンパク質が視細胞保護効果を実際に有するかどうか、さらなる解析が求められる。

BDNF のもたらす視細胞保護機構の解明は、難治性網膜疾患に対する栄養因子を用いた治療法のみならず、新たな創薬開発に寄与するものと考えられる。またミューラー細胞が神経栄養因子のもたらす細胞保護に大きく関与していると考えられたため、ミューラー細胞の反応にも考慮したさらなる検討が必要であると考えられた。

引用文献

1. Brew H, Gray PT, Mobbs P, Attwell D. Endfeet of retinal glial cells have higher densities of ion channels that mediate K⁺ buffering. *Nature*. 1986 Dec 4-10;324(6096):466-8.
2. Karwoski CJ, Lu HK, Newman EA. Spatial buffering of light-evoked potassium increases by retinal Müller (glial) cells. *Science*. 1989 May 5;244(4904):578-80.
3. Newman EA. Voltage-dependent calcium and potassium channels in retinal glial cells. *Nature*. 1985 Oct 31-Nov 6;317(6040):809-11.
4. Newman EA. Inward-rectifying potassium channels in retinal glial (Müller) cells. *J Neurosci*. 1993 Aug;13(8):3333-45.
5. Newman EA. Distribution of potassium conductance in mammalian Müller (glial) cells: a comparative study. *J Neurosci*. 1987 Aug;7(8):2423-32.
6. Newman EA. Regulation of potassium levels by Müller cells in the vertebrate retina. *Can J Physiol Pharmacol*. 1987 May;65(5):1028-32.
7. Harada T, Harada C, Watanabe M, Inoue Y, Sakagawa T, Nakayama N, Sasaki S, Okuyama S, Watase K, Wada K, Tanaka K. Functions of the two glutamate transporters GLAST and GLT-1 in the retina. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Apr 14;95(8):4663-6.
8. Sarthy VP, Pignataro L, Pannicke T, Weick M, Reichenbach A, Harada T, Tanaka K, Marc R. Glutamate transport by retinal Müller cells in glutamate/aspartate transporter-knockout mice. *Glia*. 2005 Jan 15;49(2):184-96.
9. 原田高幸、原田知加子：網膜のグルタミン酸トランスポーター。神経眼科 1999(16) : 58-61.
10. Pow DV, Crook DK. Direct immunocytochemical evidence for the transfer of glutamine from glial cells to neurons: use of specific antibodies directed against the d-stereoisomers of glutamate and glutamine. *Neuroscience*. 1996 Jan;70(1):295-302.
11. Barnett NL, Pow DV. Antisense knockdown of GLAST, a glial glutamate transporter, compromises retinal function. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000 Feb;41(2):585-91.
12. Cubells JF, Walkley SU, Makman MH. The effects of gabaculine in vivo on the distribution of GABA-like immunoreactivity in the rat retina. *Brain Res*. 1988 Aug 16;458(1):82-90.
13. Neal MJ, Cunningham JR, Shah MA, Yazulla S. Immunocytochemical

evidence that vigabatrin in rats causes GABA accumulation in glial cells of the retina. *Neurosci Lett*. 1989 Mar 13;98(1):29-32.

- 1 4 . De Sampaio Schitine C, Kubrusly RC, De Melo Reis RA, Yamasaki EN, De Mello MC, De Mello FG. GABA uptake by purified avian Müller glia cells in culture. *Neurotox Res*. 2007 Sep;12(2):145-53.
- 1 5 . Biedermann B, Bringmann A, Reichenbach A. High-affinity GABA uptake in retinal glial (Müller) cells of the guinea pig: electrophysiological characterization, immunohistochemical localization, and modeling of efficiency. *Glia*. 2002 Sep;39(3):217-28.
- 1 6 . Zhao JW, Du JL, Li JS, Yang XL. Expression of GABA transporters on bullfrog retinal Müller cells. *Glia*. 2000 Aug;31(2):104-17.
- 1 7 . Young RW, Bok D. Participation of the retinal pigment epithelium in the rod outer segment renewal process. *J Cell Biol*. 1969 Aug;42(2):392-403.
- 1 8 . Bok D. The retinal pigment epithelium: a versatile partner in vision. *J Cell Sci Suppl*. 1993;17:189-95.
- 1 9 . Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev*. 2005 Jul;85(3):845-81.
- 2 0 . Thompson DA, Gal A. Vitamin A metabolism in the retinal pigment epithelium: genes, mutations, and diseases. *Prog Retin Eye Res*. 2003 Sep;22(5):683-703.
- 2 1 . Saari JC, Bredberg DL, Farrell DF. Retinol esterification in bovine retinal pigment epithelium: reversibility of lecithin:retinol acyltransferase. *Biochem J*. 1993 May 1;291 (Pt 3):697-700.
- 2 2 . Saari JC, Bredberg DL. Lecithin:retinol acyltransferase in retinal pigment epithelial microsomes. *J Biol Chem*. 1989 May 25;264(15):8636-40.
- 2 3 . Digner PS, Law WC, Cañada FJ, Rando RR. Membranes as the energy source in the endergonic transformation of vitamin A to 11-cis-retinol. *Science*. 1989 May 26;244(4907):968-71.
- 2 4 . Xu GZ, Li WW, Tso MO. Apoptosis in human retinal degenerations. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 1996;94:411-30; discussion 430-1.
- 2 5 . Curcio CA, Millican CL, Allen KA, Kalina RE. Aging of the human photoreceptor mosaic: evidence for selective vulnerability of rods in central retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1993 Nov;34(12):3278-96.
- 2 6 . Chang GQ, Hao Y, Wong F. Apoptosis: final common pathway of photoreceptor death in rd, rds, and rhodopsin mutant mice. *Neuron*. 1993 Oct;11(4):595-605.

- 2 7 . Shiono T, Hotta Y, Noro M, Sakuma T, Tamai M, Hayakawa M, Hashimoto T, Fujiki K, Kanai A, Nakajima A. Clinical features of Japanese family with autosomal dominant retinitis pigmentosa caused by point mutation in codon 347 of rhodopsin gene. *Jpn J Ophthalmol*. 1992;36(1):69-75.
- 2 8 . Nakazawa M, Wada Y, Chida Y, Tamai M. A correlation between computer-predicted changes in secondary structure and the phenotype of retinal degeneration associated with mutations in peripherin/RDS. *Curr Eye Res*. 1997 Nov;16(11):1134-41.
- 2 9 . Nakazawa M, Kikawa E, Chida Y, Wada Y, Shiono T, Tamai M. Autosomal dominant cone-rod dystrophy associated with mutations in codon 244 (Asn244His) and codon 184 (Tyr184Ser) of the peripherin/RDS gene. *Arch Ophthalmol*. 1996 Jan;114(1):72-8.
- 3 0 . Nakazawa M, Wada Y, Tamai M. Arrestin gene mutations in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol*. 1998 Apr;116(4):498-501.
- 3 1 . Sato M, Nakazawa M, Usui T, Tanimoto N, Abe H, Ohguro H. Mutations in the gene coding for guanylate cyclase-activating protein 2 (GUCA1B gene) in patients with autosomal dominant retinal dystrophies. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2005 Mar;243(3):235-42. Epub 2004 Sep 28.
- 3 2 . Samardzija M, Wenzel A, Naash M, Remé CE, Grimm C. Rpe65 as a modifier gene for inherited retinal degeneration. *Eur J Neurosci*. 2006 Feb;23(4):1028-34.
- 3 3 . Koenekoop RK. Abnormal retinal architecture in a 33-week-old fetus with LCA and a homozygous C330Y mutation in RPE65. *Ophthalmic Genet*. 2003 Jun;24(2):125-6.
- 3 4 . Morimura H, Fishman GA, Grover SA, Fulton AB, Berson EL, Dryja TP. Mutations in the RPE65 gene in patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa or leber congenital amaurosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Mar 17;95(6):3088-93.
- 3 5 . Noell WK, Walker VS, Kang BS, Berman S. Retinal damage by light in rats. *Invest Ophthalmol*. 1966 Oct;5(5):450-73.
- 3 6 . Organisciak DT, Xie A, Wang HM, Jiang YL, Darrow RM, Donoso LA. Adaptive changes in visual cell transduction protein levels: effect of light. *Exp Eye Res*. 1991 Dec;53(6):773-9.

- 3 7. Hafezi F, Marti A, Munz K, Reme CE. Light-induced apoptosis: differential timing in the retina and pigment epithelium. *Exp Eye Res.* 1997 Jun;64(6):963-70.
- 3 8. Li F, Cao W, Anderson RE. Alleviation of constant-light-induced photoreceptor degeneration by adaptation of adult albino rat to bright cyclic light. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003 Nov;44(11):4968-75.
- 3 9. Ikeda K, Tanihara H, Tatsuno T, Noguchi H, Nakayama C. Brain-derived neurotrophic factor shows a protective effect and improves recovery of the ERG b-wave response in light-damage. *J Neurochem.* 2003 Oct;87(2):290-6.
- 4 0. Langel N, Hafezi F, Marti A, Hegi M, Remé C, Niemeyer G. The mouse ERG before and after light damage is independent of p53. *Doc Ophthalmol.* 1998-1999;96(4):311-20.
- 4 1. Chen J, Flannery JG, LaVail MM, Steinberg RH, Xu J, Simon MI. bcl-2 overexpression reduces apoptotic photoreceptor cell death in three different retinal degenerations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Jul 9;93(14):7042-7.
- 4 2. Barde YA, Edgar D, Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.* 1982;1(5):549-53.
- 4 3. Merlio JP, Ernfors P, Kokaia Z, Middlemas DS, Bengzon J, Kokaia M, Smith ML, Siesjö BK, Hunter T, Lindvall O, Persson H. Increased production of the TrkB protein tyrosine kinase receptor after brain insults. *Neuron.* 1993 Feb;10(2):151-64.
- 4 4. Conner JM, Lauterborn JC, Yan Q, Gall CM, Varon S. Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport. *J Neurosci.* 1997 Apr 1;17(7):2295-313.
- 4 5. Yan Q, Rosenfeld RD, Matheson CR, Hawkins N, Lopez OT, Bennett L, Welcher AA. Expression of brain-derived neurotrophic factor protein in the adult rat central nervous system. *Neuroscience.* 1997 May;78(2):431-48.
- 4 6. Yan Q, Radeke MJ, Matheson CR, Talvenheimo J, Welcher AA, Feinstein SC. Immunocytochemical localization of TrkB in the central nervous system of the adult rat. *J Comp Neurol.* 1997 Feb 3;378(1):135-57. Erratum in: *J Comp Neurol* 1997 Jun 16;382(4):546-7.
- 4 7. Drake CT, Milner TA, Patterson SL. Ultrastructural localization of full-length trkB immunoreactivity in rat hippocampus suggests multiple roles

- in modulating activity-dependent synaptic plasticity. *J Neurosci*. 1999 Sep 15;19(18):8009-26.
- 4 8 . Acheson A, Conover JC, Fandl JP, DeChiara TM, Russell M, Thadani A, Squinto SP, Yancopoulos GD, Lindsay RM. A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death. *Nature*. 1995 Mar 30;374(6521):450-3.
 - 4 9 . Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci*. 2001;24:677-736.
 - 5 0 . Cabelli RJ, Hohn A, Shatz CJ. Inhibition of ocular dominance column formation by infusion of NT-4/5 or BDNF. *Science*. 1995 Mar 17;267(5204):1662-6.
 - 5 1 . Cabelli RJ, Shelton DL, Segal RA, Shatz CJ. Blockade of endogenous ligands of trkB inhibits formation of ocular dominance columns. *Neuron*. 1997 Jul;19(1):63-76.
 - 5 2 . McAllister AK, Katz LC, Lo DC. Opposing roles for endogenous BDNF and NT-3 in regulating cortical dendritic growth. *Neuron*. 1997 May;18(5):767-78.
 - 5 3 . McAllister AK, Lo DC, Katz LC. Neurotrophins regulate dendritic growth in developing visual cortex. *Neuron*. 1995 Oct;15(4):791-803.
 - 5 4 . Murphy DD, Cole NB, Segal M. Brain-derived neurotrophic factor mediates estradiol-induced dendritic spine formation in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Sep 15;95(19):11412-7.
 - 5 5 . Horch HW, Katz LC. BDNF release from single cells elicits local dendritic growth in nearby neurons. *Nat Neurosci*. 2002 Nov;5(11):1177-84.
 - 5 6 . Tolwani RJ, Buckmaster PS, Varma S, Cosgaya JM, Wu Y, Suri C, Shooter EM. BDNF overexpression increases dendrite complexity in hippocampal dentate gyrus. *Neuroscience*. 2002;114(3):795-805.
 - 5 7 . Frade JM, Bovolenta P, Martínez-Morales JR, Arribas A, Barbas JA, Rodríguez-Tébar A. Control of early cell death by BDNF in the chick retina. *Development*. 1997 Sep;124(17):3313-20.
 - 5 8 . Rickman DW. Parvalbumin immunoreactivity is enhanced by brain-derived neurotrophic factor in organotypic cultures of rat retina. *J Neurobiol*. 1999 Nov 15;41(3):376-84.
 - 5 9 . Cellerino A, Pinzón-Duarte G, Carroll P, Kohler K. Brain-derived neurotrophic factor modulates the development of the dopaminergic network in the rodent retina. *J Neurosci*. 1998 May 1;18(9):3351-62.

- 6 0 . LaVail MM, Unoki K, Yasumura D, Matthes MT, Yancopoulos GD, Steinberg RH. Multiple growth factors, cytokines and neurotrophins rescue photoreceptors from the damaging effects of constant light. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:11249-11253.
- 6 1 . LaVail MM, Yasumura D, Matthes MT, Lau-Villacorta C, Unoki K, Sung CH, Steinberg RH. Protection of mouse photoreceptors by survival factors in retinal degenerations. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998;39:592-602.
- 6 2 . Steinberg RH. Survival factors in retinal degenerations. *Curr Opin Neurobiol*. 1994 Aug;4(4):515-24.
- 6 3 . Lambiase A, Aloe L. Nerve growth factor delays retinal degeneration in C3H mice. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1996 Aug;234 Suppl 1:S96-100.
- 6 4 . Reh TA, McCabe K, Kelley MW, Bermingham-McDonogh O. Growth factors in the treatment of degenerative retinal disorders. *Ciba Found Symp*. 1996;196:120-34.
- 6 5 . Unoki K, LaVail MM. Protection of the rat retina from ischemic injury by brain derived neurotrophic factor, ciliary neurotrophic factor, and basic fibroblast growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1994;35:907-915.
- 6 6 . Nakazawa T, Shimura M, Endo S, Takahashi H, Mori N, Tamai M. N-Methyl-D-Aspartic acid suppresses Akt activity through protein phosphatase in retinal ganglion cells. *Mol Vis*. 2005 Dec 27;11:1173-82.
- 6 7 . Kido N, Tanihara H, Honjo M, Inatani M, Tatsuno T, Nakayama C, Honda Y. Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in eyes with NMDA-induced neuronal death. *Brain Res*. 2000 Nov 24;884(1-2):59-67.
- 6 8 . Rocha M, Martins RA, Linden R. Activation of NMDA receptors protects against glutamate neurotoxicity in the retina: evidence for the involvement of neurotrophins. *Brain Res*. 1999 May 8;827(1-2):79-92.
- 6 9 . Mey J, Thanos S. Intravitreal injections of neurotrophic factors support the survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats in vivo. *Brain Res*. 1993 Feb 5;602(2):304-17.
- 7 0 . Mansour-Robaey S, Clarke DB, Wang YC, Bray GM, Aguayo AJ. Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Mar 1;91(5):1632-6.

- 7 1 . Weibel D, Kreutzberg GW, Schwab ME. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) prevents lesion-induced axonal die-back in young rat optic nerve. *Brain Res.* 1995;679:249-254.
- 7 2 . Peinado-Ramon P, Salvador M, Villegas Perez MP, Vidal Sanz M. Effects of axotomy and intraocular administration of NT-4, NT-3, and brain-derived neurotrophic factor on the survival of adult rat retinal ganglion cells: a quantitative in vivo study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996;37:489-500.
- 7 3 . Sawai H, Clarke DB, Kittlerova P, Bray GM, Aguayo AJ. Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-4/5 stimulate growth of axonal branches from regenerating retinal ganglion cells. *J Neurosci.* 1996;16:3887-3894.
- 7 4 . Klocker N, Cellerino A, Ba " hr M. Free radical scavenging and inhibition of nitric oxide synthase potentiates the neurotrophic effects of brain-derived neurotrophic factor on axotomized retinal ganglion cells in vivo. *J Neurosci.* 1998;18:1038-1046.
- 7 5 . Zhang CW, Lu Q, You SW, Zhi Y, Yip HK, Wu W, So KF, Cui Q. CNTF and BDNF have similar effects on retinal ganglion cell survival but differential effects on nitric oxide synthase expression soon after optic nerve injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005 Apr;46(4):1497-503.
- 7 6 . Nakazawa T, Tamai M, Mori N. Brain-derived neurotrophic factor prevents axotomized retinal ganglion cell death through MAPK and PI3K signaling pathways. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002 Oct;43(10):3319-26.
- 7 7 . Schuettauf F, Vorwerk C, Naskar R, Orlin A, Quinto K, Zurakowski D, Dejneka NS, Klein RL, Meyer EM, Bennett J. Adeno-associated viruses containing bFGF or BDNF are neuroprotective against excitotoxicity. *Curr Eye Res.* 2004 Dec;29(6):379-86.
- 7 8 . Hojo M, Abe T, Sugano E, Yoshioka Y, Saigo Y, Tomita H, Wakusawa R, Tamai M. Photoreceptor protection by iris pigment epithelial transplantation transduced with AAV-mediated brain-derived neurotrophic factor gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004 Oct;45(10):3721-6.
- 7 9 . Martin KR, Quigley HA, Zack DJ, Levkovitch-Verbin H, Kielczewski J, Valenta D, Baumrind L, Pease ME, Klein RL, Hauswirth WW. Gene therapy with brain-derived neurotrophic factor as a protection: retinal ganglion cells in a rat glaucoma model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003 Oct;44(10):4357-65.

- 8 0. Abe T, Wakusawa R, Seto H, Asai N, Saito T, Nishida K. Topical doxycycline can induce expression of BDNF in transduced retinal pigment epithelial cells transplanted into the subretinal space. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008 Aug;49(8):3631-9.
- 8 1. Abe T, Saigo Y, Hojo M, Kano T, Wakusawa R, Tokita Y, Tamai M. Protection of photoreceptor cells from phototoxicity by transplanted retinal pigment epithelial cells expressing different neurotrophic factors. *Cell Transplant.* 2005;14(10):799-808.
- 8 2. Kano T, Abe T, Tomita H, Sakata T, Ishiguro S, Tamai M. Protective effect against ischemia and light damage of iris pigment epithelial cells transfected with the BDNF gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002 Dec;43(12):3744-53.
- 8 3. Gauthier R, Joly S, Pernet V, Lachapelle P, Di Polo A. Brain-derived neurotrophic factor gene delivery to muller glia preserves structure and function of light-damaged photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005 Sep;46(9):3383-92.
- 8 4. Saigo Y, Abe T, Hojo M, Tomita H, Sugano E, Tamai M. Transplantation of transduced retinal pigment epithelium in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004 Jun;45(6):1996-2004.
- 8 5. Dechant G, Rodríguez-Tébar A, Barde YA. Neurotrophin receptors. *Prog Neurobiol.* 1994 Feb;42(2):347-52.
- 8 6. Frade JM, Rodríguez-Tébar A, Barde YA. Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor. *Nature.* 1996 Sep 12;383(6596):166-8.
- 8 7. Middlemas DS, Lindberg RA, Hunter T. trkB, a neural receptor protein-tyrosine kinase: evidence for a full-length and two truncated receptors. *Mol Cell Biol.* 1991 Jan;11(1):143-53.
- 8 8. Ohira K, Hayashi M. Expression of TrkB subtypes in the adult monkey cerebellar cortex. *J Chem Neuroanat.* 2003 Mar;25(3):175-83.]
- 8 9. Jaboin J, Kim CJ, Kaplan DR, Thiele CJ. Brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB protects neuroblastoma cells from chemotherapy-induced apoptosis via phosphatidylinositol 3'-kinase pathway. *Cancer Res.* 2002 Nov 15;62(22):6756-63.
- 9 0. Widmer HR, Kaplan DR, Rabin SJ, Beck KD, Hefti F, Knüsel B. Rapid phosphorylation of phospholipase C gamma 1 by brain-derived neurotrophic

- factor and neurotrophin-3 in cultures of embryonic rat cortical neurons. *J Neurochem.* 1993 Jun;60(6):2111-23.
- 9 1 . Atwal JK, Massie B, Miller FD, Kaplan DR. The TrkB-Shc site signals neuronal survival and local axon growth via MEK and P13-kinase. *Neuron.* 2000 Aug;27(2):265-77.
 - 9 2 . Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2006 Sep 29;361(1473):1545-64.
 - 9 3 . Rose CR, Blum R, Pichler B, Lepier A, Kafitz KW, Konnerth A. Truncated TrkB-T1 mediates neurotrophin-evoked calcium signalling in glia cells. *Nature.* 2003 Nov 6;426(6962):74-8.
 - 9 4 . Cheng A, Coksaygan T, Tang H, Khatri R, Balice-Gordon RJ, Rao MS, Mattson MP. Truncated tyrosine kinase B brain-derived neurotrophic factor receptor directs cortical neural stem cells to a glial cell fate by a novel signaling mechanism. *J Neurochem.* 2007 Mar;100(6):1515-30. Epub 2006 Dec 22.
 - 9 5 . Baxter GT, Radeke MJ, Kuo RC, Makrides V, Hinkle B, Hoang R, Medina-Selby A, Coit D, Valenzuela P, Feinstein SC. Signal transduction mediated by the truncated trkB receptor isoforms, trkB.T1 and trkB.T2. *J Neurosci.* 1997 Apr 15;17(8):2683-90.
 - 9 6 . Ohira K, Homma KJ, Hirai H, Nakamura S, Hayashi M. TrkB-T1 regulates the RhoA signaling and actin cytoskeleton in glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Apr 14;342(3):867-74. Epub 2006 Feb 20.
 - 9 7 . Ohira K, Kumanogoh H, Sahara Y, Homma KJ, Hirai H, Nakamura S, Hayashi M. A truncated tropomyosin-related kinase B receptor, T1, regulates glial cell morphology via Rho GDP dissociation inhibitor 1. *J Neurosci.* 2005 Feb 9;25(6):1343-53.
 - 9 8 . Perez MT, Caminos E. Expression of brain-derived neurotrophic factor and of its functional receptor in neonatal and adult rat retina. *Neurosci Lett.* 1995 Jan 2;183(1-2):96-9.
 - 9 9 . Koide T, Takahashi JB, Hoshimaru M, Kojima M, Otsuka T, Asahi M, Kikuchi H. Localization of trkB and low-affinity nerve growth factor receptor mRNA in the developing rat retina. *Neurosci Lett.* 1995 Feb 13;185(3):183-6.
 - 1 0 0 . Suzuki A, Nomura S, Morii E, Fukuda Y, Kosaka J. Localization of mRNAs for trkB isoforms and p75 in rat retinal ganglion cells. *J Neurosci*

- Res. 1998 Oct 1;54(1):27-37. Erratum in: J Neurosci Res 1999 Jan 1;55(1):135.
- 1 0 1. Carwile ME, Culbert RB, Sturdivant RL, Kraft TW. Rod outer segment maintenance is enhanced in the presence of bFGF, CNTF and GDNF. Exp Eye Res. 1998 Jun;66(6):791-805.
 - 1 0 2. Wahlin KJ, Campochiaro PA, Zack DJ, Adler R. Neurotrophic factors cause activation of intracellular signaling pathways in Müller cells and other cells of the inner retina, but not photoreceptors. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2000 Mar;41(3):927-36.
 - 1 0 3. Ikeda K, Tanihara H, Honda Y, Tatsuno T, Noguchi H, Nakayama C. BDNF attenuates retinal cell death caused by chemically induced hypoxia in rats. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1999 Aug;40(9):2130-40.
 - 1 0 4. Wen R, Cheng T, Song Y, Matthes MT, Yasumura D, LaVail MM, Steinberg RH. Continuous exposure to bright light upregulates bFGF and CNTF expression in the rat retina. Curr Eye Res. 1998 May;17(5):494-500.
 - 1 0 5. Wen R, Song Y, Cheng T, Matthes MT, Yasumura D, LaVail MM, Steinberg RH. Injury-induced upregulation of bFGF and CNTF mRNAs in the rat retina. J Neurosci. 1995 Nov;15(11):7377-85.
 - 1 0 6. Harada C, Harada T, Quah HM, Maekawa F, Yoshida K, Ohno S, Wada K, Parada LF, Tanaka K. Potential role of glial cell line-derived neurotrophic factor receptors in Muller glial cells during light-induced retinal degeneration. Neuroscience. 2003;122(1):229-35.
 - 1 0 7. Harada T, Harada C, Kohsaka S, Wada E, Yoshida K, Ohno S, Mamada H, Tanaka K, Parada LF, Wada K. Microglia-Müller glia cell interactions control neurotrophic factor production during light-induced retinal degeneration. J Neurosci. 2002;22:9228-9236.
 - 1 0 8. Neal M, Cunningham J, Lever I, Pezet S, Maccangio M. Mechanism by which brain-derived neurotrophic factor increases dopamine release from the rabbit retina. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003 Feb;44(2):791-8.
 - 1 0 9. Martins RA, Silveira MS, Curado MR, Police AI, Linden R. NMDA receptor activation modulates programmed cell death during early post-natal retinal development: a BDNF-dependent mechanism. J Neurochem. 2005 Oct;95(1):244-53.
 - 1 1 0. Vecino E, García-Grespo D, García M, Martínez-Millán L, Sharma SC, Carrascal E. Rat retinal ganglion cells co-express brain derived

- neurotrophic factor (BDNF) and its receptor TrkB. *Vision Res.* 2002 Jan;42(2):151-7.
- 1 1 1. Nork TM, Wallow IH, Sramek SJ, Stevens TS, De Venecia G. Immunocytochemical study of an eye with proliferative vitreoretinopathy and retinal tacks. *Retina.* 1990;10(1):78-85.
 - 1 1 2. Asai N, Abe T, Saito T, Sato H, Ishiguro S, Nishida K. Temporal and spatial differences in expression of TrkB isoforms in rat retina during constant light exposure. *Exp Eye Res.* 2007 Sep;85(3):346-55.
 - 1 1 3. Abrahan CE, Insua MF, Politi LE, German OL, Rotstein NP. Oxidative stress promotes proliferation and dedifferentiation of retina glial cells in vitro. *J Neurosci Res.* 2008 Oct 14.
 - 1 1 4. Nickerson PE, Da Silva N, Myers T, Stevens K, Clarke DB. Neural progenitor potential in cultured Müller glia: effects of passaging and exogenous growth factor exposure. *Brain Res.* 2008 Sep 16;1230:1-12. Epub 2008 Jul 8.
 - 1 1 5. Kubrusly RC, Panizzutti R, Gardino PF, Stutz B, Reis RA, Ventura AL, de Mello MC, de Mello FG. Expression of functional dopaminergic phenotype in purified cultured Müller cells from vertebrate retina. *Neurochem Int.* 2008 Sep;53(3-4):63-70. Epub 2008 Jun 5.
 - 1 1 6. Seki M, Tanaka T, Sakai Y, Fukuchi T, Abe H, Nawa H, Takei N. Müller Cells as a source of brain-derived neurotrophic factor in the retina: noradrenaline upregulates brain-derived neurotrophic factor levels in cultured rat Müller cells. *Neurochem Res.* 2005 Sep;30(9):1163-70.
 - 1 1 7. Yao J, Sun X, Wang Y, Wang L. Muller glia induce retinal progenitor cells to differentiate into retinal ganglion cells. *Neuroreport.* 2006 Aug 21;17(12):1263-7.
 - 1 1 8. Kubrusly RC, da Cunha MC, Reis RA, Soares H, Ventura AL, Kurtenbach E, de Mello MC, de Mello FG. Expression of functional receptors and transmitter enzymes in cultured Muller cells. *Brain Res.* 2005 Mar 21;1038(2):141-9.
 - 1 1 9. Gadea A, López E, López-Colomé AM. Glutamate-induced inhibition of D-aspartate uptake in Müller glia from the retina. *Neurochem Res.* 2004 Jan;29(1):295-304.
 - 1 2 0. Tamai M, O'Brien PJ. Retinal dystrophy in the RCS rat: in vivo and in vitro studies of phagocytic action of the pigment epithelium on the shed rod outer segments. *Exp Eye Res.* 1979 Apr;28(4):399-411.

- 1 2 1. Tamai M, Noji T. [The organ-cultured retina: Part 1. An in vitro study in the neonatal DD mouse (author's transl)] *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*. 1976 May 10;80(5):260-6.
- 1 2 2. Tamai M, Mizuno K. [The organ-cultured retina. Part II. Studies of inherited retinal dystrophic mouse (author's transl)] *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*. 1976 Aug 10;80(8):667-74.
- 1 2 3. Tamai M, Noji T. [The organ-cultured retina. Part III. Studies on exchange culture between neural retina and pigment epithelium of normal (DD) and inherited dystrophic (C3H) mice (author's transl)] *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*. 1976 Aug 10;80(8):621-6.
- 1 2 4. Pinzón-Duarte G, Arango-González B, Guenther E, Kohler K. Effects of brain-derived neurotrophic factor on cell survival, differentiation and patterning of neuronal connections and Müller glia cells in the developing retina. *Eur J Neurosci*. 2004 Mar;19(6):1475-84.
- 1 2 5. Johansson K, Ehinger B. Structural changes in the developing retina maintained in vitro. *Vision Res*. 2005 Nov;45(25-26):3235-43. Epub 2005 Jul 15.
- 1 2 6. Azadi S, Johnson LE, Paquet-Durand F, Perez MT, Zhang Y, Ekström PA, van Veen T. CNTF+BDNF treatment and neuroprotective pathways in the rd1 mouse retina. *Brain Res*. 2007 Jan 19;1129(1):116-29. Epub 2006 Dec 6.
- 1 2 7. Caffé AR, Söderpalm AK, Holmqvist I, van Veen T. A combination of CNTF and BDNF rescues rd photoreceptors but changes rod differentiation in the presence of RPE in retinal explants. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001 Jan;42(1):275-82.
- 1 2 8. Rohrer B, Ogilvie JM. Retarded outer segment development in TrkB knockout mouse retina organ culture. *Mol Vis*. 2003 Jan 24;9:18-23.
- 1 2 9. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:265-275.
- 1 3 0. Bensadoun A, Weinstein D. Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal Biochem*. 1976;70:241-250.
- 1 3 1. Meister A. Glutamine synthetase from mammalian tissues. *Methods Enzymol*. 1985;113:185-99.

- 1 3 2. Cook B, Lewis GP, Fisher SK, Adler R. Apoptotic photoreceptor degeneration in experimental retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1995 May;36(6):990-6.
- 1 3 3. Chang CJ, Lai WW, Edward DP, Tso MO. Apoptotic photoreceptor cell death after traumatic retinal detachment in humans. *Arch Ophthalmol*. 1995 Jul;113(7):880-6.
- 1 3 4. Xu GZ, Li WW, Tso MO. Apoptosis in human retinal degenerations. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 1996;94:411-30; discussion 430-1.
- 1 3 5. Riepe RE, Norenburg MD. Müller cell localisation of glutamine synthetase in rat retina. *Nature*. 1977 Aug 18;268(5621):654-5.
- 1 3 6. Norenberg MD, Dutt K, Reif-Lehrer L. Glutamine synthetase localization in cortisol-induced chick embryo retinas. *J Cell Biol*. 1980 Mar;84(3):803-7.
- 1 3 7. Colley NJ, Clark VM, Hall MO. Surface modification of retinal pigment epithelial cells: effects on phagocytosis and glycoprotein composition. *Exp Eye Res*. 1987 Mar;44(3):377-92.
- 1 3 8. Engelsberg K, Ehinger B, Wassélius J, Johansson K. Apoptotic cell death and microglial cell responses in cultured rat retina. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2004 Mar;242(3):229-39.
- 1 3 9. Ray TK. A modified method for the isolation of the plasma membrane from rat liver. *Biochim Biophys Acta*. 1970 Jan 6;196(1):1-9.
- 1 4 0. Papermaster DS, Dreyer WJ. Rhodopsin content in the outer segment membranes of bovine and frog retinal rods. *Biochemistry*. 1974 May 21;13(11):2438-44.
- 1 4 1. U. Hellman, C. Wernstedt, J. Gonez and C.H. Heldin, Improvement of an "In-gel" digestion procedure for the micropreparation of internal protein fragments for amino acid sequencing, *Anal Biochem* 224 (1995) 451-5.
- 1 4 2. Hauck SM, Schoeffmann S, Deeg CA, Gloeckner CJ, Swiatek-de Lange M, Ueffing M. Proteomic analysis of the porcine interphotoreceptor matrix. *Proteomics*. 2005 Sep;5(14):3623-36.
- 1 4 3. Feeney L. The interphotoreceptor space. II. Histochemistry of the matrix. *Dev Biol*. 1973 May;32(1):115-28.
- 1 4 4. Feeney L. The interphotoreceptor space. I. Postnatal ontogeny in mice and rats. *Dev Biol*. 1973 May;32(1):101-14.

- 1 4 5. Hollyfield JG, Varner HH, Rayborn ME, Osterfeld AM. Retinal attachment to the pigment epithelium. Linkage through an extracellular sheath surrounding cone photoreceptors. *Retina*. 1989;9(1):59-68.
- 1 4 6. Hageman GS, Kirchoff-Rempe MA, Lewis GP, Fisher SK, Anderson DH. Sequestration of basic fibroblast growth factor in the primate retinal interphotoreceptor matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Aug 1;88(15):6706-10.
- 1 4 7. Lazarus HS, Hageman GS. Xyloside-induced disruption of interphotoreceptor matrix proteoglycans results in retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1992 Feb;33(2):364-76.
- 1 4 8. Chaitin MH, Wortham HS, Brun-Zinkernagel AM. Immunocytochemical localization of CD44 in the mouse retina. *Exp Eye Res*. 1994 Mar;58(3):359-65.
- 1 4 9. Yao XY, Hageman GS, Marmor MF. Retinal adhesiveness is weakened by enzymatic modification of the interphotoreceptor matrix in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1990 Oct;31(10):2051-8.
- 1 5 0. Winkler BS, Boulton ME, Gottsch JD, Sternberg P. Oxidative damage and age-related macular degeneration. *Mol Vis*. 1999 Nov 3;5:32.
- 1 5 1. Beatty S, Koh H, Phil M, Henson D, Boulton M. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol*. 2000 Sep-Oct;45(2):115-34.
- 1 5 2. Madsen-Bouterse SA, Kowluru RA. Oxidative stress and diabetic retinopathy: Pathophysiological mechanisms and treatment perspectives. *Rev Endocr Metab Disord*. 2008 Dec;9(4):315-27.
- 1 5 3. Kowluru RA, Chan PS. Oxidative stress and diabetic retinopathy. *Exp Diabetes Res*. 2007;2007:43603.
- 1 5 4. Organisciak DT, Jiang YL, Wang HM, Bicknell I. The protective effect of ascorbic acid in retinal light damage of rats exposed to intermittent light. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1990 Jul;31(7):1195-202.
- 1 5 5. Demontis GC, Longoni B, Marchiafava PL. Molecular steps involved in light-induced oxidative damage to retinal rods. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002 Jul;43(7):2421-7.
- 1 5 6. Roh YJ, Moon C, Kim SY, Park MH, Bae YC, Chun MH, Moon JI. Glutathione depletion induces differential apoptosis in cells of mouse retina, in vivo. *Neurosci Lett*. 2007 May 7;417(3):266-70.

- 1 5 7. Zapata GL, Guajardo MH, Terrasa AM. The in vitro protective effect of alpha-tocopherol on oxidative injury in the dog retina. *Vet J*. 2008 Aug;177(2):266-72.
- 1 5 8. Chucair AJ, Rotstein NP, Sangiovanni JP, During A, Chew EY, Politi LE. Lutein and zeaxanthin protect photoreceptors from apoptosis induced by oxidative stress: relation with docosahexaenoic acid. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007 Nov;48(11):5168-77.
- 1 5 9. Rotstein NP, Politi LE, German OL, Girotti R. Protective effect of docosahexaenoic acid on oxidative stress-induced apoptosis of retina photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003 May;44(5):2252-9.
- 1 6 0. Ogilvie JM, Speck JD, Lett JM. Growth factors in combination, but not individually, rescue rd mouse photoreceptors in organ culture. *Exp Neurol*. 2000 Feb;161(2):676-85.
- 1 6 1. Mizusawa H, Ishii T, Bannai S. Peroxiredoxin I (macrophage 23 kDa stress protein) is highly and widely expressed in the rat nervous system. *Neurosci Lett*. 2000 Mar 31;283(1):57-60.
- 1 6 2. Kim SU, Hwang CN, Sun HN, Jin MH, Han YH, Lee H, Kim JM, Kim SK, Yu DY, Lee DS, Lee SH. Peroxiredoxin I is an indicator of microglia activation and protects against hydrogen peroxide-mediated microglial death. *Biol Pharm Bull*. 2008 May;31(5):820-5.
- 1 6 3. Boston PF, Jackson P, Thompson RJ. Human 14-3-3 protein: radioimmunoassay, tissue distribution, and cerebrospinal fluid levels in patients with neurological disorders. *J Neurochem*. 1982 May;38(5):1475-82.
- 1 6 4. Sunayama J, Tsuruta F, Masuyama N, Gotoh Y. JNK antagonizes Akt-mediated survival signals by phosphorylating 14-3-3. *J Cell Biol*. 2005 Jul 18;170(2):295-304. Epub 2005 Jul 11.
- 1 6 5. Yoshida K, Yamaguchi T, Natsume T, Kufe D, Miki Y. JNK phosphorylation of 14-3-3 proteins regulates nuclear targeting of c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *Nat Cell Biol*. 2005 Mar;7(3):278-85.
- 1 6 6. Zanello SB, Nayak R, Zanello LP, Farthing-Nayak P. Identification and distribution of 14.3.3sigma (stratifyin) in the human cornea. *Curr Eye Res*. 2006 Oct;31(10):825-33.
- 1 6 7. Ghaffari A, Li Y, Karami A, Ghaffari M, Tredget EE, Ghahary A. Fibroblast extracellular matrix gene expression in response to

- keratinocyte-releasable stratifin. *J Cell Biochem.* 2006 May 15;98(2):383-93.
- 1 6 8. Hendrickson A, Yan YH, Erickson A, Possin D, Pow D. Expression patterns of calretinin, calbindin and parvalbumin and their colocalization in neurons during development of Macaca monkey retina. *Exp Eye Res.* 2007 Nov;85(5):587-601. Epub 2007 Jul 25.
- 1 6 9. Villar-Cheda B, Abalo XM, Anadón R, Rodicio MC. Calbindin and calretinin immunoreactivity in the retina of adult and larval sea lamprey. *Brain Res.* 2006 Jan 12;1068(1):118-30. Epub 2005 Dec 20.
- 1 7 0. Loeliger M, Rees S. Immunocytochemical development of the guinea pig retina. *Exp Eye Res.* 2005 Jan;80(1):9-21.
- 1 7 1. Dizhoor AM, Ray S, Kumar S, Niemi G, Spencer M, Brolley D, Walsh KA, Philipov PP, Hurley JB, Stryer L. Recoverin: a calcium sensitive activator of retinal rod guanylate cyclase. *science.* 1991 Feb 22;251(4996):915-8.
- 1 7 2. Lambrecht HG, Koch KW. Phosphorylation of recoverin, the calcium-sensitive activator of photoreceptor guanylyl cyclase. *FEBS Lett.* 1991 Dec 9;294(3):207-9.
- 1 7 3. Murakami A, Yajima T, Inana G. Isolation of human retinal genes: recoverin cDNA and gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992 Aug 31;187(1):234-44.

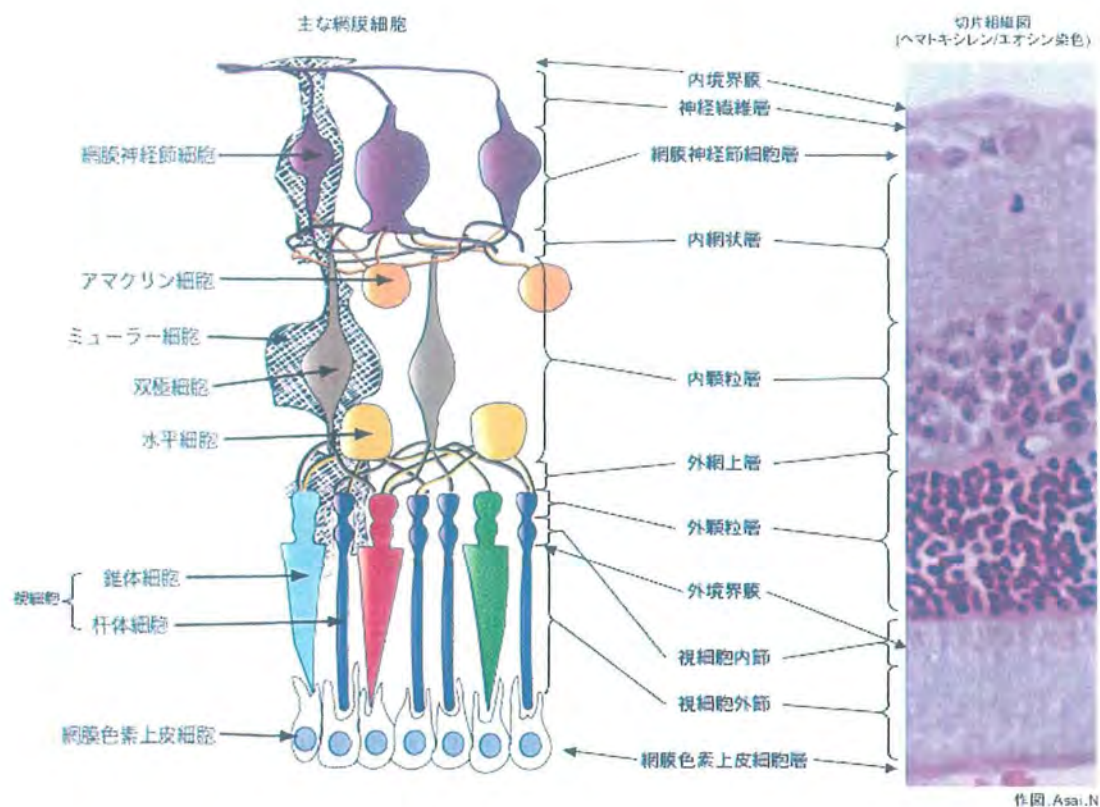
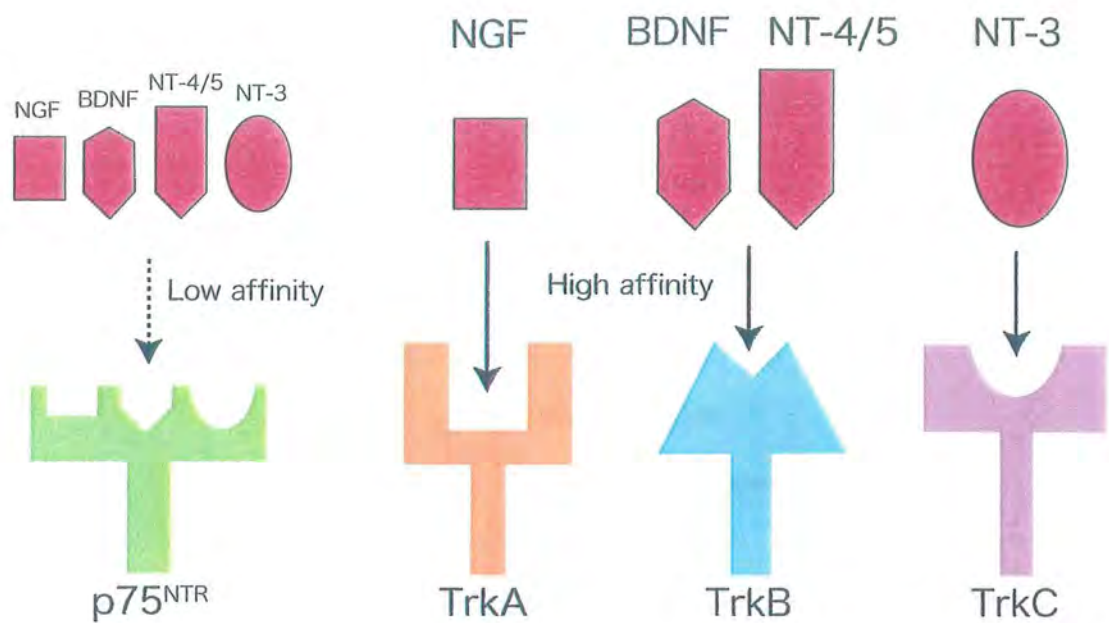


図1. 網膜層構造と細胞

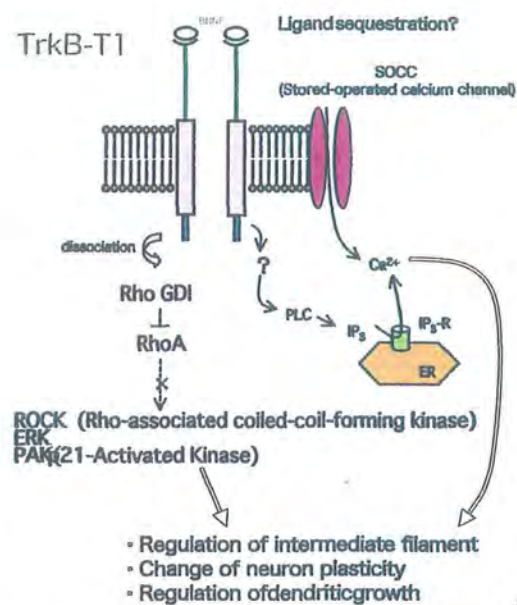
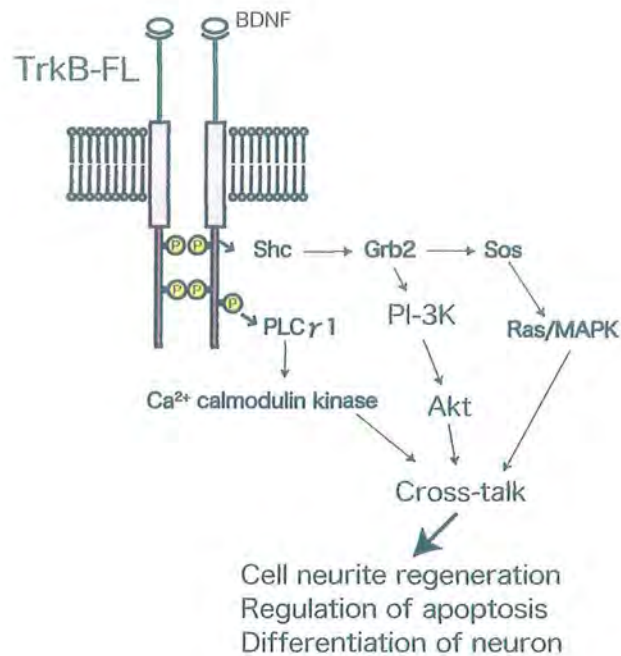
脊椎動物の網膜は、複数の層で構成されている。内側から内境界膜(ILM)、神経繊維層(NFL)、網膜神経節細胞層(GCL)、内網状層(IPL)、内顆粒層(INL)、外網状層(OPL)、外顆粒層(ONL)、外境界膜(OLM)、視細胞内節(IS)、視細胞外節(OS)および網膜色素上皮細胞層(RPEs)となっている。網膜には特殊に分化した神経細胞が存在し、視細胞、双極細胞、水平細胞、アマクリン細胞および網膜神経節細胞と5種に大別される。また、網膜にはミューラー細胞と呼ばれるグリア細胞が存在している。



作図: Asai N

図2. ニューロトロフィンとその受容体

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 と結合する。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 p75^{NTR} 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。



作図: Asai N

図3. TrkB signaling pathway

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。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が存在することが示されている。

A For real-time PCR

| Gene | Primer | Sequence | Annealing tm | Product size |
|---------|---------|------------------------------|--------------|----------------|
| BDNF | Forward | 5'-ACTCTGGAGAGCGTGAATGG-3' | 57°C | 307 bp |
| | Reverse | 5'-TACTGTCACACACGCTCAGC-3' | | |
| TrkB-FL | Forward | 5'-ATTCACCACCGAGAGTGACG-3' | 57°C | 314 and 278 bp |
| | Reverse | 5'-TCTTCCTTGTGTGTGGTTCC-3' | | |
| TrkB-T1 | Forward | 5'-CAACCTAACGACTAACAGAGCC-3' | 57°C | 196 bp |
| | Reverse | 5'-TTGGTTCAAGTCCACACTCC-3' | | |
| GAPDH | Forward | 5'-AAGGTGAAGGTCGGAGTCAA-3' | 60°C | 150 bp |
| | Reverse | 5'-TTGAGGTCAATGAAGGGGTC-3' | | |

B For in situ hybridization

| Gene | Primer | Sequence | cDNA from |
|---------|---------|--------------------------|-----------|
| TrkB-FL | Forward | 5'-AATGAGATCCCCTCCACG-3' | 1904—2838 |
| | Reverse | 5'-ATGATGCTCTCTGGAGGC-3' | |
| TrkB-FL | Forward | 5'-TCCTGGGACTACTGTTGC-3' | 1938—2754 |
| | Reverse | 5'-ACCGTTAGCTTTATGTGC-3' | |

表 1 . PCR Primer set

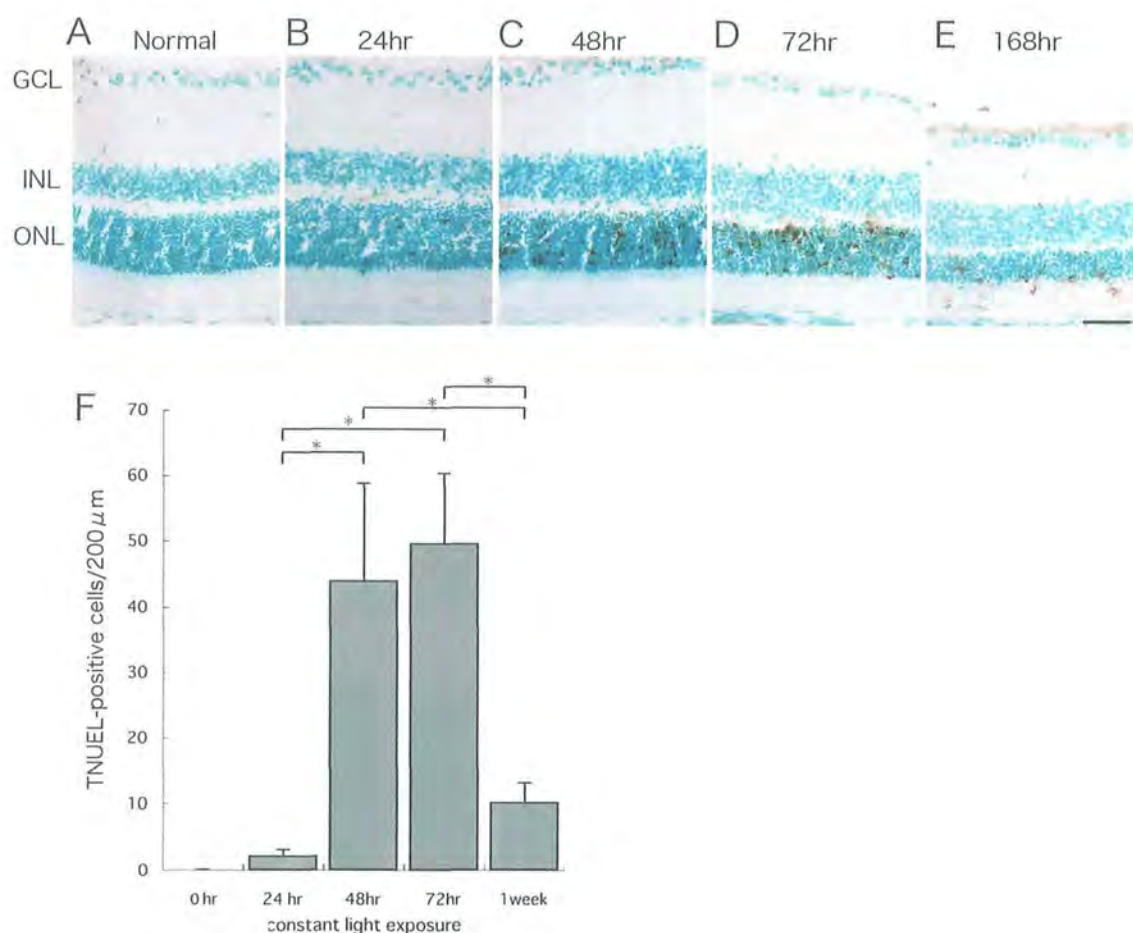


図4. TUNEL 法による細胞死の検出

A-E: TUNEL 法。通常網膜では TUNEL-陽性を示す細胞は検出されなかった(A)。LD 24hr で ONL に局在する細胞の中に TUNEL-陽性細胞が測定視野毎数個観察された(B)。LD 48 および 72 時間では多数の TUNEL-陽性細胞が検出された(C および D)。LD 一週間では ONL の厚さが著しく減少していた。また、TUNEL-陽性細胞は検出されたが、その数は十数個にとどまった(E)。GCL; ガングリオン細胞層, IPL; 内網状層, INL; 内顆粒層, OPL; 外網状層, ONL; 外顆粒層, RPE; 網膜色素上皮細胞層, バーは 50 μm。

F: TUNEL-陽性細胞数(mean ± SD)。LD 24 時間からアポトーシスが検出され始め、陽性細胞数のピークは 48-72 時間であった。48、72 時間で 24 時間や一週間後よりも有意に TUNEL 陽性細胞が多く存在した。*P<0.001。

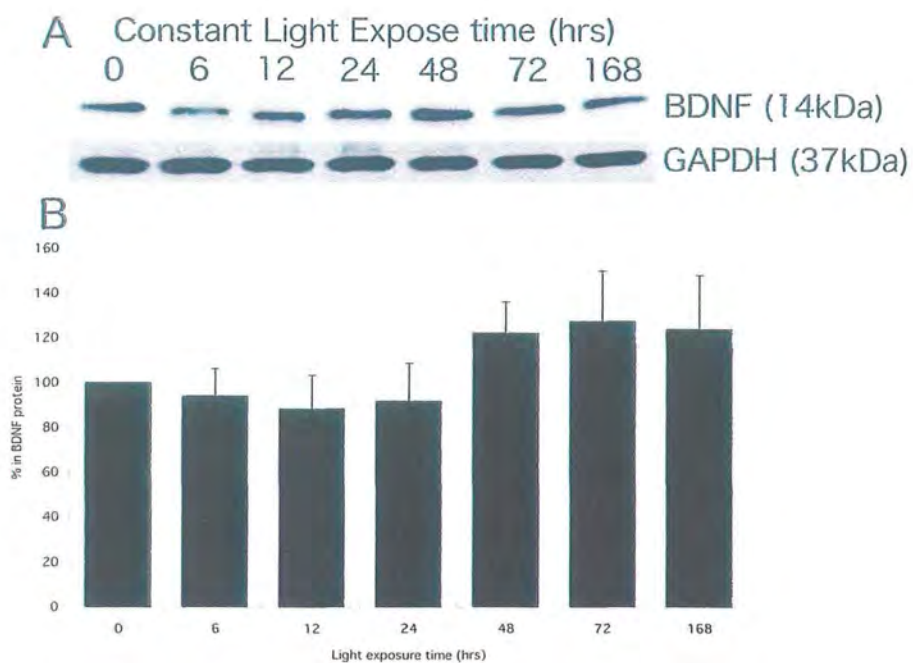


図 5 . BDNF western blotting

A : 14kDa バンドが BDNF である。

B : デンシトメトリーによる BDNF バンドの定量。BDNF タンパク質は連続光照射 6 時間で一時的に down-regulation するが、その後はすぐに通常レベルにまで回復した。

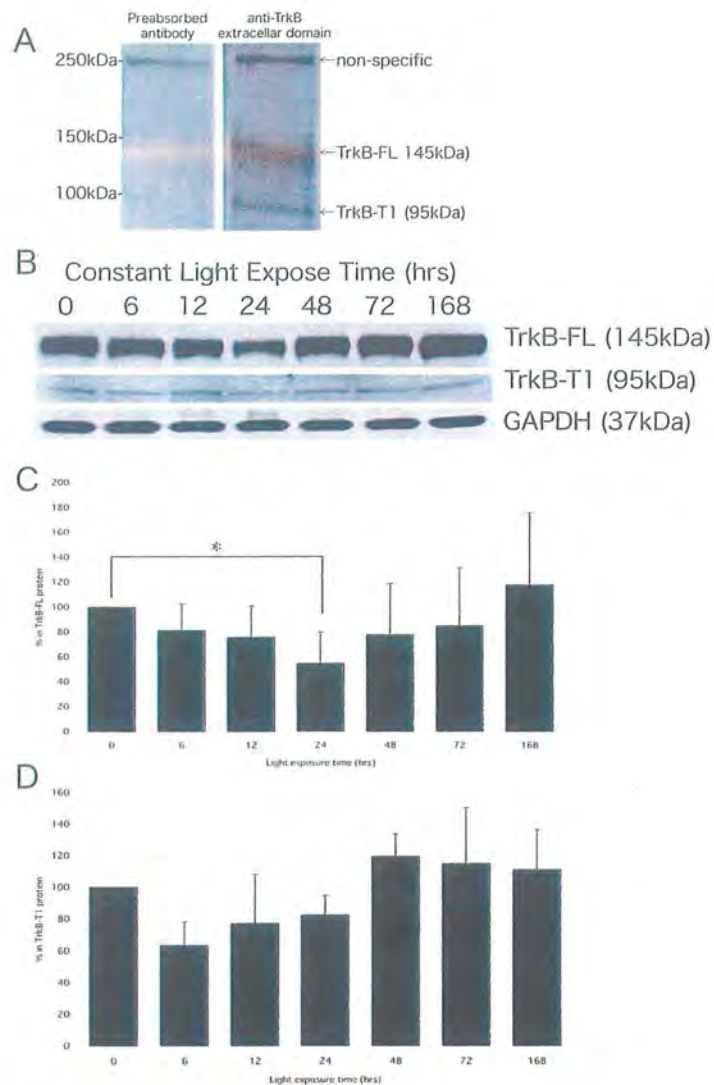


図 6 . TrkB western blotting

A: TrkB の細胞外ドメインに対する抗体でのウエスタンブロッティング分析で、250, 145 および 95kDa にバンドが検出された。抗原ペプチドで吸収した TrkB 抗体では 250kDa にのみバンドが検出された。それゆえ、250kDa バンドは非特異的なバンドと考えられ、分子量から 145kDa バンドが TrkB-FL で 95kDa が TrkB-T1 と考えられる。

B: 両方のタイプの TrkB が一時的に down-regulation されるが、すぐに通常レベルにまで回復した。

C: TrkB-FL バンドのデンストメトリーによる定量。連続光照射 24 時間で TrkB-FL は一時的に減少する。* $p < 0.001$ 。

D: TrkB-T1 バンドのデンストメトリーによる定量。TrkB-T1 は連続光照射 6 時間で一時的に減少したが、その後、通常レベルにまで回復した。

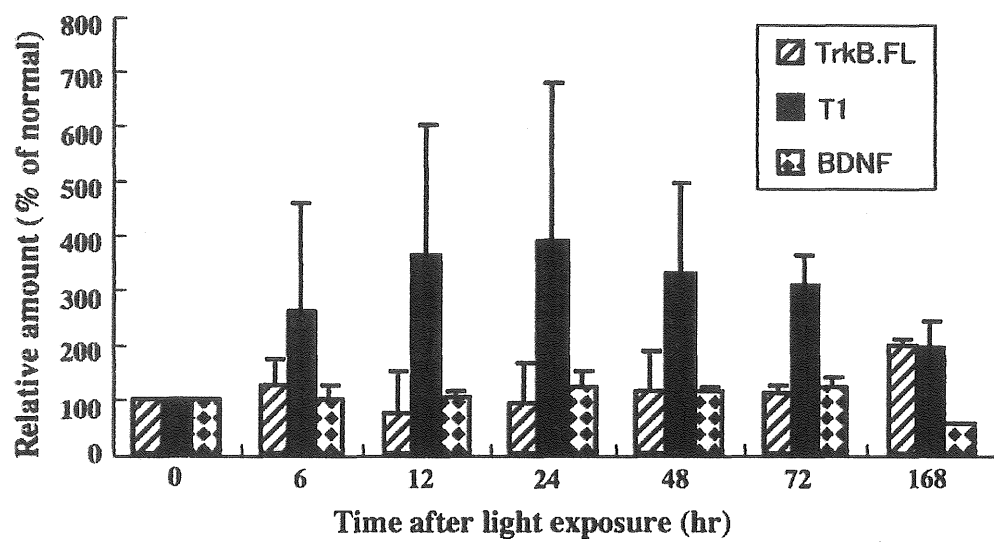


図7. リアルタイム PCR を用いた半定量性 RT-PCR 法
 連続光照射により TrkB-T1 mRNA の発現上昇が見られたが有意差はなかった。

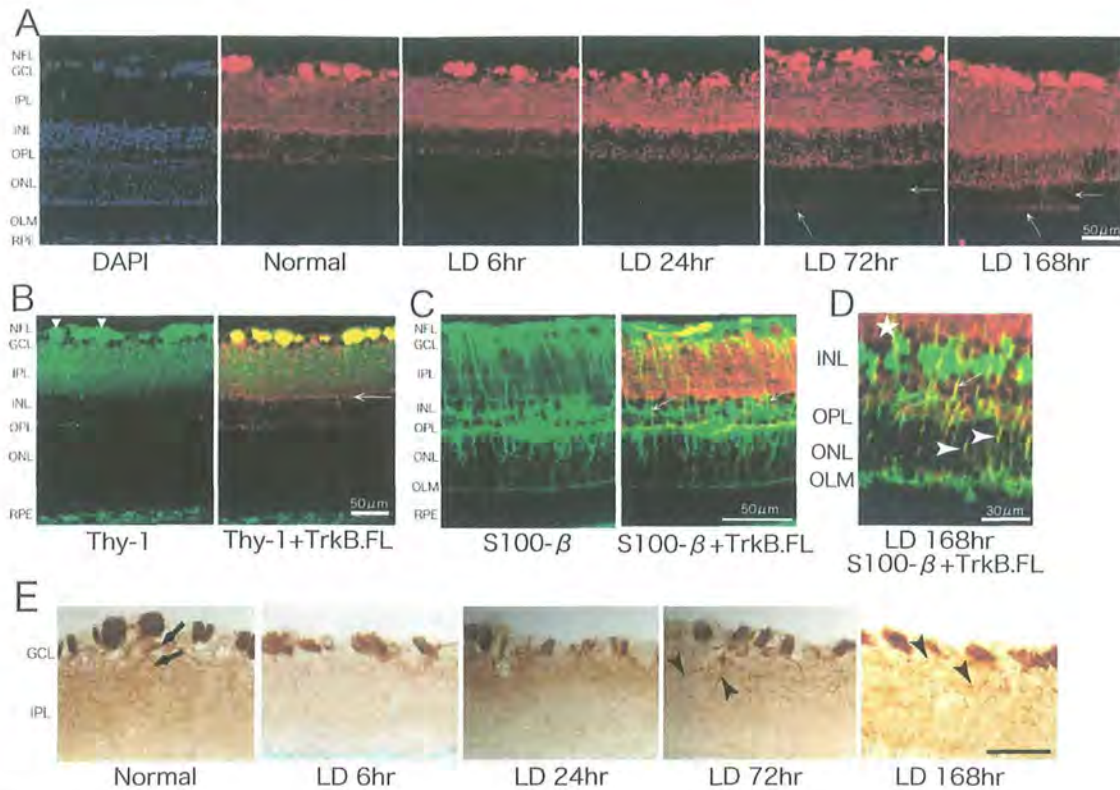


図 8. TrkB-FL immunohistochemistry

A : TrkB-FL 検出。通常網膜において TrkB-FL は NFL, GCL, IPL, INL そして OPL で観察される。LD 72 時間と 168 時間では加えて ONL と OLM でも TrkB-FL が観察されるようになった(矢印)。バーは 50 μ m。

B : Thy-1(緑)と TrkB-FL(赤)の二重染色。Thy-1 免疫反応は NFL, GCL, IPL で観察され、RGCs を検出した。NFL の大きな免疫反応は軸索の束と考えられた(矢じり)。Thy-1 と TrkB-FL の二重染色性が NFL, GCL, IPL で観察された。INL の硝子体側境界面に局在する細胞は二重染色性を示さなかった(矢印)。バーは 50 μ m。

C : S100- β (緑)と TrkB-FL(赤)の二重染色。S100- β でミューラー細胞を検出した。S100- β と TrkB-FL の二重染色性が通常網膜において INL で観察され、その形態は網膜を縦走していた(矢印)。

D : 連続光照射 168 時間ではさらに ONL でも縦走する二重染色性が観察された(矢じり)。また、INL に局在する cytoplasm での TrkB-FL は S100- β と重ならなかった(星印)。バーは 50 μ m。168 時間のみバーは 30 μ m。

E : 網膜内層における TrkB-FL。通常網膜の内層では GCL から IPL に伸びる突起状の TrkB-FL 免疫反応が観察された(矢印)。しかし、LD 6 および 24 時間では、突起状の発色は消失するが、LD 72 時間と一週間では再び突起状発色が観察されるようになった(矢頭)。バーは 50 μ m。

NFL; 視神経繊維層, GCL; ガングリオン細胞層, IPL; 内網状層, INL; 内顆粒層, OPL; 外網状層, ONL; 外顆粒層, OLM; 外境界膜, RPE; 網膜色素上皮細胞層。

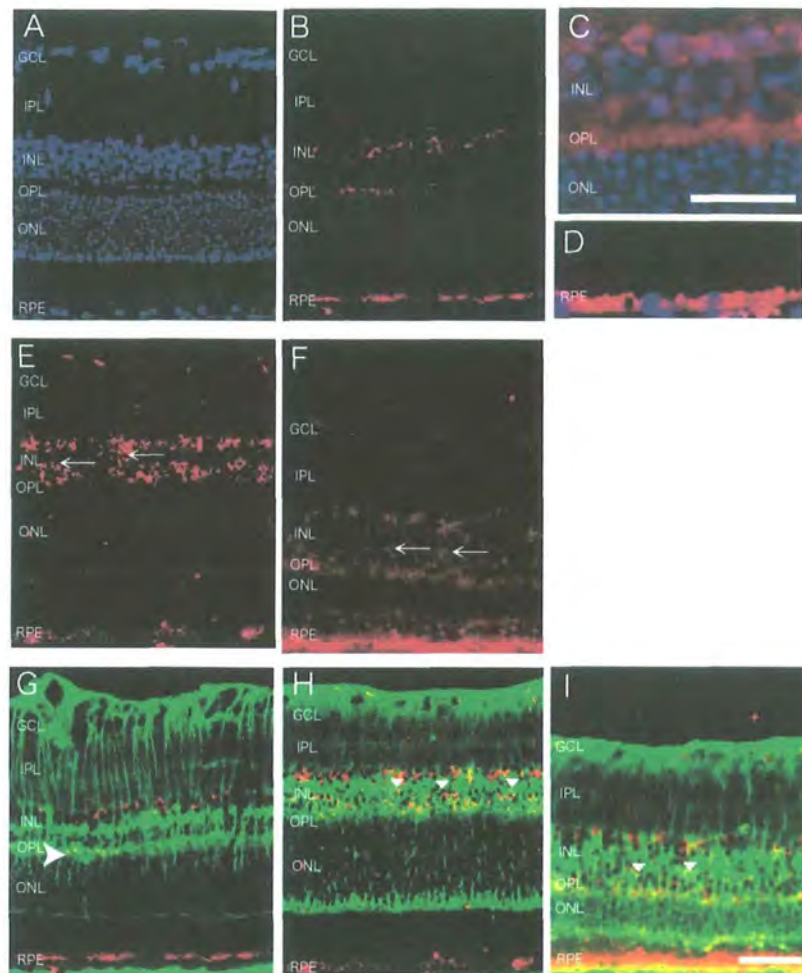


図9. TrkB-T1 immunohistochemistry

DAPI による核の検出(A)。通常網膜において TrkB.T1 免疫反応は INL の硝子体側境界面に局在する細胞の細胞質、OPL および RPE で観察された(B, C および D)。連続光照射 24 時間および一週間ではさらに INL の中央で TrkB.T1 が観察された(E および F, 矢印)。S100- β との二重染色性が通常網膜では OPL で観察された(G, 矢じり)。連続光照射 24 時間および 168 時間ではさらに INL 中央でも二重染色性が観察された(H および I, 矢じり)。

バーは 50 μ m, C のみ 30 μ m。

GCL; ガングリオン細胞層, IPL; 内網状層, INL; 内顆粒層, OPL; 外網状層, ONL; 外顆粒層, OLM; 外境界膜, RPE; 網膜色素上皮細胞層。

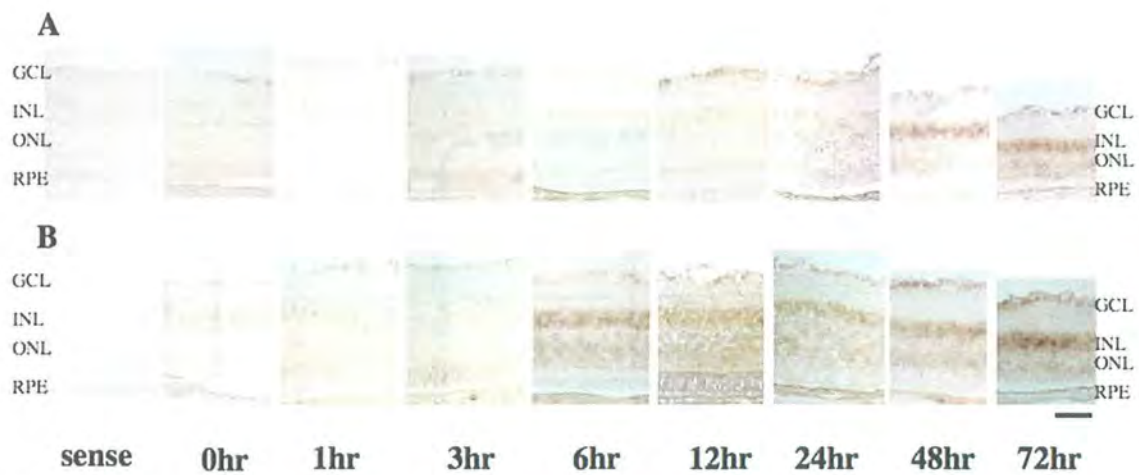


図 10. TrkB のアイソフォームの in situ hybridization

A: TrkB-FL。B: TrkB-T1。TrkB-FL 連続光照射により両 TrkB アイソフォーム mRNA は INL 中央で発現が上昇する。INL の中央という局在からミューラー細胞で TrkB 発現が起こっていると考えられる。バーは $40\mu\text{m}$ 。

GCL; ガングリオン細胞層, INL; 内顆粒層, ONL; 外顆粒層, RPE; 網膜色素上皮細胞層。

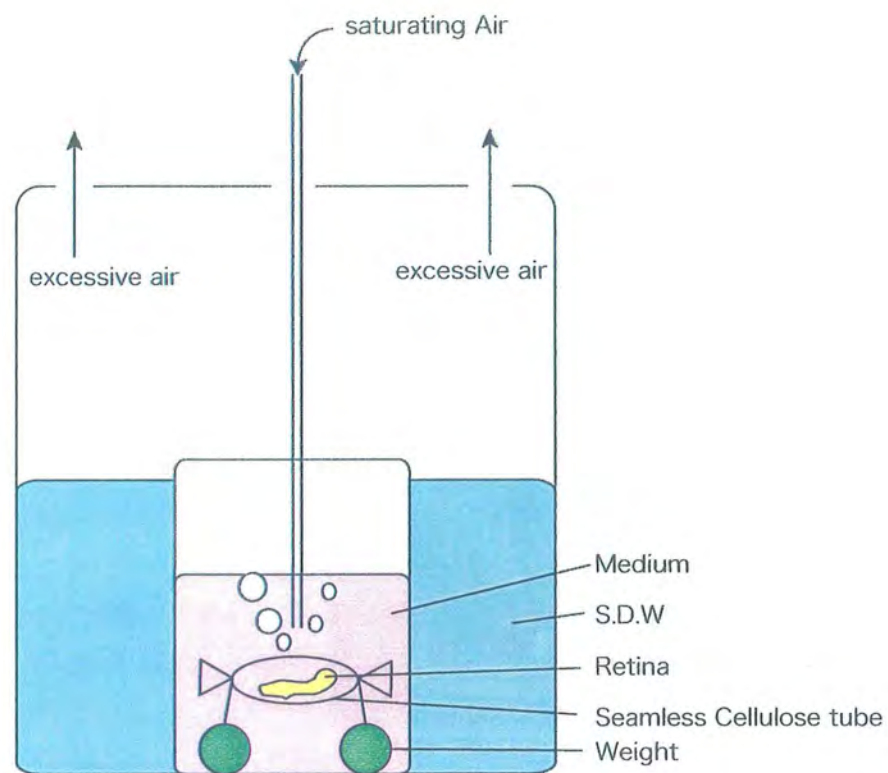


図 11. 透析膜を利用した新規器官培養系

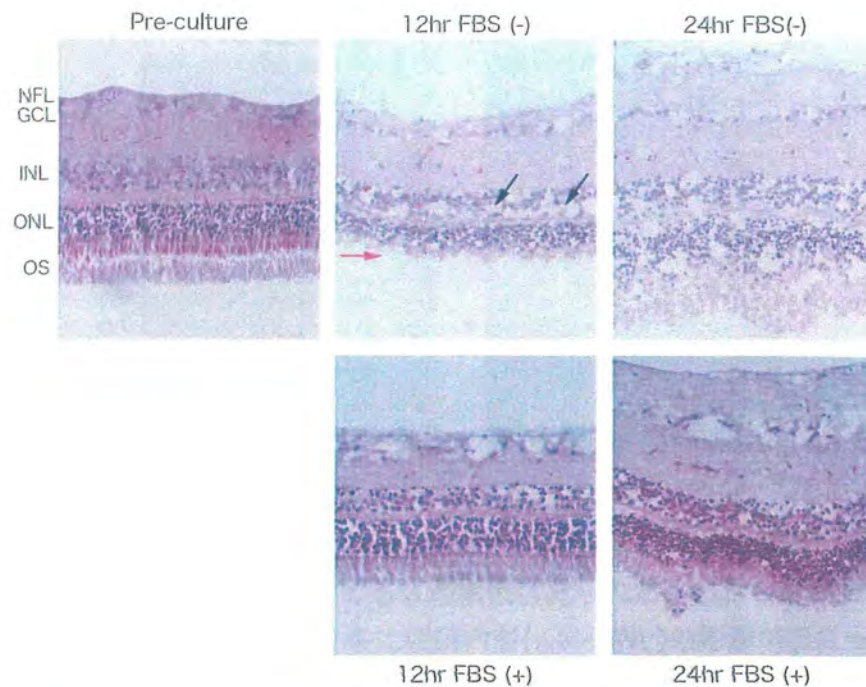


図 12. 培養ディッシュを用いた網膜器官培養

培養ディッシュを用いた無血清培地による培養では組織への傷害が多く、網膜の培養には不向きと考えられた。

NFL; 神経繊維層, GCL; ガングリオン細胞層, INL; 内顆粒層, ONL; 外顆粒層, OS; 視細胞層。

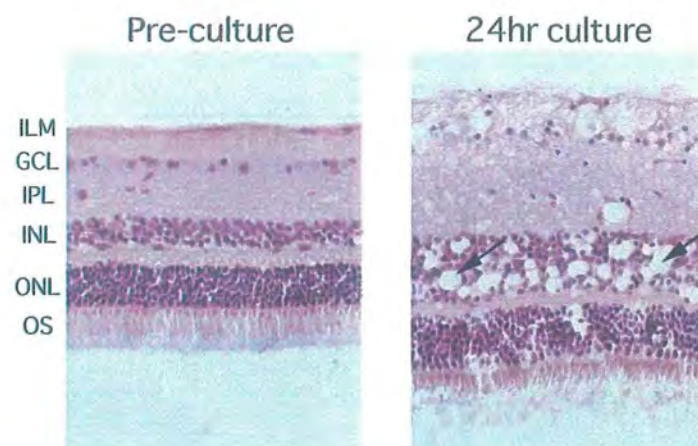


図 13. 透析膜系器官培養後の網膜像

新規網膜器官培養にて培地は Eagle's MEM、酸素濃度は 50%、温度は 37℃で培養を行った。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(矢印)。さらに網膜内層(ILM～INL)の膨潤が起こっていた。

ILM; 内境界膜, GCL; ガングリオン細胞層, IPL; 内網状層, INL; 内顆粒層, ONL; 外顆粒層, OS; 視細胞層。

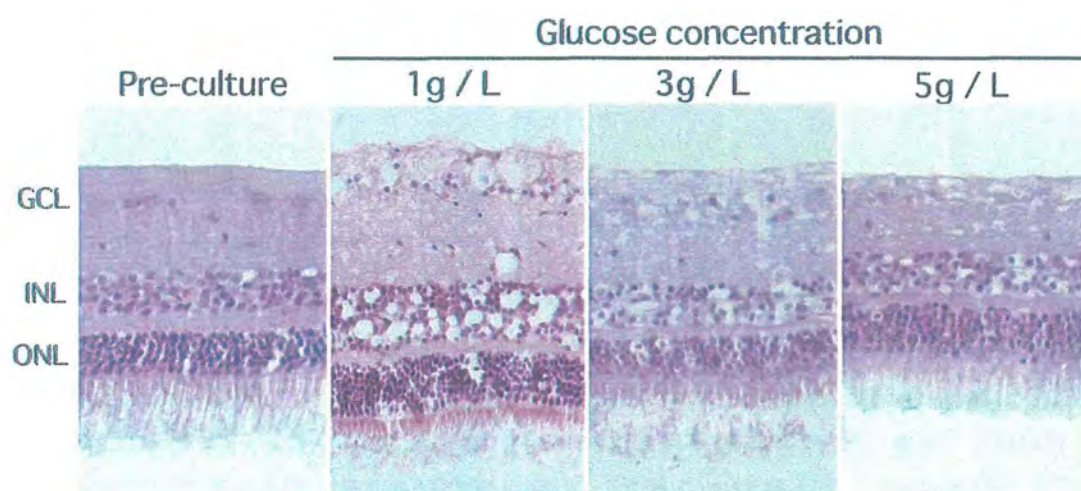


図 14. グルコース添加による網膜組織の維持

新規網膜器官培養にて、酸素濃度は 50%、温度は 37℃で 24 時間の培養を行った。
グルコースを添加することで網膜内層での傷害が軽減された。

GCL; ガングリオン細胞層, INL; 内顆粒層, ONL; 外顆粒層。

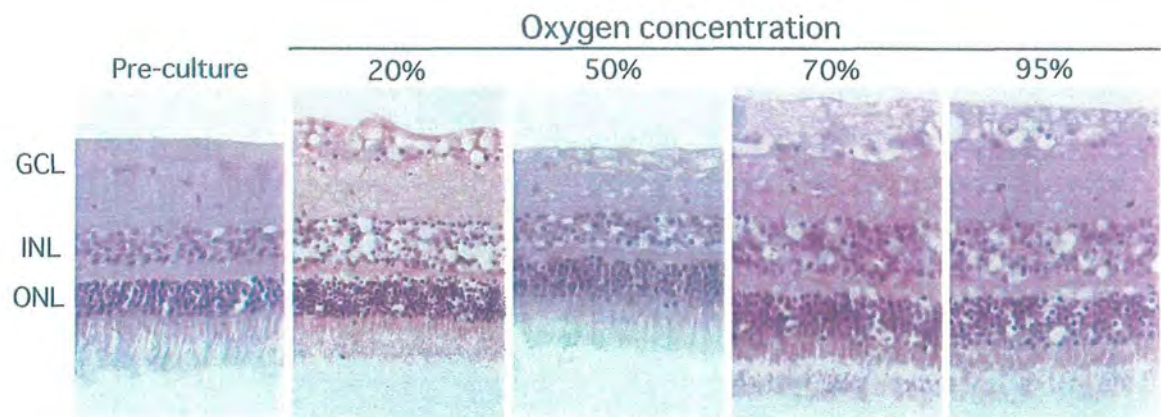


図 15. 網膜器官培養における酸素濃度の検討

新規網膜器官培養にて、培地はグルコース添加(5g/L) Eagle's MEM、温度は 37℃で 24 時間の培養を行った。酸素濃度が 20%では空洞化が見られた。また、70%以上の酸素濃度でも網膜内層での膨潤が観察された。これらの結果から、酸素濃度は 50%が最適と考えられた。

GCL; ガングリオン細胞層, INL; 内顆粒層, ONL; 外顆粒層。

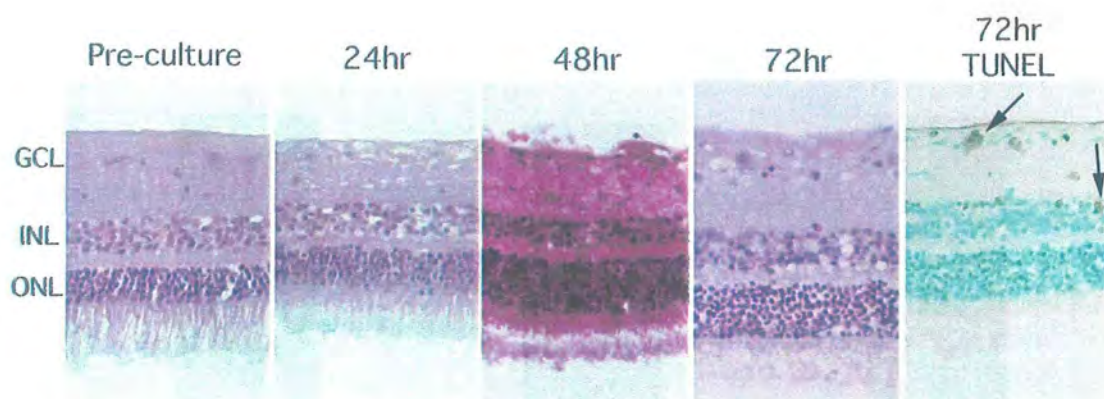


図 16. 透析膜系器官培養での培養期間

新規網膜器官培養にて、培地はグルコース添加(5g/L) Eagle's MEM、酸素濃度は 50%、温度は 37℃で培養を行った。72 時間の培養でも層構造はよく保たれていたが、GCL および INL で TUNEL 陽性細胞が認められた(矢印)。

GCL; ガングリオン細胞層, INL; 内顆粒層, ONL; 外顆粒層。

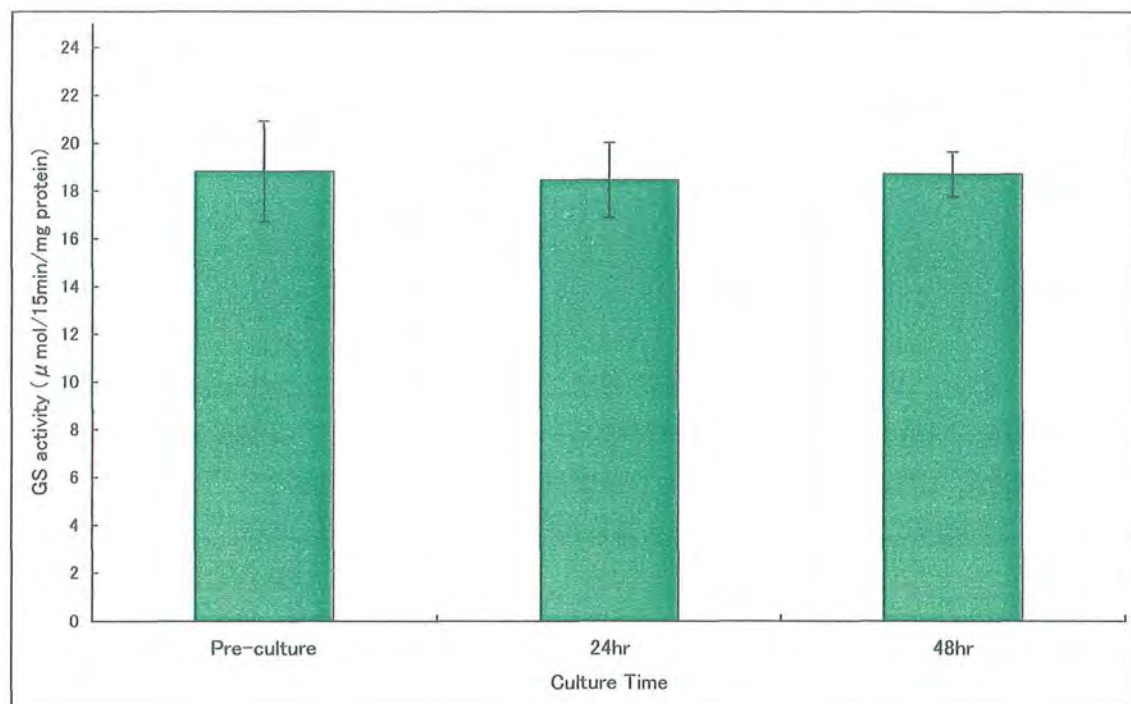


図 17. グルタミン合成酵素(GS)活性測定

新規網膜器官培養にて、培地はグルコース添加(5g/L) Eagle's MEM、酸素濃度は 50%、温度は 37℃で培養を行った。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。(n=5)

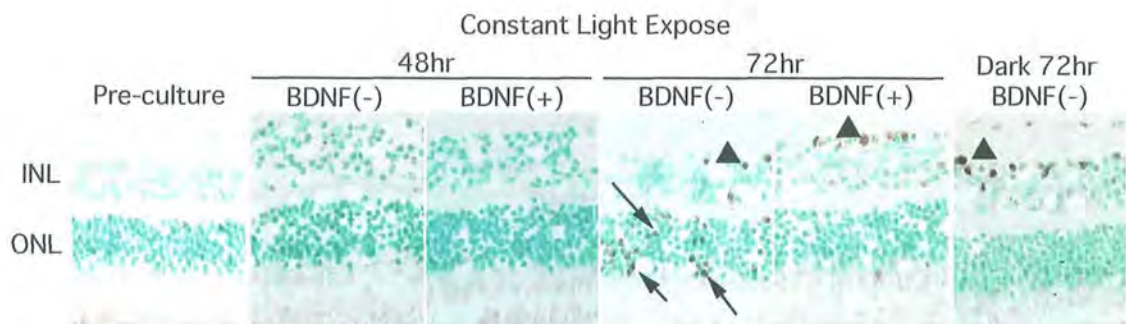


図 18. 透析膜系培養における連続光照射による視細胞死誘導と BDNF の効果

新規網膜器官培養にて、培地はグルコース添加(5g/L) Eagle's MEM、酸素濃度は 50%、温度は 37℃で培養を行った。連続光照射により ONL での TUNEL 陽性細胞が出現するが(矢印)、BDNF 投与でその細胞死が抑制される。暗条件での培養では ONL での細胞死は観察されない。

INL; 内顆粒層, ONL; 外顆粒層。

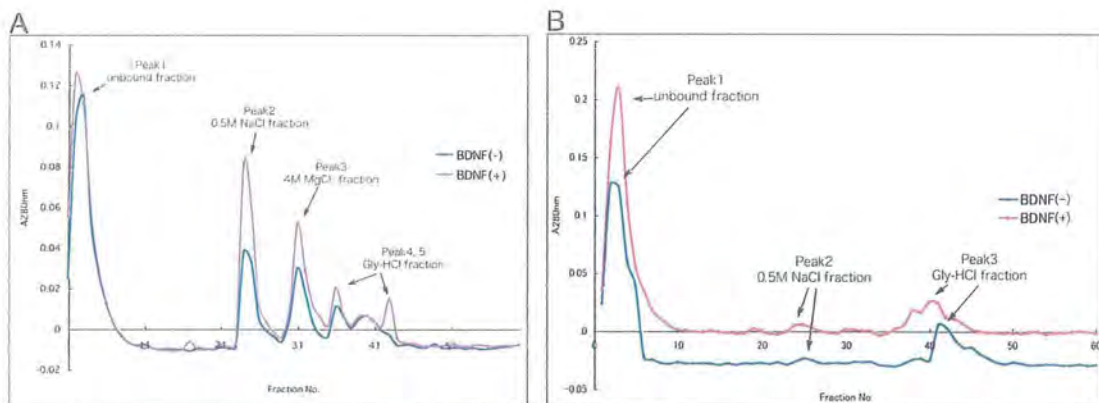


図 19. Affinity column による培養上清タンパク質の分離

A: PM affinity column による分離。5 つのタンパク質ピークが観察された。

B: POS affinity column による分離。3 つのタンパク質ピークが観察された。

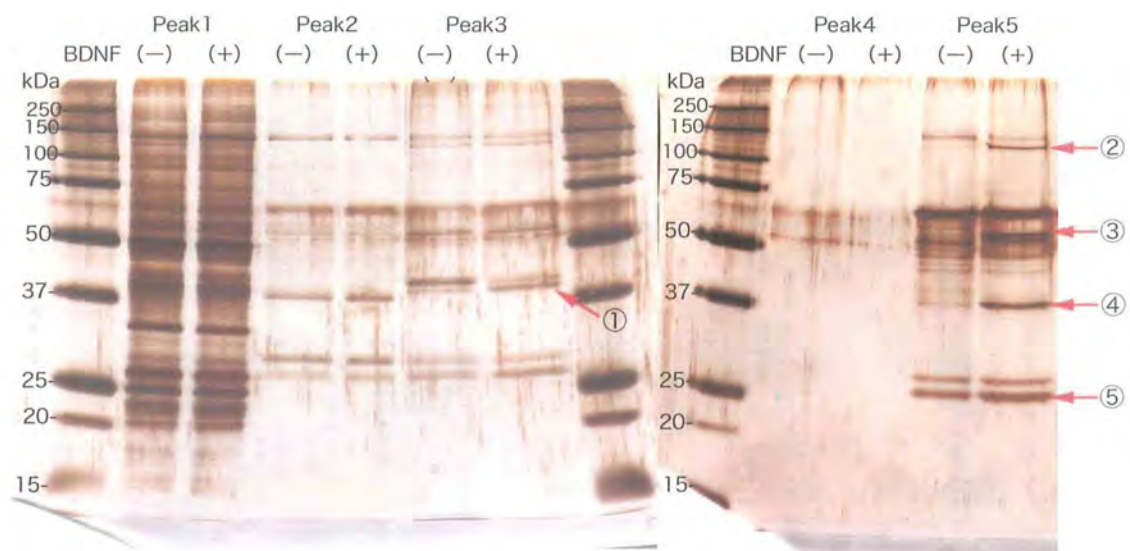


図 20. PM affinity column 溶出ピークにおけるタンパク質の比較

PM affinity column で得たタンパク質の各ピークを SDS-PAGE にかき、銀染色で band を検出し比較した。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 (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 (band ②-⑤)。

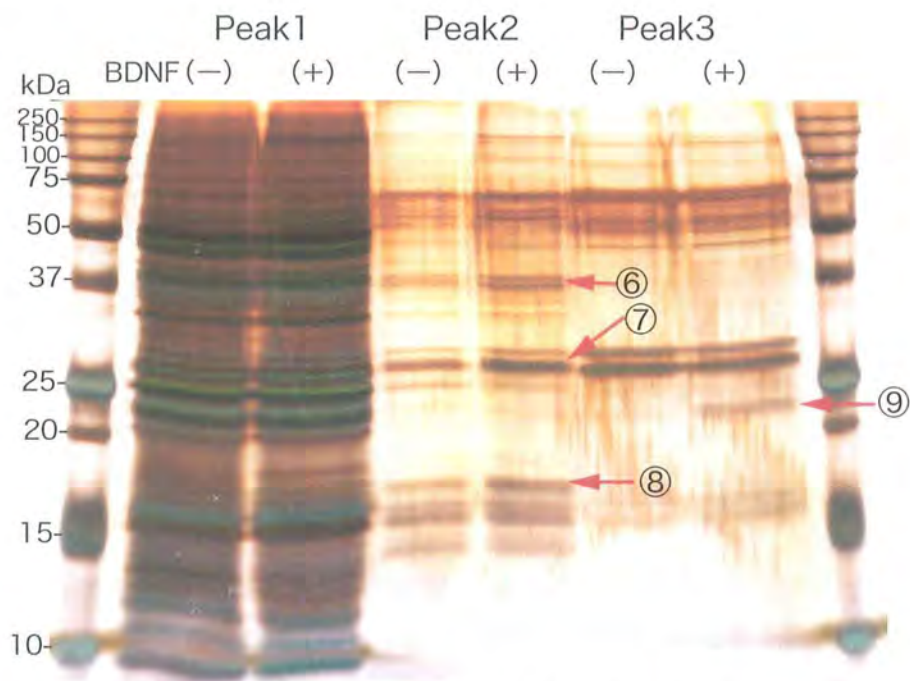


図 21. POS affinity column 溶出ピークにおけるタンパク質の比較

POS affinity column で得たタンパク質の各ピークを SDS-PAGE にかき、銀染色で band を検出し比較した。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)。

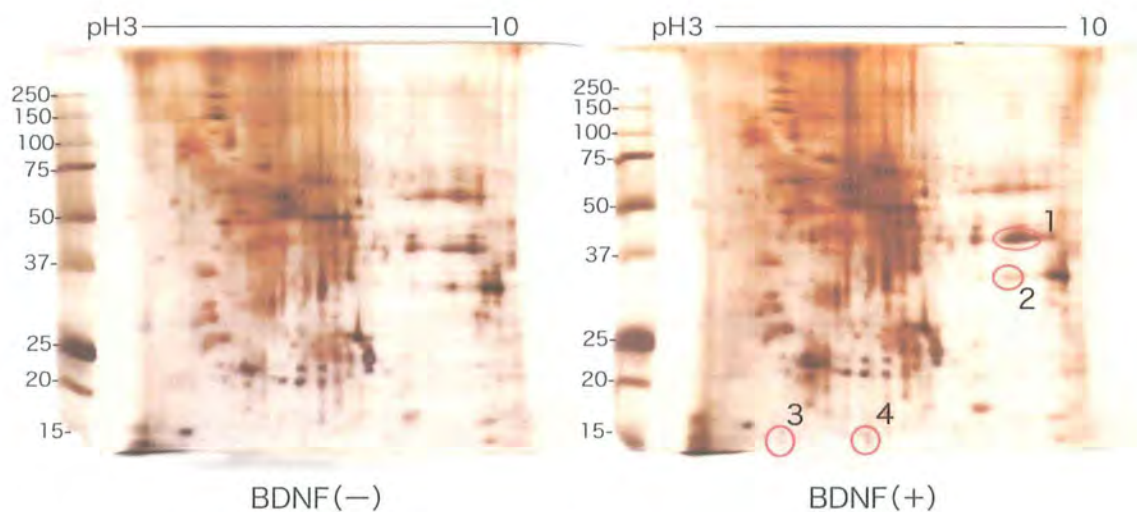


図 22. 二次元電気泳動による spot の比較

培養上清の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。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 spot1-4 とした。

| Band No. | identify | Accession ID | Sorre | Coverage | Predicted function |
|----------|---|--------------|-------|----------|---------------------------|
| 1 | Not identify | - | - | - | - |
| 2 | Not identify | - | - | - | - |
| 3 | GDP dissociation inhibitor 1 [Homo sapiens] | gil4503971 | 99 | 37 | signaling |
| 4 | Chain A, Human Brain Fructose 1,6-(Bis)phosphate Aldolase (C Isozyme). | gil61680382 | 99 | 41 | metabolism |
| 5 | tyrosine 3/tryptophan 5 -monooxygenase activation protein, zeta polypeptide | | | | |
| | [Homo sapiens].(14-3-3 Zeta) | gil4507953 | 99 | 68 | signaling |
| | Chain A, 14-3-3 Protein Beta (Human) | gil67464627 | 99 | 66 | signaling |
| | Calbindin 2 [Homo sapiens] | gil15930083 | 99 | 37 | Ca ²⁺ -binding |
| | stratifin [Sus scrofa] (14-3-3sigma) | gil113205700 | 91 | 11 | signaling |
| 6 | fructose-bisphosphate aldolase C | gil4885063 | 91 | 31 | metabolism |
| | SET [Homo sapiens] | gil145843637 | 99 | 25 | signaling |
| 7 | PHAPI2b protein | gil1498227 | 97 | 15 | signaling |
| | Chain A, 14-3-3 Protein Beta (Human) | gil67464627l | 95 | 30 | signaling |
| 8 | Not identify | - | - | - | - |
| 9 | peroxiredoxin 1 [Homo sapiens] | gil55959887 | 71 | 20 | antioxidant |
| | recoverin [Homo sapiens] | gil4506459 | 69 | 8 | Ca ²⁺ -binding |

| Spot No. | identify | Accession ID | Sorre | Coverage | |
|----------|---|--------------|-------|----------|------------|
| 1 | phosphoglycerate kinase 2 [Sus scrofa] | gil47523276 | 95 | 17 | metabolism |
| 2 | Not identify | - | - | - | - |
| 3 | Not identify | - | - | - | - |
| 4 | non-metastatic cells 1, protein (NM23A) expressed in isoform b [Homo sapiens] | gil4557797 | 78 | 32 | unknown |

表 2. BDNF 投与で増加の見られた band および spot の解析で同定されたタンパク質

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。

謝辞

稿を終えるにあたり、御指導ならびに御校閲を賜りました弘前大学農学生命科学部分子生命科学科 石黒 誠一 教授、同 菊池 英明 教授、岩手大学農学部農業生命科学科 高橋 壽太郎 教授に深く感謝申し上げます。

本実験を遂行するにあたり、全面的なご協力をいただきました東北大学大学院医学研究科付属創世応用センター細胞治療開発分野 阿部 俊明 教授に深謝いたします。いくつかの分析の実施にご協力いただいた東北大学大学院医学研究科付属創世応用センター細胞治療開発分野 石川 有美 氏にお礼申し上げます。in situ hybridization 法の遂行にあたり御助言頂きました東北大学医学部眼科 佐藤 肇 博士に深く感謝申し上げます。

本実験の遂行にあたり、プロテオーム解析に御協力いただいた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 尾崎 拓 氏にお礼申し上げます。二次元電気泳動法での解析に際しご助言賜りました岩手大学大学院連合農学研究科生物資源科学専攻ゲノム工学連合講座 葛西 秋宅 氏にお礼申し上げます。新規器官培養系の確立に際し、多大なる御協力をいただきました弘前大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻 服部 安孝 氏に深謝いたします。