

学位論文抄録

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

瀧原 祐史

熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻視機能病態学

指導教員

谷原 秀信 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻視機能病態学

学位論文抄録

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

[方法]ラットRGCをtwo-step immunopanning法により単離、培養した。Green fluorescent protein(GFP)標識したBDNFのプラスミドを遺伝子導入後、軸索内と樹状突起内に発現したBDNF-GFPの動態を5秒間隔のタイムラプス法により撮影した。1mMコルヒチンを投与後、BDNF軸索輸送の変化を経時的に観察し、その軸索輸送の変化がエチジウムホモダイマー1陽性の細胞死よりも前にみられる現象かを検討した。

[結果]培養RGCの軸索、樹状突起においてBDNF-GFPの発現は小胞状であった。タイムラプス法により、軸索輸送平均速度は、 $0.86 \pm 0.37 \mu\text{m/s}$ (最高速度 = $2.03 \mu\text{m/s}$)であり、樹状突起内輸送平均速度 $0.49 \pm 0.19 \mu\text{m/s}$ に比べて有意に速かった($P < 0.0001$)。コルヒチン投与前に比べて、投与2時間後($P = 0.003$)、3時間後($P = 0.0002$)では、有意にBDNF軸索輸送が減少したが、細胞死は24時間後に観察された。

[考察]本研究で評価したBDNF-GFPは、内因性BDNF同様に、発現パターンが小胞状であり、活動電位依存性に放出された。このことよりBDNF-GFP動態は内因性BDNF動態を反映していることが示唆された。生細胞イメージングにおいて、BDNF-GFP小胞の、軸索輸送、樹状突起内輸送動態は大きく異なり、両者の微小管配列極性の違いが原因と思われた。RGC細胞死前に検出された、コルヒチン投与による経時的BDNF-GFP軸索輸送減少は微小管重合阻害による軸索内微小管消失の進行を反映していると考えられた。

[結論]*In vitro* 生細胞イメージングにより、培養RGCにおけるBDNF軸索輸送動態は樹状突起内輸送動態と大きく異なることがわかった。さらに、軸索障害を受けたRGCの細胞死前の軸索輸送減少を検出できた。軸索輸送評価は、緑内障性視神経症によるRGCの細胞死を予知する手段として有用かもしれない。