

学位授与番号：乙 3 1 2 7 号

氏 名：野呂 隆彦

学位の種類：博士（医学）

学位授与日付：平成 27 年 9 月 9 日

学位論文名：

Spermidine は視神経損傷後の網膜神経節細胞保護と視神経軸索再生を促進する

主論文名：

Spermidine promotes retinal ganglion cell survival and optic nerve regeneration in adult mice following optic nerve injury.

（Spermidine は視神経損傷後の網膜神経節細胞保護と視神経軸索再生を促進する）

学位審査委員長：教授 池上雅博

学位審査委員：教授 加藤総夫 教授 小島博己

# 論文要旨

論文提出者名	野呂 隆彦	指導教授名	常岡 寛
--------	-------	-------	------

## 主論文題名

**Spermidine promotes retinal ganglion cell survival and optic nerve regeneration in adult mice following optic nerve injury.**

(Spermidineは視神経損傷後の網膜神経節細胞保護と視神経軸索再生を促進する)

Noro T, Nametaka K, Kimura A, Guo X, Azuchi Y, Harada C, Nakano T, Tsuneoka H, Harada T

Cell Death and Disease 2015年 6巻 e1720

緑内障はわが国最大の失明原因であり、網膜神経節細胞とその軸索の変性を特徴とし、進行性の視神経萎縮と視野障害を引き起こす。緑内障治療においては既存の眼圧下降療法に加えて、神経保護作用を有する治療法の確立が望まれている。Spermidineは強い抗酸化作用を持つポリアミンの一種で、内因性の活性酸素除去物質として作用する。また大豆や茶葉、マッシュルームなどに多く含まれているため日常より経口摂取が可能である。本研究では視神経損傷モデルマウスにおいて、網膜神経節細胞と視神経軸索に対する spermidine 経口投与の影響を調べた。

Spermidineは視神経損傷による網膜神経節細胞死を有意に抑制した。この作用機序としては細胞死を誘導するASK1 (Apoptosis signal-regulating kinase-1) -p38 経路の不活化に加えて、病巣部へのミクログリアの集積とMCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) 等のケモカインの産生抑制が推定された。さらに spermidine は視神経損傷モデルにおける視神経軸索再生を促進することを見出した。

以上の結果は spermidine が神経保護ならびに神経再生効果を有し、緑内障や外傷性視神経症を含む種々の神経変性疾患治療に有用な可能性を示唆するものである。

## 論文審査の結果の要旨

野呂 隆彦（ノロ タカヒコ）氏の学位論文審査は、平成 27 年 8 月 10 日、審査委員長 池上 雅博（イケガミ マサヒロ）、審査委員加藤 総夫（カトウ フサオ）教授、小島 博己（コジマ ヒロミ）教授の担当のもと、公開口頭試験の形式で行われた。

野呂氏の博士論文は主論文 1 篇からなり、主論文は、2015 年に Cell Death and Disease 誌に掲載された。テーマは、Spermidine promotes retinal ganglion cell survival and optic nerve regeneration in adult mice following optic nerve injury（和文表題：Spermidine は視神経損傷後の網膜神経節細胞保護と視神経軸索再生を促進する）である。指導教授は、常岡 寛（ツネオカ ヒロシ）教授である。

野呂氏の論文内容プレゼンテーションの後、口頭試験が行われ、審査委員から以下のような質問がなされた。

### 加藤教授

- Spermidine の容量（30mM）は、どのように決めたのか、その容量が optimal と考えた判断根拠は何か。
- Spermidine treatment suppressed such RGC loss: “suppressed” は言い過ぎではないのか。減少を有意に抑えたに過ぎないのではないのか。  
“protects RGCs from ONI-induced cell death” は言い過ぎではないのか。  
Protect と言えるか。  
細胞死に作用しているという根拠は何か。
- ONI 後の IRL の厚さの減少は何に起因しているのか。その実体は何か。なぜ、7 日以降は cell number の減少とは平行せずほぼ plateau に達するのか。
- 細胞数はどのようにカウントしたのか。
- 神経節細胞をカウントする際にグリア細胞が含まれている可能性はないのか。
- Fig. 2a の写真の間の線は恣意的に過ぎるのではないのか。境界線が明瞭ではない場合、どのように計測に客観性を持たせたのか。
- OCT の利点は、同一個体での追跡が可能な点であるが、Fig. 2d ではどのような検定を行ったのか、その妥当性を述べよ。
- 英論文 p. 2 左下、下から 3 行目の引用 14 は適切ではないのではないのか。
- Fig. 3c, d: NeuN との重なりを見ているが、これは ONI モデルでも確認できているのか。ONE, Spermidine はニューロンに発現しているのか。
- Fig. 4b は iba1 染色とのことであるが形状や集積が不自然に見える。このうち、活性化マイクログリアはどの程度なのか。 Fig. 4b の normal ではほとんど

signal が見られないが、Fig. 4c の定量化はどのように行ったのか。

- Microglia 活性化と RGC 細胞死の因果関係を説明せよ。Microglia 活性化があったから、cell death につながったのか。RGC 細胞死が microglia を活性化するのではないのか。その可能性をどう評価するか。
- Fig. 5 の IHC 像では、iNOS のシグナルがブロードに見られる。必ずしも iba1 と重ならない部分も多い。Spermidine が astrocyte 有意に取り込まれることを考えると、astrocyte (Muller 細胞) との共染結果も参照すべきではないか。
- 英文 p. 3 左下最下行に、「軸索再生数を強調した (enhance the number は英語としておかしくないか) のはおそらく、RGC の生存率が増加したことによって」、とある。この因果関係が不明である。軸索は何から再生していると考えているのか。
- Fig. 3b にのみでてくる ASK-1 の意義が十分解明されていない。これだけではどの現象がどの現象の上流で、どの現象が副次的なのか、解明できていない。ただ現象を見ただけである。すなわち、根本的なことが判明していない。今後どのような実験をするとわかるのか。ASK-1KO マウスは一条らの努力によって確立しており、本学にもいたことがある。その利用を考えるべきではなかったのか。
- NMDA 受容体に関する spermidine の影響と本実験での容量との関連がまったく整合していない。NMDA-R の関係は。
- 全体として、各事象間の因果関係が証明できていない。観察的傍証が並んでいるだけで、機構の解明には全く至っておらず、このことは Discussion には記されているが、結論では無視されている。このことについてどう考えるか。
- 2 群間比較に t 検定を用いたとあるが、ほとんどの検定は 3 群間比較で結論を出しているのだから、post-hoc 他群比較補正をしなければならないのではないか。そうするとすべての結論が変わる可能性がある。また、OCT のデータは同一個体からの記録なので repeated measures の検定をする必要があり、これも、結論に影響を及ぼす。これをしなければ in situ で繰り返し測定できるというこの測定法の利点を生かしたことになるのではないか。
- Spermidine は点眼薬として用いることはできないのか。

#### 小島教授

- 視神経挫滅モデルマウスを用いているが、グルタミン酸トランスポーター欠損マウスとアポトーシスの機序に差があるのか。
- Spermidine は、他の神経疾患でも効果がみられるのか。
- Spermidine は、今回用いた外傷性のモデルマウスでは効果があるようである

が、外傷性でない障害に対しても効果があるのか。

- Spermidine の効果を期待できるためには、人ではどの程度摂取すればよいのか。また、食品で摂取可能とあるが、何をどの程度摂取すると良いのか。
- Spermidine 投与による神経保護作用において、種々のケモカインの抑制がみられたが、MIP1- $\alpha$  の抑制がみられなかったのは何故か。
- ASK1-p38 pathway が、RGC 死に関与するが、spermidine はこれを優位に抑制したとあるが、もっと上流での関与に関して検索しているか。
- 視神経軸索が再生したとあるが、傷害されて残存しているものをみているだけではないのか。再生したことを証明すべき。

## 池上

- 「緑内障は、網膜神経節細胞 (RGC) とその軸索の変性を特徴とし」とあるが、眼圧が高値の者も、正常眼圧の者も、失明する機序は同じ、すなわち「網膜神経節細胞 (RGC) とその軸索の変性」なのか。
- 挫滅刺激の程度は一定なのか。ピンセットを用いるとしているが、人の手で行うとするとその操作に、強弱の差が出てしまわないのか。
- 視神経挫滅は、「視神経軸索における軸索流の鬱滞を起し、アポトーシス経路が起動することにより細胞死が起こると考えられる。」とあるが、軸索流とは何か。
- 薬剤投与は挫滅の前に投与されているが、挫滅後では遅いのか
- 視神経挫滅 (ONI) 後に、網膜神経細胞層の細胞数を計測しているが、他の細胞 (内顆粒層、外顆粒層、視細胞 (桿状体・錐状体細胞)) は測定する必要はないのか。緑内障の傷害として、他の細胞は無関係なのか。
- 厚さについて、網膜内層として、「内境界膜～外網状層と外顆粒層の間まで」としているが、網膜内層としてのとり方は、これが一般的なのか。内境界膜～外境界膜までではないのか。視細胞 (桿状体・錐状体細胞) は、なぜ入れないのか。
- 神経節細胞の数、網膜内層の厚さは網膜のどこで測定したのか。どこの部位でも同じデータとなるのか。
- 光干渉断層計 (SD-OCT) により、神経節細胞複合体 (神経節細胞、神経線維層、神経細胞層、内網状層) を測定している。視神経乳頭部は、網膜と異なりこれで全層なのか。全層でないのならば、何故この層に限っているのか。
- 光干渉断層計 (SD-OCT) の像 (図 3) で、GCC の厚さを正確に測定するのは難しいのではないのか。内境界膜～どの部分までを測定しているのか。ドット状の光シグナルが陽性の部分までか。ドット状の光シグナルが陽性の部分が神経節細胞といえるか。どうして組織を作成しなかったか。

- ONI 後、MCP-1, MIP1- $\alpha$ , RANTES のケモカインが上昇し、Spermidine により投与により、MCP-1, RANTES の発現レベルが減少。また、MCP-1, RANTES は、ミクログリア遊走、活性化に関与しているとのことから、検索したところ、ONI 後、ミクログリアが増生し、Spermidine により、ミクログリア減少が見られている。さらに、活性化ミクログリアが iNOS の発現をきたし、RGC の死を誘導することを証明した。すなわち、Spermidine が活性化ミクログリアを減少させることで iNOS 産生を抑制し、神経保護作用を発揮するとしている。一般的に、ミクログリアは、マクロファージ類似の食作用をおこなう細胞であり、傷害された組織の修復に関与すると考えられているが。本実験以外で、ミクログリア悪者として働いている例はあるのか。
- コブラ・トキシン・サユニット・B とは、何のために用いているか。
- ONI 後、14 日で評価しているが、一般的に神経の再生はどの位の期間を要するのか。14 日では短すぎないか。
- 「この結果から、Spermidine は RGC の生存を促進することにより再生線維数を増加させたものの、その再生効果は限られたものであることが示唆された。」この文章の意味は。どうしてその再生効果は限られたものであるのか。
- 視神経軸索再生は、Spermidine の直接効果によるものか。
- 視神経の再生効果はどの程度のものなのか、またどのように発展させてゆく可能性があるか。
- Spermidine の保護効果の中で、どの経路が最も強く効いているのか
  - (① ASK1-p38 pathway の活性化の抑制、②ミクログリアの遊走に必要なケモカインの産生抑制、③視神経再生)

以上の 41 もの多数の質問がなされた。これらに対して野呂氏は適切に解答した。

加藤教授、小島教授と慎重に討議した結果、加藤教授より、統計処理に問題があり（問題点については加藤教授の質問事項参照）、新たに全ての統計処理をやり直す必要ありとの意見がだされた。この意見に従い、加藤教授の指導のもと、全ての統計処理を新たに行った結果、元テーシスと同様の結果が得られた。テーシスの関連部分を適正な統計処理の結果に書き直し、修正テーシスを作成しこれを確認した。本修正に伴い、学位請求論文として問題ない水準になったものとする。本論文は、これまで治療が困難であった正常眼圧緑内障の治療の可能性を示したものであり、博士論文として十分価値あるものと考えた。