The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Marked increase in glutamate-aspartate transporter (GLAST/GluT-1) mRNA following transient retinal ischemia
Author(s)	大鳥, 安正
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39016
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

氏　　名	大鳥安正（おおとりやすまさ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　11655　号
学位授与年月日	平成7年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科外科系専攻
学位論文名	Marked increase in glutamate-aspartate transporter (GLAST／GluT-1) mRNA following transient retinal ischemia **（ラット網膜虚血・再灌流モデルにおけるグルタミン酸トランスポーター遺伝子の解析）**
論文審査委員	（主査） 教　授　田野　保雄 （副査） 教　授　遠山　正彌　　教　授　早川　　徹

論文内容の要旨

【目的】

近年，網膜虚血においても脳虚血と同様にグルタミン酸の興奮性神経毒性が注目されている。グルタミン酸は脳および網膜に多く存在する興奮性アミノ酸で神経細胞の情報伝達に重要な働きをしている。一方，細胞外グルタミン酸濃度が過剰に上昇すると神経細胞死をきたすこともよく知られている。グルタミン酸トランスポーターは細胞外グルタミン酸を細胞内に取り込む膜蛋白で，グルタミン酸による神経細胞の情報伝達を終了させるばかりではなく，細胞外のグルタミン酸濃度を調節し興奮性神経毒性をきたさないレベルに保つ役割も担っている。そこで，我々はグルタミン酸トランスポーター（GLAST）mRNAの発現分布を*in situ*ハイブリダイゼーション法を用いて正常ラット網膜で検討した。また，興奮性神経細胞死と関連深い網膜虚血・再灌流モデルをラットで独自に作成し，このモデルを用いてグルタミン酸トランスポーターmRNAの経時変化に関しても検討を加えた。

【方法】

雄Wistar rat（150-200g）を4％パラホルムアルデヒドで灌流固定し，12μmの薄切切片を作成した。GLAST mRNAの検出には，GLAST／GluT-1の特異的な塩基配列に対して相補的な41merのオリゴヌクレオチドプローブを合成し，3'-end labeling法で〔α-^{35}S〕dATPを標識したものをプローブとして用い*in situ*ハイブリダイゼーションを行った。抱水クロラール麻酔下（0.42mg／g body weight）で眼動脈の枝が視神経に入るところを直視下で結紮し，90分後再灌流を確認し網膜虚血・再灌流モデルとした。再灌流後30分，1時間，3時間，24時間，48時間，7日にそれぞれ眼球を摘出し経時的に同一スライドグラス上で対側コントロール側と手術側との凍結切片を作成し，同様に*in situ*ハイブリダイゼーションを行い，GLAST mRNAの発現量の変化を検討した。発現量は内顆粒層（INL）の中央部の単位面積あたり（78.5μm²）のグレイン数をカウントし半定量を行った。

【結果】

1）コントロール実験

RNaseで前処置したものおよび過剰の非標識プローブ（100倍）を標識プローブと同時にハイブリダイゼーションを行ったものではバックグラウンドのみしか見られなかった。

2）GLAST mRNAの発現

adult Wistar ratでは，内顆粒層（INL）の内層3分の2および一部神経節細胞層（GCL）の神経線維層よりの紡

錐型細胞にGLAST mRNAの発現が認められた。また，視神経乳頭部の細胞の約90%にGLAST mRNAの発現が見られた。

3）網膜虚血・再灌流モデルでのGLAST mRNAの経時的変化

今回のモデルでは，再灌流24時間後にはINLの最内層部分に形態学的変化が起こり，再灌流48時間後ではINLおよびGCLの神経細胞はほぼ完全に形態学的に細胞死を起こしていた。また，コントロール側に比べて虚血・再灌流側では再灌流3時間後まではINLでのGLAST mRNAの発現に変化はないが，再灌流24時間後，48時間後にはその発現がそれぞれ約1.5倍（150.0±15.5%；mean±S.D.），約2倍（212.7±32.4%；mean±S.D.）にまで増加し，7日後にはほぼコントロールレベルに回復していた。

【総括】

今回の結果からGLAST mRNAは網膜では主にグリア細胞（ミュラー細胞，アストロサイト）に発現していることが示唆された。その理由としては1）網膜におけるGLAST mRNA発現細胞の分布がGFAP陽性細胞およびGFAP mRNA発現細胞のそれに非常に類似しており，特に視神経乳頭部では約90%の細胞にGLAST mRNAの発現が認められ，この領域では90%以上の細胞がGFAP陽性であることから少なくともアストロサイトがGLAST mRNAを発現していることが明らかとなったこと，2）網膜虚血・再灌流モデルで再灌流48時間後には内顆粒層（ミュラー細胞の細胞体がある）の神経細胞が細胞死を起こしているにもかかわらず同領域のGLAST mRNAの発現が著明に増加していたこと，3）脳ではグリア細胞にGLAST mRNAの発現が見られること，が挙げられる。

網膜虚血・再灌流モデルでGLAST mRNAの発現が，形態学的に神経細胞死を起こし始める再灌流24時間後より増加していたことから，細胞外グルタミン酸濃度上昇を制御するためにGLAST遺伝子の発現が調節されている可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

脳神経細胞と同様に網膜神経細胞においても細胞外グルタミン酸濃度の一過性上昇により細胞死が起こることが明らかとなっている。また，近年細胞外グルタミン酸を細胞内に取り込む膜蛋白であるグルタミン酸トランスポーターと虚血疾患との関連が注目を浴びている。

本研究は，網膜中心動脈閉塞症に代表される網膜虚血疾患の病態を明らかにする目的でラット網膜虚血・再灌流モデルにおけるグルタミン酸トランスポーター（GLAST）遺伝子の変化を*in situ*ハイブリダイゼーション法を用いて検討したものである。その結果，GLAST遺伝子は正常網膜ではグリア細胞（アストロサイトおよびミュラー細胞）に局在しており，網膜虚血・再灌流モデルでは著明にその発現が増加することを明らかにした。この結果は脳虚血でも未だ明らかにされていない虚血・再灌流状態におけるグルタミン酸トランスポーターの重要性を示唆する価値ある知見であり，学位論文に値するものである。