

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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

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 1 1 6 5 5 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 の経時変化についても検討を加えた。

【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、12 μ m 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 -³⁵S] 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 (78.5 μ mm²) 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

錘型細胞に 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れ、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 ($150.0 \pm 15.5\%$; mean \pm S.D.), 約2倍 ($212.7 \pm 32.4\%$; mean \pm 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（ミューラー細胞、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（ミュー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ーラー細胞）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。