

|              |                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | Genistein, a Protein Tyrosine Kinase Inhibitor, Ameliorates Retinal Degeneration After Ischemia-Reperfusion Injury in Rat                                                                                                                                            |
| Author(s)    | 林, 篤志                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Citation     | 大阪大学, 1998, 博士論文                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Version Type |                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/41111">https://hdl.handle.net/11094/41111</a>                                                                                                                                                                                  |
| 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">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >大阪大学の博士論文について</a>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           | 林 志 篤                                                                                                                                                                          |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (医 学)                                                                                                                                                                      |
| 学 位 記 番 号     | 第 1 4 2 1 8 号                                                                                                                                                                  |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平 成 10 年 12 月 4 日                                                                                                                                                              |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第 4 条第 2 項該当                                                                                                                                                               |
| 学 位 論 文 名     | Genistein, a Protein Tyrosine Kinase Inhibitor, Ameliorates Retinal Degeneration After Ischemia-Reperfusion Injury in Rat<br>(チロシンキナーゼ阻害剤であるゲニスタインはラットにおける虚血-再灌流障害後の網膜変性を改善する) |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 田 野 保 雄<br>(副査)<br>教 授 遠 山 正 彌    教 授 福 田 淳                                                                                                                        |

## 論 文 内 容 の 要 旨

### (目的)

網膜虚血は糖尿病網膜症をはじめとする多くの網膜血管病変に合併する病態であり、網膜血管新生および網膜変性を生じるため、その視力予後は不良となる。網膜血管新生は、虚血に伴って増加する眼内血管新生因子によることが Michaelson によって提唱されて以来、飛躍的な研究の進歩により Vascular endothelial growth factor (VEGF) をはじめとする多くの血管新生因子が解明され、それらが互いに関与しながら血管新生を生じることが明らかにされている。また、これら血管新生因子の多くがチロシンキナーゼ活性を持つレセプターを介してその作用を発現することも明らかにされ、病的、生理的反応におけるチロシンキナーゼ経路の役割が注目されている。我々は、網膜虚血に伴う血管新生および網膜変性に対する新しい治療の可能性を検討するため、チロシンキナーゼ経路に着目し、網膜虚血においてチロシンキナーゼ経路が活性化されるかどうか、チロシンキナーゼ経路のどの細胞内情報伝達蛋白が活性化されるか、また、チロシンキナーゼ経路を抑制することで網膜虚血障害を軽減できるかどうかという点について、複数の網膜虚血モデルを用いて検討した。

### (方法)

#### 1) ラット網膜虚血-再灌流障害モデル

麻酔下にてラット視神経を露出した後、シルク糸にて視神経を結紮し、網膜血流を 2 時間遮断した。その後、シルク糸を開放し網膜血流を再開させた。血流再開後、経時的に眼球を摘出し、網膜内蛋白質およびホスホチロシンの変化をウエスタンブロットおよび免疫組織化学を用いて検討した。また、主な血管新生因子である basic fibroblast growth factor (bFGF)、VEGF、platelet-derived growth factor (PDGF) の変化およびチロシンキナーゼ経路の細胞内情報伝達蛋白のチロシンリン酸化を免疫沈降法およびウエスタンブロットを用いて検討した。

#### 2) ネコ網膜静脈閉塞症モデル

ネコ網膜静脈を経硝子体的にジアテルミーを用いて凝固、閉塞させ網膜静脈閉塞症を作成した。ラットと同様に、

経時的に網膜内蛋白質、ホスホチロシンおよび血管新生因子の変化、また、チロシンキナーゼ経路の細胞内情報伝達蛋白のチロシンリン酸化を免疫沈降法およびウェスタンブロットを用いて検討した。

### 3) チロシンキナーゼ阻害剤（ゲニスタイン）の網膜虚血障害に対する効果

ラット網膜虚血-再灌流障害モデルを用いて網膜虚血障害に対するゲニスタインの効果を検討した。虚血-再灌流障害の前後でゲニスタインを腹腔内投与し、再灌流開始48時間後および168時間後に網膜内蛋白質、ホスホチロシンの変化および組織学的変化を検討した。網膜内蛋白質の変化はウェスタンブロットを用い、組織学的変化は光学顕微鏡を用いて、切片上における網膜各層の厚みを測定し、統計学的に検討した。

### （成績）

#### 1) ラット網膜虚血-再灌流障害モデル

網膜虚血-再灌流障害により網膜内蛋白質では72 kDa バンドの増加およびホスホチロシンの著明な増加を再灌流開始48時間後に認めた。また、血管新生因子として、VEGF および PDGF-B chain の増加を認めたが、bFGF は減少した。再灌流開始48時間後には、チロシンキナーゼ経路の重要な細胞内情報伝達蛋白である mitogen-activated protein kinase (MAPK) のチロシンリン酸化が亢進していた。免疫組織化学では、虚血障害後の網膜において、網膜内層にホスホチロシンの強い免疫反応を認め、リン酸化 MAPK は、網膜内顆粒層に強い免疫反応を認めた。

#### 2) ネコ網膜静脈閉塞症モデル

ネコにおける網膜静脈閉塞症では、ラットにおける虚血-再灌流障害モデルと同様に、網膜静脈閉塞領域に72 kDa バンドの増加およびホスホチロシンの増加を認めた。また、網膜静脈閉塞領域に VEGF および bFGF の増加を認め、MAPK のチロシンリン酸化の亢進を認めた。

#### 3) ゲニスタインの網膜虚血障害に対する軽減効果

ラット網膜虚血-再灌流障害後の網膜内蛋白質の変化では、ゲニスタイン投与により再灌流開始48時間後にみられた72 kDa バンドの増加およびホスホチロシンの増加が抑制された。168時間後の網膜組織像において網膜各層の厚みを比較検討した結果、ゲニスタイン投与群では、網膜虚血後におこる網膜変性、萎縮が網膜内層において有意に抑制されていた。

### （総括）

チロシンキナーゼ経路は、網膜虚血に伴って網膜内で活性化される経路の一つであることが明らかになった。また、チロシンキナーゼ阻害剤であるゲニスタインの投与により網膜虚血障害が軽減されたことから、網膜虚血によって網膜内に増加するホスホチロシンは、網膜虚血に伴う神経細胞障害に関与している可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、眼科臨床において、視力予後に大きく関与している網膜虚血性疾患に対する治療を模索するため、動物モデルを用いて網膜虚血を作成し、網膜虚血の生化学的、組織学的変化を検討したものである。網膜虚血-再灌流障害により網膜内にホスホチロシンが増加すること、チロシンキナーゼ経路の細胞内情報伝達蛋白のチロシンリン酸化が網膜虚血により亢進すること、またチロシンキナーゼ阻害剤であるゲニスタインを投与することにより、網膜虚血によって誘導される蛋白レベルの変化が抑制され、虚血障害後に生じる網膜変性に対して変性抑制効果があることを明らかにしたことにより、今後、眼科臨床に応用していく新たな治療の可能性を開き、学位の授与に値すると考えられる。