



Title	Protctive Effect of Donepezil on Retinal Ganglion Cells <i>in Vitro</i> and <i>In Vivo</i>
Author(s)	三木, 篤也
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/46170">https://hdl.handle.net/11094/46170</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">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 三 木 篤 也

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 20151 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 18 年 3 月 24 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第1項該当

医学系研究科臓器制御医学専攻

学 位 論 文 名 Protective Effect of Donepezil on Retinal Ganglion Cells *In Vitro*  
and *In Vivo*  
(ドネペジルの網膜神経節細胞に対する培養細胞、生体レベルでの保護  
効果)

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 田 野 保 雄

(副査)

教 授 不 二 門 尚 教 授 遠 山 正 彌

## 論 文 内 容 の 要 旨

## [ 目的 ]

緑内障は、眼圧依存性に視神経、すなわち網膜神経節細胞 (RGC) の軸索が障害されることにより、視野障害をきたす疾患である。現在、緑内障に対する確実な治療法は眼圧下降のみである。しかし、最近になって、眼圧下降治療により進行を阻止できない緑内障症例が少なからず存在することが明らかとなり、眼圧下降治療に加えて神経保護治療の開発の必要性が注目されている。今回我々は、アルツハイマー病治療に用いられているアセチルコリンエステラーゼ阻害薬ドネペジルに着目した。ドネペジルは、大脳皮質細胞などの神経細胞に対して保護効果を示すことが最近報告されているが、RGC に対する保護効果についてはまだ報告がない。我々は、ラットの RGC 純粋培養系および視神経切断モデルを使用して、ドネペジルの RGC に対する神経保護効果を検討した。

## [ 方法ならびに成績 ]

生後 6-8 日の DA ラット眼球を摘出し、網膜を単離、酵素処理した後、two-step panning 法によって RGC を純粋化し、神経栄養因子 (BDNF、CNTF) を含む培地中で培養した。この培養系に対し、グルタミン酸 ( $25 \mu\text{M}$ ) を投与して 3 日間培養すると RGC 細胞死が生じた。(生存率: 対照の  $62.2 \pm 10.1\%$ , mean  $\pm$  SD)。ドネペジルの同時投与により、RGC 細胞死は濃度依存的に有意に抑制され、生存率は  $82.5 \pm 13.4\%$  ( $1 \mu\text{M}$ )、 $92.8 \pm 14.1\%$  ( $10 \mu\text{M}$ ) であった。また、この培養系から BDNF を除去して 3 日間培養すると細胞死が生じるが、ドネペジルの同時投与により、この細胞死も抑制され、 $10 \mu\text{M}$  では有意差を認めた。

次に、ドネペジルの神経保護の機序を求めるため、ドネペジルとアセチルコリン受容体 (AChR) 拮抗薬を同時投与し、神経保護効果に影響があるかを検討した。結果、ニコチン性 AChR 拮抗薬メカミラミンも、ムスカリン性 AChR 拮抗薬スコボラミンも、ドネペジルの神経保護効果に影響を及ぼさなかった。さらに、ドネペジルと同様のアセチルコリンエステラーゼ阻害薬であるタクリン、ガランタミンは、いずれも有意な RGC 保護効果は示さなかった。以上より、ドネペジルの神経保護効果は、アセチルコリンを介さないものである可能性が高いと考えられる。

次に、抗アポトーシス因子である bcl-2 の拮抗的阻害薬である HA14-1 をドネペジルと同時に投与し、その影響を調べた。 $30 \mu\text{M}$  の HA14-1 の同時投与により、 $1 \mu\text{M}$  ドネペジルによる RGC 保護効果はほぼ完全に抑制された。よ

って、ドネペジルの神経保護効果は、bcl-2によるアポトーシス抑制と関係していると考えられる。

更にドネペジルの生体レベルでの神経保護効果を確認するため、ラット視神経切断モデルを用いて検討した。生後8-12週齢の雌DAラット左眼の視神経を眼窩内で切断し、眼球側断端に蛍光トレーサーであるhydrobystillbamideを留置した。切断7日後に眼球を摘出し、網膜フラットマウント標本を作製し、網膜各象限について、視神経乳頭から1、2、3mm離れた $500 \times 500 \mu\text{m}$ の正方形の範囲内(全12箇所)に含まれる標識されたRGCを蛍光顕微鏡下で計測し、平均して $1 \text{mm}^2$ あたりの細胞数に換算した。視神経切断後3日間はRGC細胞死が起こらないため、切断3日後のサンプルを対照とした。

対照の生存RGC数は $2048.3 \pm 54.1/\text{mm}^2$ であったが、視神経切断7日後には生存RGC数は $1135.7 \pm 69.3/\text{mm}^2$ であり、約半数のRGCが細胞死を起こしたことがわかる。これに対して $5 \text{mg/kg}$ のドネペジル水溶液を一日二回経口投与すると、生存RGC数は $1330.4 \pm 66.0/\text{mm}^2$ と有意に増加した。同量の水のみを同じスケジュールで投与しても、生存細胞数には有意な変化は見られなかった。以上の結果から、ドネペジルは、経口投与によって、生体レベルでもRGCに対して神経保護効果を発揮することがわかった。

#### [ 総括 ]

ドネペジルは、ラット培養RGCにおいてグルタミン酸負荷および神経栄養因子除去による神経細胞死からRGCを保護した。その機序はアポトーシスの抑制によるものであり、従来から知られているアセチルコリンを介する経路とは異なる経路によるものであることが推察された。また、ドネペジルは、経口投与によってラット視神経切断によるRGC細胞死も有意に抑制した。以上の結果から、ドネペジルは、緑内障などのRGC細胞死を生じる眼疾患に対して、神経保護治療薬として臨床応用できる可能性があると考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

最近、緑内障の治療として、眼圧下降治療に加えて、網膜神経節細胞(RGC)に対する神経保護治療の必要性が叫ばれている。本研究では、アルツハイマー病治療薬ドネペジルのRGCに対する神経保護効果を、ラットRGC純粋培養系およびラット視神経切断モデルを用いて検討した。培養系においては、ドネペジルは、グルタミン酸投与、神経栄養因子(BDNF)除去による細胞死に対し、濃度依存的にRGCを保護した。その機序は、従来から知られているアセチルコリンエステラーゼ阻害作用によるものではなく、bcl-2を介する抗アポトーシス作用によるものと考えられた。また、 $5 \text{mg/kg}$ のドネペジル経口投与(一日二回)により、視神経切断によるRGC細胞死が27%抑制された。本研究は、ドネペジルのRGCに対する神経保護効果を始めて証明したものであり、経口投与によって神経保護効果を示したことから、緑内障などの眼疾患に対して臨床応用できる可能性が示された。よって、本研究は、学位の授与に値するものと考えられる。