

# 報告書

## 平成17年度海外留学補助金による研究経過・成果報告書

氏名： 関 正明

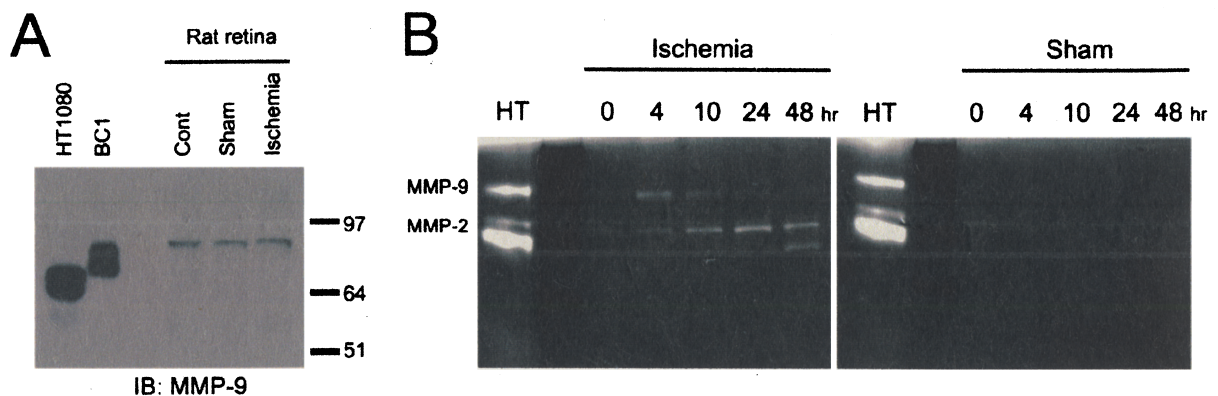
研究テーマ： マトリックスメタロプロテアーゼ-9 阻害剤による神経保護：  
視神経・網膜疾患への応用

### I. 網膜虚血再灌流モデルに対する matrix metalloproteinase (MMP)-9 阻害剤 SB-3CT の神経保護作用の解析

#### ● 網膜虚血再灌流モデルでの MMP-9 活性の局在解析

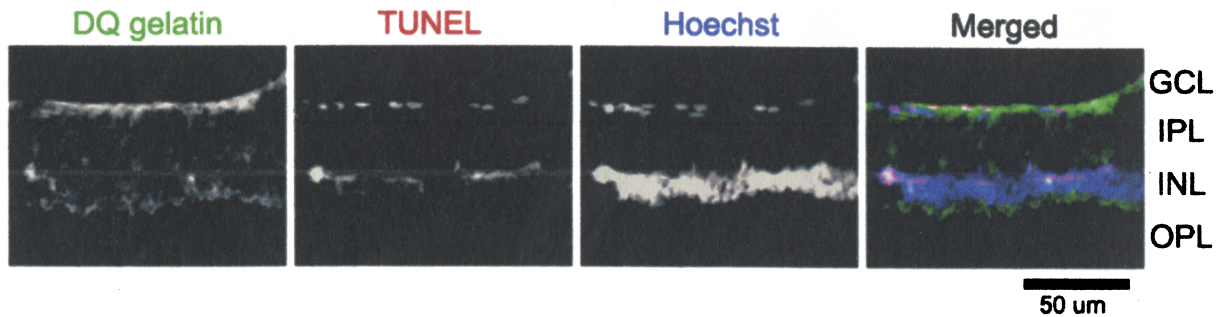
網膜虚血再灌流モデル網膜において、再灌流後4時間の早期より、タンパク量増加を伴わない MMP-9 活性の亢進を観察した (図 1A: MMP-9 のウェスタンブロッティング、B: gelatin zymography)。HT1080, BC1 細胞はポジティブコントロール。Ischemia 群は、1時間にわたって眼内圧を 100 mmHg まで上昇させ虚血を誘導した後、眼圧を下降させ再灌流を得た。Sham 群は眼内圧を 20 mmHg に維持した)。

図 1



組織学的解析により、gelatinase 活性は網膜内層とくに網膜神経節細胞層 (GCL) で強く、アポトーシスに陥っている細胞の分布と共局在した (図 2: 組織像。DQ-gelatin, gelatinase 活性, 緑; TUNEL, 赤; Hoechst, 青.)。

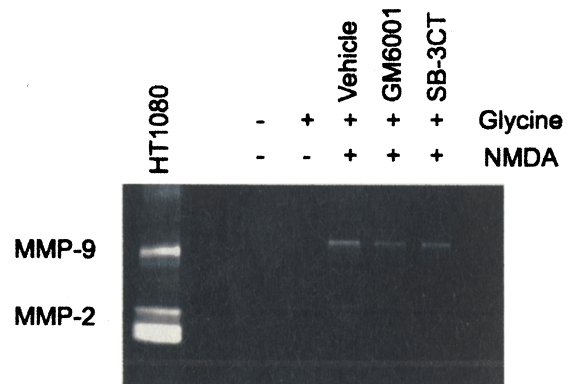
図 2



● 網膜虚血再灌流モデルに対する MMP-9 阻害剤 SB-3CT 眼内投与の網膜神経保護効果を解析

興奮性神経毒 NMDA 眼内注入後の網膜で、SB-3CT により MMP-9 活性が有意に抑制されることを明らかにした (図 3: gelatin zymography. HT1080 細胞はポジティブコントロール。GM6001, broad-spectrum MMP inhibitor; SB-3CT, gelatinase inhibitor)。

図 3



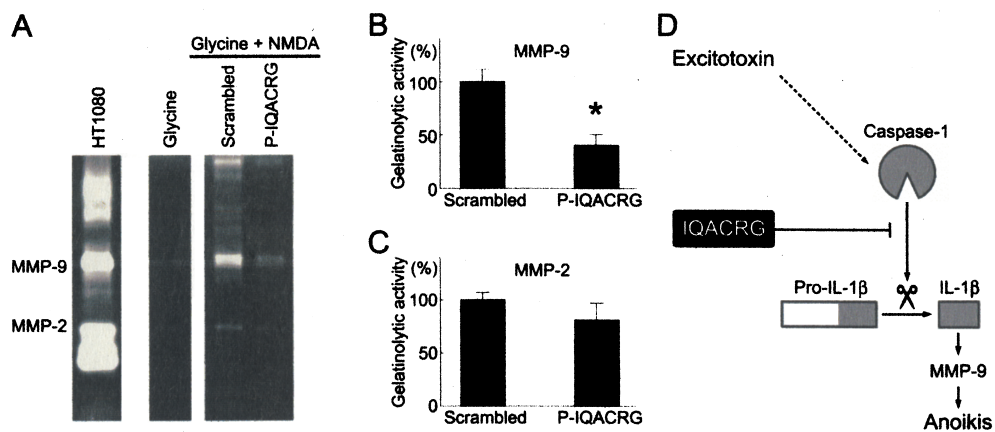
ごく最近、共同研究者 Mobashery 博士らのグループが SB-3CT の溶媒自体が神経保護作用を有する可能性を示唆している (Rosenberg GA. Brain Res, 2007; Sood R. J Magn Reson Imaging, 2007)。同グループによる溶媒の最適化が終了次第、ただちに網膜虚血再灌流モデルを用いて SB-3CT (あるいはその誘導体) の神経保護作用の有無を検討する計画である。

SB-3CT の最適化を待つ間に、代替薬として caspase の活性中心をミミックした合成ペプチド IQACRG (Troy. Proc Natl Acad Sci USA, 1996; Tennesi. J Neurochem, 1998) の網膜神経保護作用を検討した。

IQACRG は pseudoenzyme として、caspase-3 のみならず caspase-1 の活性を阻害する (Troy. Proc Natl Acad Sci USA, 1996)。したがって、図 4D に示すメカニズムにより、MMP-9 活性抑制作用を有すると考えている。事実、NMDA により誘導された網膜の MMP-9 活性は、IQACRG の同時投与により抑制された (図 4A, gelatin zymography. B, C はデンシトメトリーによる MMP-9 と MMP-2 の活性の

相対値。対照には6アミノ酸の scrambled peptide を用いた。D, 想定される IQACRG による MMP-9 活性抑制メカニズム。IL- $\beta$ , interleukin-1 $\beta$ .)。

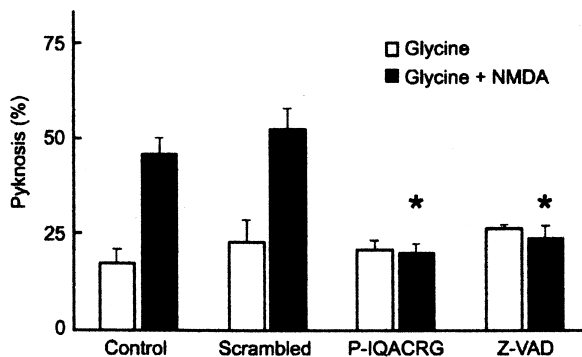
図 4



網膜神経節細胞の初代培養系において、IQACRG は NMDA による細胞毒性を抑制した (図 5. z-VAD, broad-spectrum caspase inhibitor)。

本データを北米神経科学会年次総会にて発表した (Neuroscience 2007)。

図 5



### ● 機能評価

当研究室に Multiple Electrode Array (MEA) が導入され、電気生理学的な機能解析を ex vivo で行うことが可能になった。導入後直ちに、網膜機能評価のためのシステムを構築。現在すでに網膜神経節細胞の自発性スパイク・光誘導性スパイクの検出が可能になっている。MEA システムを用いることで個々の網膜神経節細胞の活動を分離でき、当初予定していた網膜電位・視覚誘発電位測定に比較して、より詳細な機能評価が可能と考える。