

(続紙 1)

京都大学	博士 (薬学)	氏名	脇田 誓子
論文題目	中脳ドパミンニューロンの軸索伸長および線条体神経支配の制御因子に関する研究		
(論文内容の要旨)			
<p>パーキンソン病は中脳黒質-線条体系ドパミンニューロンの選択的脱落を特徴とする神経変性疾患である。パーキンソン病症状の本質的な回復には、ドパミンニューロンの軸索伸長およびシナプス形成を伴う線条体神経支配による神経投射の再構築が必要である。しかし、それらを詳細かつ簡便に解析できる評価系が存在しないために、神経投射再構築の機序の解明は十分になされていない。本研究において著者は、初代分散培養細胞を用いた中脳ドパミン神経軸索の伸長および線条体神経支配の定量的評価法を確立し、ドパミン神経軸索伸長および線条体神経支配に関与する因子について以下の新知見を得た。</p>			
第一章 ドパミン神経軸索伸長の定量法確立およびスタウロスポリンによるドパミン神経突起伸長の機序の解明			
<p>ラット胎仔由来中脳初代培養細胞を用いたドパミン神経突起伸長の定量法の確立を試みたところ、分散培養細胞においては、細胞密度が低いとドパミン神経突起伸長に影響を及ぼすため、細胞密度を下げずにドパミン神経突起を定量する必要がある。そこで、培養ディッシュ内のカバースリップ上にシリコン製隔離壁を配置し、その内側に中脳細胞を高密度で播種した。細胞接着後隔離壁を取り外し、中脳細胞領域を形成させた。培養12日後、ドパミン神経突起が中脳細胞領域の外側に伸展しており、より外側へ伸展したドパミン神経突起は軸索であった。中脳細胞領域の境界線からドパミン神経突起の先端までの距離をドパミン神経突起長として、軸索伸長を評価した。本評価系において、ドパミン神経突起伸長作用を有するグリア細胞株由来神経栄養因子を用い濃度依存的な伸長促進作用が定量できることを確認した。</p>			
<p>非特異的なプロテインキナーゼ阻害薬であるスタウロスポリンは著明な神経突起伸長作用を有することが知られているが、その詳細な機序は明らかではなく、また、中脳ドパミン神経突起に対する作用は検討されていない。本評価系において、スタウロスポリン (10日間処置) は、濃度依存的にドパミン神経突起伸長を促進した。さらに、種々のプロテインキナーゼの阻害薬を検討した結果、AMP依存性プロテインキナーゼ (AMPK) 阻害薬であるcompound Cがドパミン神経突起の伸長を促進した。スタウロスポリンは、compound Cと同様に、AMPKにより負に制御される下流エフェクターmTORを活性化した。また、mTOR阻害薬であるラパマイシンは、スタウロスポリンおよびcompound Cによるドパミン突起伸長促進作用を抑制した。Compound Cは、ドパミン神経毒である1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) によるドパミン神経突起</p>			

の伸長阻害作用に対しても抑制作用を発現した。以上の結果より、AMPK/mTOR経路がスタウロスポリンのドパミン神経突起伸長作用において重要な役割を果たすこと、さらに、AMPK阻害はMPP⁺による突起伸長阻害作用に対して有効であることが示された。

第二章 ドパミンニューロンによる線条体神経支配の定量法確立およびその機序解明

中脳ドパミンニューロンによる線条体神経支配を*in vitro*で再現するために、シリコン製隔離壁の内側に中脳細胞を、外側に線条体細胞を播種する培養法を確立した。細胞接着後隔離壁を除去し、両細胞領域を10日間対峙培養した。その結果、ドパミン神経軸索が線条体細胞の播種密度依存的に線条体細胞領域に伸展していること、および線条体ニューロンとのシナプス形成の存在を確認した。一方、隔離壁の外側にドパミンニューロンの本来の投射先ではない脊髓細胞を播種すると、ドパミン神経軸索は伸展しなかった。

ドパミンニューロンによる線条体神経支配には、液性因子および細胞間接着因子の関与が考えられる。しかし、線条体細胞の培養上清では、ドパミン神経突起伸長に影響を与えなかった。また、線条体由来アストロサイトを隔離壁外に播種し対峙培養したが、ドパミン神経突起は伸展しなかった。それに対して、線条体領域に伸展したドパミン神経軸索は線条体ニューロンに沿って伸長することを見出した。そこで、細胞間接着因子について検討したところ、インテグリン $\alpha 5\beta 1$ の阻害ペプチドおよび中和抗体によりドパミンニューロンによる線条体神経支配は抑制された。インテグリン $\alpha 5\beta 1$ は、ドパミンニューロンの細胞体および成長円錐において発現していた。また、そのリガンドであるフィブロネクチンを隔離壁外にコーティングするとドパミン神経突起伸長は促進した。以上の結果より、インテグリン $\alpha 5\beta 1$ を介してドパミンニューロンは線条体神経支配することが示された。

以上、著者は、分散培養細胞を用いた中脳ドパミン神経軸索伸長および線条体神経支配の定量法を確立し、AMPK/mTOR経路がドパミン神経軸索の伸長に関与すること、および、インテグリン $\alpha 5\beta 1$ がドパミンニューロンによる線条体神経支配に関与することを明らかにした。本研究の成果は、パーキンソン病における黒質-線条体ドパミン神経投射の再生治療に向け、有用な基礎的な知見を提供するものである。

(論文審査の結果の要旨)

パーキンソン病は中脳黒質-線条体系ドーパミンニューロンの選択的脱落を特徴とする神経変性疾患である。パーキンソン病症状の本質的な回復には、ドーパミンニューロンの軸索伸長およびシナプス形成を伴う線条体神経支配による神経投射の再構築が必要である。しかし、それらを詳細かつ簡便に解析できる評価系が存在しないために、神経投射再構築の機序の解明は十分になされていない。本研究において著者は、初代分散培養細胞を用いた中脳ドーパミン神経軸索の伸長および線条体神経支配の定量的評価法を確立し、ドーパミン神経軸索伸長および線条体神経支配に関与する因子について検討を行った。

ラット胎仔由来中脳初代培養細胞を用いたドーパミン神経突起伸長の定量法の確立を試みたところ、分散培養細胞においては、細胞密度が低いとドーパミン神経突起伸長に影響を及ぼすため、細胞密度を下げずにドーパミン神経突起を定量する必要がある。そこで、培養ディッシュ内のカバースリップ上にシリコン製隔離壁を配置し、その内側に中脳細胞を高密度で播種した。細胞接着後隔離壁を取り外し、中脳細胞領域を形成させた。培養12日後、ドーパミン神経突起が中脳細胞領域の外側に伸展しており、より外側へ伸展したドーパミン神経突起は軸索であった。中脳細胞領域の境界線からドーパミン神経突起の先端までの距離をドーパミン神経突起長として、軸索伸長を評価した。本評価系において、ドーパミン神経突起伸長作用を有するグリア細胞株由来神経栄養因子を用い濃度依存的な伸長促進作用が定量できることを確認した。

非特異的なプロテインキナーゼ阻害薬であるスタウロスポリンは著明な神経突起伸長作用を有することが知られているが、その詳細な機序は明らかではなく、また、中脳ドーパミン神経突起に対する作用は検討されていない。本評価系において、スタウロスポリン(10日間処置)は、濃度依存的にドーパミン神経突起伸長を促進した。さらに、種々のプロテインキナーゼの阻害薬を検討した結果、AMP依存性プロテインキナーゼ(AMPK)阻害薬であるcompound Cがドーパミン神経突起の伸長を促進した。スタウロスポリンは、compound Cと同様に、AMPKにより負に制御される下流エフェクターmTORを活性化した。また、mTOR阻害薬であるラパマイシンは、スタウロスポリンおよびcompound Cによるドーパミン突起伸長促進作用を抑制した。Compound Cは、ドーパミン神経毒である1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺)によるドーパミン神経突起の伸長阻害作用に対しても抑制作用を発現した。以上の結果より、AMPK/mTOR経路がスタウロスポリンのドーパミン神経突起伸長作用において重要な役割を果たすこと、さらに、AMPK阻害はMPP⁺による突起伸長阻害作用に対して有効であることが示された。

中脳ドーパミンニューロンによる線条体神経支配を*in vitro*で再現するために、シリコン製隔離壁の内側に中脳細胞を、外側に線条体細胞を播種する培養法を確立した。細胞接着後隔離壁を除去し、両細胞領域を10日間対峙培養した。その結果、ドーパミン神経軸索が線条体細胞の播種密度依存的に線条体細胞領域に伸展していること、および線条体ニューロンとのシナプス形成の存在を確認した。一方、隔離壁の外側にドーパミンニューロンの本来の投射先ではない脊髄細胞を播種すると、ドーパミン神経軸索は伸展しなかつ

た。

ドパミンニューロンによる線条体神経支配には、液性因子および細胞間接着因子の関与が考えられる。しかし、線条体細胞の培養上清では、ドパミン神経突起伸長に影響を与えなかった。また、線条体由来アストロサイトを隔離壁外に播種し対峙培養したが、ドパミン神経突起は伸展しなかった。それに対して、線条体領域に伸展したドパミン神経軸索は線条体ニューロンに沿って伸長することを見出した。そこで、細胞間接着因子について検討したところ、インテグリン $\alpha 5\beta 1$ の阻害ペプチドおよび中和抗体によりドパミンニューロンによる線条体神経支配は抑制された。インテグリン $\alpha 5\beta 1$ は、ドパミンニューロンの細胞体および成長円錐において発現していた。また、そのリガンドであるフィブロネクチンを隔離壁外にコーティングするとドパミン神経突起伸長は促進した。以上の結果より、インテグリン $\alpha 5\beta 1$ を介してドパミンニューロンは線条体神経支配することが示された。

以上、分散培養細胞を用いた中脳ドパミン神経軸索伸長および線条体神経支配の定量法を確立し、AMPK/mTOR経路がドパミン神経軸索の伸長に関与すること、および、インテグリン $\alpha 5\beta 1$ がドパミンニューロンによる線条体神経支配に関与することを明らかにした。本研究の成果は、パーキンソン病における黒質-線条体ドパミン神経投射の再生治療に向け、有用な基礎的な知見を提供するものである。

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成25年2月25日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 平成 年 月 日以降