

(続紙 1)

京都大学	博士 (薬学)	氏名	大西 正俊
論文題目	出血性脳障害におけるミクログリアおよびMAPキナーゼ経路の役割に関する研究		
(論文内容の要旨)			
<p>脳内出血は、高血圧などの原因により脳血管が破綻し、脳実質へ出血した病態をいう。漏出する血液中の種々の因子の中でも、血液凝固に関わるトロンビンへの大量曝露が出血性脳障害の病理形成に深く関与することが示唆されているが、その詳細な機序については不明な点が多く残されている。そこで本研究では、トロンビンを介する出血性脳障害の病理形成機序ならびにその制御系に関する研究を進め、以下の新知見を得た。</p>			
<u>第一章 出血性脳障害におけるトロンビンおよびMAPキナーゼ経路の関与</u>			
<p>大脳皮質-線条体切片培養系において、トロンビン誘発線条体障害に新規タンパク質合成を介したアポトーシス性の細胞死誘導やmitogen-activated protein (MAP)キナーゼファミリー (ERK, p38 MAPK, JNK)の関与が明らかにされてきたが、実際の脳内出血時において同様の機序が働いているかは不明であった。そこで、脳内出血好発部位である線条体へコラゲナーゼを微量投与することにより作成したラットin vivo脳内出血モデルにおいて、出血によって誘発される線条体障害の機序を解析した。出血に伴う線条体ニューロンの顕著な脱落は、トロンビン阻害薬あるいはMAPキナーゼ阻害薬によって抑制された。出血後のアポトーシス性の細胞死誘導はニューロンにのみ認められたが、MAPキナーゼ阻害薬を投与するとミクログリアにもアポトーシスが誘導され、ミクログリア数が減少する傾向も観察された。以上の結果から、MAPキナーゼの活性化が、ニューロンに対して障害性に働くミクログリアの生存維持を介して、出血後の線条体ニューロンの脱落に寄与している可能性が示された。</p>			
<u>第二章 トロンビン誘発活性化ミクログリアにおけるMAPキナーゼ経路の役割</u>			
<p>トロンビン誘発線条体障害におけるMAPキナーゼ経路の関与について、ラット新生仔由来大脳皮質-線条体切片培養系を用いてさらに詳細な解析を行った。トロンビンによって線条体細胞にcaspase-3依存的なアポトーシスが惹起され、caspase-3阻害薬およびアポトーシス性死細胞の貪食阻害薬は共に線条体萎縮を抑制した。In vivoで示されたMAPキナーゼ阻害による線条体ミクログリアのアポトーシス誘導は切片培養系においても同様に観察されたが、このアポトーシスはcaspase-3に非依存的であった。また、トロンビン処置後に線条体ミクログ</p>			

リアにおいてp38 MAPKを介したheme oxygenase (HO)-1の誘導が認められ、HO-1阻害薬存在下でのトロンビン処置はミクログリアにアポトーシスを惹起した。さらに、MAPキナーゼ阻害薬はトロンビン処置により誘発される培養切片からのTNF- α の遊離を抑制し、TNF- α の中和抗体はトロンビンによる線条体細胞のアポトーシス誘導および線条体組織の萎縮を抑制した。以上の結果から、MAPキナーゼ経路は、TNF- α 産生の上流に位置し、さらに、アポトーシス性死細胞の貪食を行う活性化ミクログリアの生存を維持することにより、トロンビン誘発線条体障害に寄与することが示唆された。また、MAPキナーゼファミリーのうちp38 MAPKは、線条体ミクログリアにおいてHO-1を誘導することにより、その生存を維持している可能性が示された。

第三章 ニコチン受容体刺激による出血性脳障害の制御

ミクログリアの活性化を制御する内在性因子として、ニコチン性アセチルコリン系に着目し、トロンビン誘発障害に対するニコチンの作用を解析した。大脳皮質-線条体切片培養系において、ニコチン受容体の長期刺激はトロンビンによるミクログリア活性化を抑制し、線条体組織萎縮に対しても抑制作用を示した。これらの保護作用は、ニコチン性 $\alpha 7$ 受容体阻害薬および $\alpha 4\beta 2$ 受容体阻害薬によって抑制された。これらの結果は、ニコチン受容体を介するシグナル伝達機構が脳内出血の治療ターゲットとなる可能性を示唆するものである。

以上、著者は、トロンビンの介在する出血性脳障害における活性化ミクログリアの関与を示し、特にMAPキナーゼシグナル経路がミクログリアの生存維持を介して脳組織障害を進展させる要因となることを初めて明らかにした。また、薬物によるミクログリアの活性化の制御が脳組織障害を軽減しうることも示した。本研究の成果は、脳内出血に対する新たな治療薬の開発に資する重要な基礎的知見を提供するものである。

(論文審査の結果の要旨)

脳内出血は、高血圧などの原因により脳血管が破綻し、脳実質へ出血した病態をいう。漏出する血液中の種々の因子の中でも、血液凝固に関わるトロンビンへの大量曝露が出血性脳障害の病理形成に深く関与することが示唆されているが、その詳細な機序については不明な点が多く残されている。そこで申請者は、トロンビンを介する出血性脳障害の病理形成機序ならびにその制御系に関する研究を進め、以下の新知見を得た。

第一章 出血性脳障害におけるトロンビンおよびMAPキナーゼ経路の関与

大脳皮質-線条体切片培養系において、トロンビン誘発線条体障害に新規タンパク質合成を介したアポトーシス性の細胞死誘導やmitogen-activated protein(MAP)キナーゼファミリー (ERK, p38 MAPK, JNK)の関与が明らかにされてきたが、実際の脳内出血時において同様の機序が働いているかは不明であった。そこで、脳内出血好発部位である線条体へコラゲナーゼを微量投与することにより作成したラット *in vivo* 脳内出血モデルにおいて、出血によって誘発される線条体障害の機序を解析した。出血に伴う線条体ニューロンの顕著な脱落は、トロンビン阻害薬あるいはMAPキナーゼ阻害薬によって抑制された。出血後のアポトーシス性の細胞死誘導はニューロンにのみ認められたが、MAPキナーゼ阻害薬を投与するとミクログリアにもアポトーシスが誘導され、ミクログリア数が減少する傾向も観察された。以上の結果から、MAPキナーゼの活性化が、ニューロンに対して障害性に働くミクログリアの生存維持を介して、出血後の線条体ニューロンの脱落に寄与している可能性が示された。

第二章 トロンビン誘発活性化ミクログリアにおけるMAPキナーゼ経路の役割

トロンビン誘発線条体障害におけるMAPキナーゼ経路の関与について、ラット新生仔由来大脳皮質-線条体切片培養系を用いてさらに詳細な解析を行った。トロンビンによって線条体細胞にcaspase-3依存的なアポトーシスが惹起され、caspase-3阻害薬およびアポトーシス性死細胞の貪食阻害薬は共に線条体萎縮を抑制した。In vivoで示されたMAPキナーゼ阻害による線条体ミクログリアのアポトーシス誘導は切片培養系においても同様に観察されたが、このアポトーシスはcaspase-3に非依存的であった。また、トロンビン処置後に線条体ミクログリアにおいてp38 MAPKを介したheme oxygenase (HO)-1の誘導が認められ、HO-1阻害薬存在下でのトロンビン処置はミクログリアにアポトーシスを惹起した。さらに、MAPキナーゼ阻害薬はトロンビン処置により誘発される培養切片からのTNF- α の遊離を抑制し、TNF- α の中和抗体はトロンビンによる線条体細胞のアポトーシス誘導および線条体組織の萎

縮を抑制した。以上の結果から、MAPキナーゼ経路は、TNF- α 産生の上流に位置し、アポトーシス性死細胞の貪食を行う活性化ミクログリアの生存を維持することによりトロンビン誘発線条体障害に寄与することが示唆された。さらに、MAPキナーゼファミリーのうちp38 MAPKは、線条体ミクログリアにおいてH0-1を誘導することにより、その生存を維持している可能性が示された。

第三章 ニコチン受容体刺激による出血性脳障害の制御

ミクログリアの活性化を制御する内在性因子として、ニコチン性アセチルコリン系に着目し、トロンビン誘発障害に対するニコチンの作用を解析した。大脳皮質-線条体切片培養系において、ニコチン受容体の長期刺激はトロンビンによるミクログリア活性化を抑制し、線条体組織萎縮に対しても抑制作用を示した。これらの保護作用は、ニコチン性 $\alpha 7$ 受容体阻害薬および $\alpha 4\beta 2$ 受容体阻害薬によって抑制された。これらの結果は、ニコチン受容体を介するシグナル伝達機構が脳内出血の治療ターゲットとなる可能性を示唆するものである。

以上、申請者は、トロンビンの介在する出血性脳障害における活性化ミクログリアの関与を示し、特にMAPキナーゼシグナル経路がミクログリアの生存維持を介して脳組織障害を進展させる要因となることを初めて明らかにした。また、薬物によるミクログリアの活性化の制御が脳組織障害を軽減しうることも示した。本研究の成果は、脳内出血に対する新たな治療薬の開発に資する重要な基礎的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22年2月23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