

(論文内容の要旨)

中枢神経系は、神経細胞に加え、アストロサイトやミクログリアなどのグリア細胞によって構成されている。脳虚血や頭部外傷などの神経細胞傷害時には、グリア細胞は著しく活性化し、種々のサイトカイン/ケモカイン類の産生が亢進する。これら産生誘導されたサイトカイン/ケモカイン類が細胞傷害の増悪あるいは修復に関わることを示唆する多くの報告がある一方で、神経細胞傷害時のグリア細胞活性化機構については未だ不明な点が多い。そこで本研究では、神経細胞傷害時のグリア細胞活性化機構の解明を目的として、ケモカイン産生誘導に着目して検討を行い、以下の新知見を得た。

第一章 NMDA 誘発神経細胞傷害によるアストロサイトでの MCP-1 および CINC-1 産生誘導

ラット大脳皮質線条体領域から作製した脳スライス培養を NMDA で処置したところ、monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) および cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC-1) の一過性の mRNA 発現上昇が認められた。また、NMDA 処置後の MCP-1 および CINC-1 の培地中濃度は、対照群と比較して有意に高かった。神経細胞傷害と MCP-1 産生に対する NMDA 濃度依存性を調べたところ、細胞傷害の程度と MCP-1 産生量は、ほぼパラレルな関係にあることが示された。免疫二重染色による検討の結果、MCP-1 および CINC-1 陽性細胞はともに、主として GFAP 陽性アストロサイトであった。さらに、MCP-1 および CINC-1 の産生亢進は、アストロサイトやミクログリアの単離分散培養細胞系では認められなかった。また、神経細胞を選択的に除去した脳スライス培養系においても、NMDA 処置による MCP-1 あるいは CINC-1 の産生はほとんど認められなかった。これらのことから、NMDA によるアストロサイトでの MCP-1 および CINC-1 の産生誘導は、NMDA が直接アストロサイトに作用するのではなく、神経細胞傷害を介したものであることが示唆された。

第二章 ATP γ S による MCP-1 産生誘導とその細胞内情報伝達機構

細胞内において「エネルギー通貨」の役割を担っている ATP は、近年、細胞外においても神経伝達物質・神経調節物質としてはたらくことが明らかにされてきた。また、脳傷害時には、傷害を受けた細胞からの遊離・漏出によって、細胞外 ATP 濃度は著しく上昇する。そこで、本章では、細胞間情報伝達の担い手としての ATP に着目し、脳スライス培養系での ATP あるいはその加水分解抵抗性アナログ ATP γ S による MCP-1 産生誘導に関して検討した。ATP および ATP γ S はともに、処置後 3-4 時間をピークとして一過性に MCP-1 の産生を誘導した。ATP γ S による MCP-1 産生は、2 時間後までは主としてミクログリアで、その後は主にアストロサイトにおいて観察された。細胞内情報伝達を MAP キナーゼに着目して検討したところ、ATP γ S による MCP-1 産生は、MEK 阻害薬 PD98059 および U0126 により有意に抑制された。また、ATP γ S 処置によって ERK のリン酸化が亢進した。JNK 阻害薬 SP600125 によっても部分的な MCP-1 産生抑制が認められた。一方、p38 MAP キナーゼ阻害薬 SB203580 により 27 時間後の培地中 MCP-1 量は有意に増加した。ATP γ S 処置後の MCP-1 産生を経時的に検討した結果、SB203580 存在

下では、非存在下と比較して MCP-1 産生がより長時間にわたり持続することが明らかとなった。以上より、脳スライス培養系での ATP γ S による MCP-1 産生誘導は、ERK および p38 MAP キナーゼによって相反的に調節されていることが示された。

第三章 NMDA 誘発 MCP-1 産生誘導における細胞内情報伝達機構

第二章で、MCP-1 産生誘導における MAP キナーゼの重要性を示す結果が得られたことから、本章では、NMDA による神経細胞傷害時の MCP-1 産生への MAP キナーゼの関与について検討した。NMDA による MCP-1 産生は、PD98059 および U0126 により有意に抑制され、SP600125 によっても部分的に抑制された。MEK-ERK 系の活性化をリン酸化 ERK に対する免疫染色で確認したところ、NMDA 処置 5 分後には、神経細胞のみに強い ERK のリン酸化が認められた。代わって、30 分以降ではアストロサイト特異的に持続的な ERK のリン酸化が観察され、27 時間後においても処置前よりも高いレベルを維持していた。神経細胞での ERK リン酸化が認められる時間帯のみ U0126 を添加し、神経細胞での ERK リン酸化を抑制しても、27 時間後での培地中 MCP-1 量に変化はみられなかった。一方、アストロサイトにおける持続的な ERK の活性化を抑制するため、NMDA 処置 3 時間後から U0126 を添加したとき、27 時間後での培地中 MCP-1 量は処置前から加えた場合と同程度まで抑制された。さらに、15 時間後から添加した場合でも、27 時間後での培地中 MCP-1 量は部分的ではあるものの有意に減少した。以上より、NMDA によるアストロサイトでの MCP-1 産生誘導には、神経細胞で起こる一過性の ERK 活性化は必要ではなく、アストロサイトでの持続的な ERK 活性化が重要であることが示唆された。

以上、著者は、脳スライス培養系において、神経細胞傷害時にアストロサイトでケモカイン MCP-1 および CINC-1 の産生が惹起されること、また、その MCP-1 産生誘導には、アストロサイトでの MEK-ERK 系の持続的な活性化が重要であることを見出した。本研究成果は、ケモカイン産生調節機構の解明を通して、神経細胞傷害時のアストロサイト活性化機構の一端を明らかにしたものであり、ケモカイン産生亢進がその病態に関係することが考えられる脳虚血や頭部外傷などの疾患の病態解明、ならびにアストロサイト活性化制御を機序とする新たな治療薬の創製のための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)

本論文は、神経細胞傷害時のグリア細胞活性化機構の解明を目的として、ケモカイン産生誘導に着目して検討を行い、以下の新知見を得た。

まず、ラット大脳皮質線条体領域から作製した脳スライス培養を NMDA で処置したところ、monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) および cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC-1) の一過性の mRNA 発現上昇が認められた。また、NMDA 処置後の MCP-1 および CINC-1 の培地中濃度は、対照群と比較して有意に高かった。神経細胞傷害と MCP-1 産生に対する NMDA 濃度依存性を調べたところ、細胞傷害の程度と MCP-1 産生量は、ほぼパラレルな関係にあることが示された。免疫二重染色による検討の結果、MCP-1 および CINC-1 陽性細胞はともに、主として GFAP 陽性アストロサイトであった。これらのことから、NMDA によるアストロサイトでの MCP-1 および CINC-1 の産生誘導は、NMDA が直接アストロサイトに作用するのではなく、神経細胞傷害を介したものであることが示唆された。

次に、細胞間情報伝達の担い手としての ATP に着目し、脳スライス培養系での ATP あるいはその加水分解抵抗性アナログ ATP γ S による MCP-1 産生誘導に関して検討した。ATP および ATP γ S はともに、処置後 3-4 時間をピークとして一過性に MCP-1 の産生を誘導した。ATP γ S による MCP-1 産生は、2 時間後までは主としてミクログリアで、その後は主にアストロサイトにおいて観察された。細胞内情報伝達を MAP キナーゼに着目して検討したところ、ATP γ S による MCP-1 産生は、MEK 阻害薬 PD98059 および U0126 により有意に抑制された。また、ATP γ S 処置によって ERK のリン酸化が亢進した。JNK 阻害薬 SP600125 によっても部分的な MCP-1 産生抑制が認められた。一方、p38 MAP キナーゼ阻害薬 SB203580 により 27 時間後の培地中 MCP-1 量は有意に増加した。ATP γ S 処置後の MCP-1 産生を経時的に検討した結果、SB203580 存在下では、非存在下と比較して MCP-1 産生がより長時間にわたり持続することが明らかとなった。以上より、脳スライス培養系での ATP γ S による MCP-1 産生誘導は、ERK および p38 MAP キナーゼによって相反的に調節されていることが示された。

最後に、NMDA による神経細胞傷害時の MCP-1 産生への MAP キナーゼの関与について検討した。NMDA による MCP-1 産生は、PD98059 および U0126 により有意に抑制され、SP600125 によっても部分的に抑制された。MEK-ERK 系の活性化をリン酸化 ERK に対する免疫染色で確認したところ、NMDA 処置 5 分後には、神経細胞のみに強い ERK のリン酸化が認められた。代わって、30 分以降ではアストロサイト特異的に持続的な ERK のリン酸化が観察され、27 時間後においても処置前よりも高いレベルを維持していた。神経細胞での ERK リン酸化が認められる時間帯のみ U0126 を添加し、神経細胞での ERK リン酸化を抑制しても、27 時間後での培

地中 MCP-1 量に変化はみられなかった。一方、アストロサイトにおける持続的な ERK の活性化を抑制するため、NMDA 処置 3 時間後から U0126 を添加したとき、27 時間後での培地中 MCP-1 量は処置前から加えた場合と同程度まで抑制された。さらに、15 時間後から添加した場合でも、27 時間後での培地中 MCP-1 量は部分的ではあるものの有意に減少した。以上より、NMDA によるアストロサイトでの MCP-1 産生誘導には、神経細胞で起こる一過性の ERK 活性化は必要ではなく、アストロサイトでの持続的な ERK 活性化が重要であることが示唆された。

以上、本論文は、脳スライス培養系において、神経細胞傷害時にアストロサイトでケモカイン MCP-1 および CINC-1 の産生が惹起されること、また、その MCP-1 産生誘導には、アストロサイトでの MEK-ERK 系の持続的な活性化が重要であることを見出した。本研究結果は、ケモカイン産生調節機構の解明を通して、神経細胞傷害時のアストロサイト活性化機構の一端を明らかにしたものであり、ケモカイン産生亢進がその病態に関係することが考えられる脳虚血や頭部外傷などの疾患の病態解明、ならびにアストロサイト活性化制御を機序とする新たな治療薬の創製のための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 21 年 3 月 24 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。