

氏名	おさかだ ふみ たか 小坂田 文 隆
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	薬博第622号
学位授与の日付	平成19年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	薬学研究科医療薬科学専攻
学位論文題目	線条体および網膜神経細胞の保護・再生を制御する因子に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 赤池昭紀 教授 金子周司 教授 佐治英郎

論文内容の要旨

パーキンソン病, ハンチントン病, 網膜色素変性などの難治性中枢神経疾患では, 疾患特異的な神経細胞の変性・脱落が起こり, その要因には酸化ストレスが重要な役割を果たすことが指摘されている。これらの神経変性を標的とした研究では, 神経保護や幹細胞による神経再生の試みがなされている。本研究において著者は, 酸化ストレスを制御する神経保護因子, および体性幹細胞および胚性幹(ES)細胞の分化・増殖制御による網膜再生に関する検討を行い, 以下の新知見を得た。

第一章 酸化ストレスを制御する神経保護因子

ウシ胎仔血清に由来する新規神経保護物質であるセロフェンド酸の作用機序を解明する目的で, セロフェンド酸の化学構造中に存在する, ラジカル除去作用を有するジメチルスルホキシド(DMSO)構造に着目した。ラット胎仔由来培養線条体細胞を H_2O_2 あるいは paraquat で処置したところ, 著明な神経毒性が発現し, その作用は-OHの産生が関与していた。セロフェンド酸および高濃度のDMSOは H_2O_2 および paraquat の毒性を抑制した。ESR解析において, セロフェンド酸およびDMSOは同程度の-OH除去作用を示した。以上の結果より, セロフェンド酸の保護作用の一部は-OH除去作用によること, その-OH除去作用はセロフェンド酸のDMSO構造部分が寄与することが示唆された。

次いで, 天然物由来の抗酸化物質としてビタミンE類縁体に着目し, H_2O_2 毒性に対する作用を検討した。その結果, ヤシ油由来のビタミンE製剤のTocomin 50%は H_2O_2 毒性を顕著に抑制した。Tocomin 50%中には α -tocopherol および α -, γ -, δ -tocotrienol が含まれることから, それらの H_2O_2 毒性に対する作用を検討した。 α -Tocopherol は H_2O_2 毒性に対して影響を与えなかったが, HPLCにより分離・精製した α -, γ -, δ -tocotrienol はいずれも H_2O_2 毒性を抑制した。グルタチオン合成を阻害する L-buthionine-[S, R]-sulfoximine はアポトーシスに特徴的な TUNEL 陽性細胞数を増加させ, いずれの tocotrienol 類もその TUNEL 陽性細胞数の増加を抑制した。非特異的なプロテインキナーゼ阻害薬である staurosporine はアポトーシスに特徴的な核の形態変化, TUNEL 陽性細胞数の増加, および細胞生存率の低下を引き起こした。Tocotrienol 類の中で α -tocotrienol のみが staurosporine によるアポトーシスを抑制した。以上の結果より, ビタミンE類縁体の中で α -tocotrienol が最も強い神経保護作用を示し, その作用には抗酸化作用に加えて抗アポトーシス作用が関与すると結論される。

第二章 内在性神経前駆細胞による成体網膜の再生機構

傷害後の神経組織の再生機構を解明する目的で, 成熟ラットの摘出網膜における前駆細胞の増殖・分化制御因子の解析を行った。摘出による傷害を受けた成体網膜において, 内顆粒層に分裂細胞(BrdU+細胞)が観察された。胎仔期に神経発生を制御することが知られているサイトカインの一種の Wnt3a を投与すると, 内顆粒層において BrdU+細胞数が増加し, それら BrdU+細胞はミューラーグリアのマーカーである glutamine synthetase 陽性であった。さらに, Wnt3a の投与により, 神経前駆細胞のマーカーである nestin+細胞数および網膜前駆細胞数が増加した。網膜の傷害後, Wnt/ β -catenin シグナルの活性化および cyclin D1 の発現上昇が観察され, Wnt3a の投与によりそれらは亢進した。一方, Wnt シグナルの

阻害により、BrdU+細胞数および網膜前駆細胞数が減少した。Wnt3a の処置後7日目では、BrdU+細胞は外顆粒層に遊走し、retinoic acid の添加により視細胞に分化した。Glycogen synthetase kinase-3 β 阻害薬である SB-216763 は Wnt の作用と同様の作用を示した。これらの Wnt の作用は網膜変性モデルマウスにおいても観察された。以上の結果より、網膜傷害により分裂したミューラーグリアが網膜前駆細胞に脱分化し、Wnt3a が網膜前駆細胞の増加を引き起こし、その結果、外顆粒層への遊走、視細胞への分化を促進することが明らかになった。さらに、網膜傷害後の修復機構に Wnt シグナルが重要な役割を果たすことが示唆された。

第三章 サルおよびヒト ES 細胞から網膜細胞への分化制御

サル ES 細胞の網膜前駆細胞への分化誘導法を検討した結果、ES 細胞を Wnt シグナルの阻害薬および Nodal シグナルの阻害薬存在下で浮遊培養し、その後接着培養する分化処置 (SFEB/DL) を行うことにより、網膜前駆細胞への効率的な誘導に成功した。分化40日目に多角形状の色素を持った細胞が多数観察された。分化90日目には、それら色素細胞において多角形状に actin の束が観察され、さらに網膜色素上皮細胞マーカーである RPE-65 およびグライコジャンクションマーカーである ZO-1 の発現が認められた。分化90日目から retinoic acid, taurine, N2 supplement (RA/T/N2) を添加したところ、視細胞前駆細胞および視細胞が観察された。ヒト ES 細胞においても SFEB/DL 処置により網膜前駆細胞への分化が確認された。さらに、多角形状の色素を有する細胞が観察され、それら色素細胞は電子顕微鏡により網膜色素上皮細胞に特有の構造を有していることが明らかになった。次に、ヒト ES 細胞を SFEB/DL + RA/T/N2 処置したところ、視細胞前駆細胞および視細胞が観察された。以上の結果より、霊長類 ES 細胞は SFEB/DL 処置により網膜色素上皮細胞に、SFEB/DL + RA/T/N2 処置により視細胞に分化することが示された。ES 細胞から視細胞への分化制御方法はこれまでに成功例がなく、本方法は細胞移植による網膜の再生治療の実現化を大きく前進させるものである。

以上、著者はセロフェンド酸およびビタミン E 類縁体の酸化ストレスに対する神経保護作用、および Wnt シグナルによる成体網膜の内在性修復機構、霊長類 ES 細胞からの網膜細胞への分化制御機構を明らかにした。本研究の成果は、難治性神経変性疾患の予防・治療薬の開発、および幹細胞を用いた神経再生治療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

パーキンソン病、ハンチントン病、網膜色素変性などの難治性中枢神経疾患では、疾患特異的な神経細胞の変性・脱落が起こり、その要因には酸化ストレスが重要な役割を果たすことが指摘されている。これらの神経変性を標的とした研究では、神経保護や幹細胞による神経再生の試みがなされている。本研究において申請者は、酸化ストレスを制御する神経保護因子、および体性幹細胞および胚性幹 (ES) 細胞の分化・増殖制御による網膜再生に関する検討を行い、以下の新知見を得た。

第一章 酸化ストレスを制御する神経保護因子

ウシ胎仔血清に由来神経保護物質のロフェンド酸の作用機序を解明する目的で、培養線条体細胞を用いた検討を行った。セロフェンド酸および高濃度のジメチルスルホキシド (DMSO) は H₂O₂ および paraquat の毒性を抑制した。ESR 解析においてセロフェンド酸および DMSO は同程度の -OH 除去作用を示した。これらの結果より、セロフェンド酸の保護作用の一部は -OH 除去作用によること、その -OH 除去作用にはセロフェンド酸の DMSO 構造部分が寄与することが示された。次いで、天然物由来の抗酸化物質としてビタミン E 類縁体に着目し、H₂O₂ 毒性に対する作用を検討し、ヤシ油由来のビタミン E 製剤の Tocomin 50% が神経保護作用を発現すること、Tocomin 50% 中に含まれるビタミン E 類縁体のうち、 α -Tocopherol は H₂O₂ 毒性に対して影響を与えず、 α -、 γ -、 δ -tocotrienol が H₂O₂ 毒性を抑制することを見出した。グルタチオン合成を阻害することによりアポトーシスに特徴的な TUNEL 陽性細胞数が増加し、tocotrienol 類により抑制された。非特異プロテインキナーゼ阻害薬である staurosporine はニューロンのアポトーシスを誘発し、tocotrienol 類の中で α -tocotrienol のみが staurosporine 誘発アポトーシスを抑制した。以上の結果より、ビタミン E 類縁体の中で α -tocotrienol が最も強い神経保護作用を示し、その作用には抗酸化作用に加え抗アポトーシス作用が関与すると結論される。

第二章 内在性神経前駆細胞による成体網膜の再生機構

傷害後の神経組織の再生機構を解明する目的で、成熟ラットの摘出網膜における前駆細胞の増殖・分化制御因子の解析を

行った。摘出による傷害を受けた成体網膜において、内顆粒層に分裂細胞（BrdU+細胞）が観察され、Wnt3aを投与により、ミューラーグリアにおいてBrdU+細胞数が増加し、神経前駆細胞のマーカーであるnestin陽性細胞数および網膜前駆細胞数が増加した。網膜の傷害後、wnt/ β -cateninシグナルの活性化およびcyclin D1の発現上昇が観察され、Wnt3aの投与によりそれらは亢進した。一方、wntシグナルの阻害により、BrdU+細胞数および網膜前駆細胞数が減少した。Wnt3aの処置後7日目では、BrdU+細胞は外顆粒層に遊走し、retinoic acidの添加により視細胞に分化した。Glycogen synthase kinase-3 β 阻害薬であるSB-216763はWntの作用と同様の作用を示した。以上の結果より、網膜傷害により分裂したミューラーグリアが網膜前駆細胞に脱分化し、Wnt3aは網膜前駆細胞の増加を引き起こし、外顆粒層への遊走と視細胞への分化が促進することが明らかとなった。さらに、網膜傷害後の修復過程にWntシグナルが重要な役割を果たすことが示唆された。

第三章 サルおよびヒトES細胞から網膜細胞への分化制御

サルES細胞の網膜前駆細胞への分化誘導法を検討した結果、ES細胞をWntシグナルの阻害薬およびNodalシグナルの阻害薬存在下で浮遊培養し、その後接着培養する分化処置（SFEB/DL）を行うことにより、網膜前駆細胞への効率的な誘導に成功した。分化40日目に多角形状の色素を持った細胞が多数観察された。分化90日目には、それら色素細胞において多角形状にactinの束が観察され、さらに網膜色素上皮細胞マーカーであるRPE-65およびタイトジャンクションマーカーであるZO-1の発現が認められた。分化90日目からretinoic acid, taurine, N2 supplement（RA/T/N2）を添加したところ、視細胞前駆細胞および視細胞が観察された。ヒトES細胞においてもSFEB/DL処置により網膜前駆細胞への分化が確認された。さらに、多角形状の色素を有する細胞が観察され、それら色素細胞は電子顕微鏡により網膜色素上皮細胞に特有の構造を有していることが明らかになった。次に、ヒトES細胞をSFEB/DL+RA/T/N2処置したところ、視細胞前駆細胞および視細胞が観察された。以上の結果より、霊長類ES細胞はSFEB/DL処置により網膜色素上皮細胞に、SFEB/DL+RA/T/N2処置により視細胞に分化することが示された。ES細胞から視細胞への分化制御方法はこれまでに成功例がなく、本方法は細胞移植による網膜の再生治療の実現化を大きく前進させるものである。

以上、申請者はセロフェンド酸およびビタミンE類縁体の酸化的ストレスに対する神経保護作用、およびWntシグナルによる成体網膜の内在性修復機構、霊長類ES細胞からの網膜細胞への分化制御機構を明らかにした。本研究の成果は、難治性神経変性疾患の予防・治療薬の開発、および幹細胞を用いた神経再生治療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）の論文として価値あるものとして認める。

更に、平成19年2月20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。