

氏 名	きたむらようじ 北村陽二
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	論薬博第732号
学位授与の日付	平成18年7月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	脳虚血における亜鉛の挙動と神経細胞に対する作用に関する基礎的研究

論文調査委員 (主査) 教授 佐治英郎 教授 赤池昭紀 教授 金子周司

### 論 文 内 容 の 要 旨

脳において、亜鉛は酵素や遺伝子などに含まれる以外に、主にグルタミン酸作動性神経のシナプス小胞内にグルタミン酸と共に存在している。これまでに、グルタミン酸レセプターのひとつである *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) レセプターは亜鉛結合部位を持ち、亜鉛によって作用を抑制されることから、刺激によりシナプス間隙に放出された小胞内亜鉛はグルタミン酸による神経興奮に対して抑制的に働く可能性が報告されている。しかし、一方で、前脳虚血時には亜鉛が神経細胞死を引き起こす可能性も報告されている。このように、脳内、特に脳虚血時での亜鉛の挙動や作用については不明確な部分が多く、インビボにおいて濃度と関連づけて亜鉛の挙動や作用を検討した例はほとんどない。そこで著者は、脳虚血における亜鉛の挙動と神経細胞に及ぼす影響を、亜鉛の定量結果に基づいて検討することを計画した。

まず、培養神経細胞を用い、グルタミン酸誘発神経細胞死に対する亜鉛の影響を基礎的に検討した。その結果、亜鉛は50  $\mu$ M までは濃度依存的にグルタミン酸に誘発される  $Ca^{2+}$  流入及び神経細胞死を抑制した。しかし一方で、100  $\mu$ M 以上の濃度では、グルタミン酸誘発  $Ca^{2+}$  流入は抑制するが、細胞生存率を低下させ、亜鉛は高濃度になると神経細胞毒性を発揮することが示された。これらの結果から、亜鉛はグルタミン酸毒性に対し、濃度依存的に二つの作用を示すことを認めた。また、グルタミン酸と共に Ca-EDTA を添加すると、グルタミン酸に誘発される  $Ca^{2+}$  の流入がさらに増加し、細胞生存率がより低下した。この結果から、培養神経細胞においては、グルタミン酸添加の刺激によって、神経細胞保護作用を示す程度の小胞内亜鉛が放出されている可能性が示された。

次に、脳虚血モデル動物を用いて、インビボで脳内亜鉛濃度の変化を調べた。方法は、前脳虚血モデルとして四血管閉塞再灌流(4VO)モデルを用い、マイクロダイアリシス法により対象とする脳の部位での細胞外液を経時的に透析し、得られた透析外液中の亜鉛をフレームレス式の原子吸光光度計を用いて測定した。また、同時にグルタミン酸も HPLC を用いて測定した。その結果、亜鉛とグルタミン酸の経時的濃度変化が一致し、脳虚血時には小胞内亜鉛がグルタミン酸と共に細胞外へ放出されることが示された。また、虚血時のグルタミン酸濃度は虚血前に比べて10倍以上増加するのに比べて、亜鉛濃度は虚血前の2倍程度にしか増加しなかった。これまで、前脳虚血時にはかなり高濃度の亜鉛が放出されると考えられていたが、この結果から、その濃度は予想されていたほど高くはないことが示された。しかし、一方で、遅発性の神経細胞死に先行して亜鉛が海馬 CA1 錐体細胞内に蓄積すること、また、虚血前の Ca-EDTA の側脳室内(i. c. v.)投与は遅発性の神経細胞死を抑制することを認めた。これらの結果から、放出された亜鉛は、細胞実験で神経細胞死を惹起した濃度には達していないと考えられるにも関わらず、遅発性の神経細胞死を引き起こしている可能性が示された。そこで、亜鉛の蓄積に関する経時的変化について検討したところ、虚血6時間後までは亜鉛の蓄積は認められず、24時間後に亜鉛の蓄積が認められた。さらに、虚血後に Ca-EDTA を複数回 i. c. v. 投与したところ、遅発性の神経細胞死は一部抑制された。また、虚血後に亜鉛を海馬内投与すると亜鉛の蓄積が生じたのに対し、正常ラットの海馬に亜鉛を投与しても、亜鉛の蓄積も細胞死も生じなかった。これらの結果から、細胞死に関連した亜鉛の蓄積には、虚血後の持続的な亜鉛の流入と細胞内亜鉛の制御機能の低下が寄与している可能性が示された。

さらに、他の脳虚血モデルにおける亜鉛の挙動と神経細胞への影響を調べるために、中大脳動脈閉塞（MCAO）モデルを用いて4VOモデルと同様の検討を行った結果、脳虚血時の細胞外液中亜鉛濃度は虚血前の2倍程度にしか増加しなかった。従って、MCAOモデルでも、4VOモデルの場合と同様に、虚血時に放出される亜鉛の濃度は、細胞実験で神経細胞死を惹起した濃度に達していないと考えられる。また、虚血前にCa-EDTAをi. c. v.投与し、放出された亜鉛の神経細胞障害への影響について検討したところ、MCAOモデルでは、4VOモデルの場合と異なり、Ca-EDTAの前投与により虚血後の障害体積が増加すること、障害領域および障害領域と正常領域の境界付近にも亜鉛は蓄積していないことを認め、MCAOモデルにおいては、虚血時に放出された亜鉛は、虚血後の神経細胞障害に抑制的に働くことを認めた。これらの結果から、脳の虚血状態や部位により、亜鉛の神経細胞に対する影響が異なることが示された。

以上、本研究は、脳虚血における亜鉛の挙動と神経細胞に対する影響を明らかにしたものであり、これらの知見は生体内金属の作用に関する研究において基礎的な情報を提供するものであると考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

脳において、亜鉛は酵素や遺伝子などに含まれる以外に、主にグルタミン酸作動性神経のシナプス小胞内にグルタミン酸と共に存在している。これまでに、グルタミン酸レセプターのひとつである*N*-methyl-D-aspartate (NMDA)レセプターは亜鉛結合部位を持ち、亜鉛によって作用を抑制されることから、刺激によりシナプス間隙に放出された小胞内亜鉛はグルタミン酸による神経興奮に対して抑制的に働く可能性が報告されている。しかし、一方で、前脳虚血時には亜鉛が神経細胞死を引き起こす可能性も報告されている。このように、脳内、特に脳虚血時での亜鉛の挙動や作用については不明確な部分が多く、インビボにおいて濃度と関連づけて亜鉛の挙動や作用を検討した例はほとんどない。このような背景のもと、本論文は、脳虚血における亜鉛の挙動と神経細胞に及ぼす影響を、亜鉛の定量結果に基づいて検討することを計画したものである。

著者は、まず、培養神経細胞を用い、グルタミン酸誘発神経細胞死に対する亜鉛の影響を基礎的に検討した。その結果、亜鉛は低濃度では濃度依存的にグルタミン酸に誘発されるCa<sup>2+</sup>流入及び神経細胞死を抑制したが、一方、高濃度では、グルタミン酸誘発Ca<sup>2+</sup>流入は抑制するが、細胞生存率を低下させ、亜鉛は高濃度になると神経細胞毒性を発揮することが示され、亜鉛はグルタミン酸毒性に対し、濃度依存的に二つの作用を示すことを認めた。また、グルタミン酸と共にCa-EDTAを添加すると、グルタミン酸に誘発されるCa<sup>2+</sup>の流入がさらに増加し、細胞生存率がより低下した。この結果から、培養神経細胞においては、グルタミン酸添加の刺激によって、神経細胞保護作用を示す程度の小胞内亜鉛が放出されている可能性が示された。

次に、脳虚血モデル動物を用いて、インビボで脳内亜鉛濃度の変化を調べた。方法は、前脳虚血モデルとして四血管閉塞再灌流（4VO）モデルを用い、マイクロダイアリシス法により対象とする脳の部位での細胞外液を経時的に透析し、得られた透析外液中の亜鉛をフレイムレス式の原子吸光光度計を用いて測定した。その結果、亜鉛とグルタミン酸の経時的濃度変化が一致し、脳虚血時には小胞内亜鉛がグルタミン酸と共に細胞外へ放出されることが示された。また、虚血時のグルタミン酸濃度は虚血前に比べて10倍以上増加するのに比べて、亜鉛濃度は虚血前の2倍程度にしか増加せず、これまでに予想されていたほど、その濃度は高くはないことが示された。しかし、一方で、遅発性の神経細胞死に先行して亜鉛が海馬CA1錐体細胞内に蓄積すること、また、虚血前のCa-EDTAの側脳室内（i. c. v.）投与は遅発性の神経細胞死を抑制することを認めた。これらの結果から、放出された亜鉛は、細胞実験で神経細胞死を惹起した濃度には達していないと考えられるにも関わらず、遅発性の神経細胞死を引き起こしている可能性が示された。そこで、亜鉛の蓄積に関する経時変化について検討したところ、虚血6時間後までは亜鉛の蓄積は認められなかったが、24時間後には亜鉛の蓄積が認められた。さらに、虚血後にCa-EDTAを複数回i. c. v.投与したところ、遅発性の神経細胞死は一部抑制された。また、虚血後に亜鉛を海馬内投与すると亜鉛の蓄積が生じたのに対し、正常ラットの海馬に亜鉛を投与しても、亜鉛の蓄積も細胞死も生じなかった。これらの結果から、細胞死に関連した亜鉛の蓄積には、虚血後の持続的な亜鉛の流入と細胞内亜鉛の制御機能の低下が寄与している可能性が見出された。一方、中大脳動脈閉塞（MCAO）モデルでは、4VOモデルの場合と異なり、Ca-EDTAの前投与により虚血後の障害体積が増加することを認め、亜鉛は神経細胞障害に抑制的に働いていることを見い出

した。これらの結果から、脳の虚血状態や部位により、亜鉛の神経細胞に対する影響が異なることが示された。

以上、本研究は、脳虚血における亜鉛の挙動と神経細胞に対する影響を明らかにしたものであり、これらの知見は生体内金属の作用に関する研究において基礎的な情報を提供するものと評価される。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

更に、平成18年6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。