

氏名	うるし 漆 谷 真
学位(専攻分野)	博士 (医学)
学位記番号	医博第2183号
学位授与の日付	平成12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	医学研究科脳統御医科学系専攻
学位論文題目	Mechanism of selective motor neuronal death after exposure of spinal cord to glutamate: involvement of glutamate-induced nitric oxide in motor neuron toxicity and nonmotor neuron protection. (グルタミン酸刺激によって誘発される選択的脊髄運動ニューロン死の機序: 運動ニューロン毒性と非運動ニューロン保護における一酸化窒素の関与)

論文調査委員 (主査) 教授 中西重忠 教授 大森治紀 教授 柴崎 浩

### 論文内容の要旨

(目的) 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、上位・下位運動ニューロンの選択的変性を特徴とする、原因不明の進行性疾患である。興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の病態への関与が推察されているが、選択的運動ニューロン死の機序については不明な点が多い。本研究では、胎生ラット脊髄の初代分散培養系を用い、運動ニューロンと非運動ニューロンにおける、グルタミン酸への脆弱性の相異の有無、さらにグルタミン酸毒性に深く関わると考えられている一酸化窒素に対する反応性の相異の有無を検討した。

(方法) 胎生16日齢のラット脊髄の腹側半分を切離、トリプシン処理を経て、機械的に分散させた後培養し、培養第8-9日に薬物処置実験を行った。ニューロンの同定は抗微小管関連蛋白2型 (MAP2) 抗体、運動ニューロンの同定には抗非リン酸化ニューロフィラメントH抗体 (SMI32) による免疫染色を用いた。染色後、光学顕微鏡下無作為に計数し、単位面積あたりのニューロン数を算出した。神経毒性はコントロール群に対する処置群の生存率を算出することにより検討した。

(結果) 1) グルタミン酸 (Glu) 10分間の短時間暴露において、運動ニューロン、非運動ニューロンとも0.5ミリモル/リットル (mM) 以上の高濃度で障害され、ニューロンの選択性は認めなかった。24時間持続暴露条件下では、運動ニューロンのみが0.03 mMの低濃度から障害され、さらにGluトランスポーター阻害薬 (PDC, 0.02 mM) との同時投与により、運動ニューロン毒性が増強された。2) 運動ニューロンのみが障害される濃度のGlu (0.03 mM) とPDC (0.02 mM) の投与条件下 (低濃度条件) と、非運動ニューロンとも障害される濃度のGlu (0.1 mM) とPDC (0.02 mM) の投与条件下 (高濃度条件) で、NMDA型受容体拮抗薬と、AMPA型、カイニン酸型受容体拮抗薬、カルモジュリン阻害薬、一酸化窒素合成酵素 (NOS) 阻害薬、あるいはスーパーオキシドジスムターゼを同時投与した場合、各々両ニューロンにてGlu毒性が有意に抑制された。3) 長時間の半減期を有する一酸化窒素 (NO) 放出剤の24時間持続投与によって運動ニューロンは選択的に障害された。4) Glu高濃度条件下、NOの下流で発生するサイクリックGMP (cGMP) の膜透過型アナログを、Glu, NMDA, カイニン酸と各々同時投与した場合、非運動ニューロンにおいてのみ有意にGlu毒性が抑制された。次に低濃度条件下で、NO依存性グアニル酸シクラーゼ阻害薬 (ODQ) を同時投与した場合、非運動ニューロンにおいてもGlu毒性が出現した。4) 低濃度条件下、PDC暴露後経時的に固定し、抗神経型NOS (nNOS) 抗体による免疫染色を行ったところ、暴露後12時間より抗nNOS抗体陽性ニューロンが増加した。SMI32と抗nNOS抗体による二重免疫染色を行った結果、抗nNOS陽性ニューロンとSMI32陽性ニューロンは殆ど共染されなかった。

(結論) 本研究により、脊髄培養ニューロンにおいて運動ニューロンは低濃度グルタミン酸の慢性暴露に対して脆弱であり、イオン型受容体刺激によって、カルモジュリン、nNOSの活性化による一酸化窒素の発生、さらにスーパーオキシドと

の反応によるペルオキシ亜硝酸の発生を介していることが明らかとなった。しかし、このカスケードは運動ニューロンに特異的ではなく、非運動ニューロンは低濃度のグルタミン酸刺激下、NO-cGMPカスケードによってグルタミン酸毒性から保護されていることが示された。また、慢性グルタミン酸暴露下、非運動ニューロンにおいて誘導されたnNOSは、非運動ニューロンに対する保護作用と、運動ニューロンに対する毒性の両者を増強していると考えられ、ALSの進行性病態を説明しうる知見と考えられた。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究は、筋萎縮性側索硬化症（ALS）の臨床・病理学的特徴である選択的運動ニューロン死の機序の解明を目的とし、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸と選択的運動ニューロン死の関連を検討したものである。本研究によれば、胎児ラット脊髄の初代分散培養ニューロンにおいて、免疫細胞化学的に標識した運動ニューロンは非運動ニューロンに比べ、低濃度グルタミン酸の長時間暴露に対する脆弱性が著明であり、この毒性発現には神経型一酸化窒素合成酵素（nNOS）の活性化による一酸化窒素（NO）の発生が関与していた。抗nNOS抗体陽性ニューロンは非運動ニューロンにのみ発現し、グルタミン酸の暴露時間に依存してニューロン数が増加した。さらに、非運動ニューロンでは低濃度グルタミン酸刺激後、NO依存性グアニル酸シクラーゼにより生成されるサイクリックGMPが保護的に機能していた。

以上の研究は、脊髄における選択的運動ニューロン死が低濃度グルタミン酸の慢性暴露によって生じ、非運動ニューロンにおけるNOの発生が強く関わっている一方、非運動ニューロンは自らが産生したNOによる保護効果を受けていることを示しており、ALSにおける選択的運動ニューロン死の発生機序の解明に寄与するところが大きい。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成12年1月6日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。