

氏名 杉野敏之  
 学位(専攻分野) 博士(医学)  
 学位記番号 医博第2200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 3-Nitropropionic acid induces poly(ADP-ribose)ylation and apoptosis related gene expression in the striatum in vivo  
 (3-ニトロプロピオン酸によるラット線条体におけるADPボシル化とアポトーシス関連遺伝子の発現に関する研究)

論文調査委員 (主査) 教授 上田國寛 教授 柴崎 浩 教授 橋本信夫

### 論文内容の要旨

#### (目的)

3-nitropropionic acid (3-NP) は、クエン酸回路のコハク酸からフマル酸への脱水素反応を触媒しかつミトコンドリア呼吸鎖の複合体IIを構成するコハク酸脱水素酵素を、不可逆的に抑制することによって、ミトコンドリアにおけるATP産生を阻害する作用を持つ。3-NPを全身(腹腔内)に反復投与しATP産生を段階的に障害すると、個体がClinical recumbencyを呈した時点で外側線条体に限局した組織傷害を起こすことが報告されている。しかし、その機序については未だ解明されていない点が多い。一方、NMDA受容体を介する興奮性神経毒性の機序は、細胞内へのカルシウム流入、一酸化窒素合成酵素(NOS)の活性化に続きDNAの傷害がおこり、最終的にポリADPリボシル化を通じて細胞死に至ると考えられてきた。近年、神経型一酸化窒素合成酵素(nNOS)の阻害剤を前投与すると、3-NPによる組織傷害を軽減するという報告が出された。そこで、3-NPによる組織傷害はNOS、さらにはポリADPリボシル化を介する可能性があると考え、3-NPの組織傷害におけるポリADPリボシル化の関与を免疫組織学的に検討し、同時にアポトーシス関連遺伝子のBcl-2, Baxの変化についても検討を加えた。

#### (実験方法)

体重280-320gの雄SDラットに3-NP(10mg/kg)を12時間間隔で腹腔内投与し、個体がClinical recumbencyを呈した時点(Group3)でのpoly(ADP-ribose), Bcl-2, Baxの発現を免疫組織学的に検討した。またGroup1としてvehicle投与群、Group2として3-NP2回投与12時間後の個体も作成し、経時的变化に付いて検討を加えた。さらに外側線条体、背側正中線条体、前頭葉に1mm<sup>2</sup>の領域を定め、免疫陽性細胞を計測し統計学的処理を行った。

#### (結果)

Group3の外側線条体においてのみ、Poly(ADP-ribose)陽性神経細胞の著明な発現を認めた。また、背側正中線条体、前頭葉においてBcl-2陽性神経細胞がそれぞれGroup2, 3で統計学的に有意に増加した。Bax陽性神経細胞は、Group3で外側、背側正中線条体で統計学的に有意に減少した。

#### (考察)

3-NPによる外側線条体の組織傷害に関する機構についてはさまざまな報告がなされているが、未だに不明な点が多い。近年この細胞傷害にアポトーシスが関与する可能性が報告された。本研究の結果では、poly(ADP-ribose)陽性神経細胞の有意な増加が外側線条体に限局しており、この傷害にポリADPリボシル化が関与していると強く示唆された。また、細胞死に陥らない背側正中線条体、前頭葉においてBcl-2陽性神経細胞が増加したことより、Bcl-2が3-NP neurotoxicityにおいて神経細胞保護に働いている可能性も否定できない。Bax陽性神経細胞は線条体で減少するが、これは組織傷害による細

胞脱落の影響が考えられる。

本来は細胞単位で考えるべきであるが、組織単位で Bcl-2/Bax 比をとると、外側線条体、背側正中線条体、前頭葉のすべてにおいてこの比は増加し、Apoptotic pathway のなんらかの関与があるものと考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

#### (目的)

3-nitropropionic acid (3-NP) は、コハク酸脱水素酵素を不可逆的に抑制しミトコンドリアでの ATP 産生を阻害する。3-NP の腹腔内投与により外側線条体に組織傷害を起こすモデルを作成した。3-NP の組織傷害におけるポリ ADP リボシル化の関与の有無、Bcl-2、Bax の変化につき検討した。

(実験方法) 雄 SD ラットに 3-NP を反復腹腔内投与し、個体が Clinical recumbency を呈した Group 3、Group 1 (control)、Group 2 (3-NP 2 回投与後) での poly (ADP-ribose)、Bcl-2、Bax の発現を免疫組織学的に検討した。また外側線条体 (LS)、背側正中線条体 (DS)、前頭葉 (FC) における免疫陽性細胞を計測した。

#### (結果)

Group 3 の LS で poly (ADP-ribose) 陽性神経細胞が、DS、FC で Bcl-2 陽性神経細胞が有意に増加した。Bax 陽性神経細胞は LS、DS で有意に減少した。

#### (考察)

3-NP 投与後、LS の傷害にポリ ADP リボシル化の関与を推察した。細胞死に陥らない DS、FC では Bcl-2 が神経細胞保護に働いている可能性がある。Bcl-2/Bax 比は LS、DS、FC とも増加し、Apoptotic pathway の関与が考えられた。

以上の研究はミトコンドリア ATP 産生障害による神経細胞死の機構解明に貢献し、脳梗塞をはじめとする虚血性神経細胞死の治療に寄与するところが多い。

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 24 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。