

|           |                                              |
|-----------|----------------------------------------------|
| 氏 名       | しば た はる き<br>柴 田 治 樹                         |
| 学位(専攻分野)  | 博 士 (薬 学)                                    |
| 学 位 記 番 号 | 薬 博 第 597 号                                  |
| 学位授与の日付   | 平成 18 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    | 中脳ドパミンニューロンの生存における細胞間相互作用と炎症性応答の<br>役割に関する研究 |

|        |                      |             |             |
|--------|----------------------|-------------|-------------|
| 論文調査委員 | (主 査)<br>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

パーキンソン病は中脳黒質ドパミンニューロンの変性および脱落を特徴とする進行性の神経変性疾患である。慢性的経過をたどる神経変性疾患におけるニューロン変性の誘導過程には、当該ニューロンと周囲を取り巻く他の細胞との間の相互作用が作用さまざまな形で関与する。本研究において著者は、細胞間相互作用と炎症性応答がドパミンニューロン生存に及ぼす影響を明らかにする目的で、中脳切片培養および細胞株を用いた検討を行い、以下の新知見を得た。

#### 第一章 中脳ドパミンニューロンの生存・維持における NMDA 受容体の役割

ニューロンの過剰な興奮性活動は NMDA 型グルタミン酸受容体の活性化などを介して興奮性神経毒性を誘導することが知られているが、一方で神経活動がニューロンの生存維持や形態形成、機能分化などに重要な役割を担う例が知られている。著者は、NMDA 受容体チャネルを阻害することが知られる  $Mg^{2+}$  を添加した培地を用いて生後 2～3 日齢ラット由来の中脳切片を培養維持すると、通常培地で培養した切片に比べて生存ドパミンニューロン数が著明に減少することを見出した。NMDA 受容体遮断薬である M-5, MK-801 あるいはイフェンプロジルを慢性適用した場合にもドパミンニューロン数は減少した。さらに、MK-801 により誘導されるドパミンニューロン数の減少は、高  $K^+$  刺激による持続的脱分極や、アデニル酸シクラーゼ活性化薬フォルスコリンの慢性適用によりほぼ完全に抑制された。以上の結果は、ニューロンの自発的活動に伴って生じる神経伝達による NMDA 受容体の刺激が、細胞内への  $Ca^{2+}$  流入とアデニル酸シクラーゼの活性化を介してドパミンニューロンの生存維持シグナルとして働くことを示唆している。

#### 第二章 グリア細胞の活性化によって誘導される中脳ドパミンニューロン死の機序

パーキンソン病患者脳には炎症性応答が伴うことが示唆されている。脳内の炎症性応答に伴って活性化されたグリア細胞に由来する種々の可溶性因子は、ニューロンの変性誘導に寄与する。そこで、インターフェロン- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )/リポ多糖 (LPS) を用いてグリア細胞を活性化させた時に惹起される培養中脳切片内の病理変化について検討した。IFN- $\gamma$ /LPS 処置はドパミンニューロン数の減少とともに、切片内の細胞全体の障害を反映する乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) の遊離量が増大した。IFN- $\gamma$ /LPS 処置はミクログリアにおける誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) の発現と一酸化窒素 (NO) 産生の増大、およびシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) の発現を誘導した。iNOS を阻害するアミノグアニジンは IFN- $\gamma$ /LPS による NO 産生増大を顕著に抑制し、ドパミンニューロン数の減少や LDH 遊離量の増大も抑制した。p38 MAP kinase 阻害薬 SB203580 は IFN- $\gamma$ /LPS 刺激に伴うミクログリアの iNOS 誘導を抑制し、ドパミンニューロン数の減少も抑制した。

COX の関与を調べるために LPS と同時に各種 COX 阻害薬を処置したところ、インドメタシンはドパミンニューロンに対して保護作用を示したが、COX-2 阻害薬は保護作用を示さなかった。次いで、グリア細胞から遊離されるサイトカインがニューロン死に及ぼす影響を調べるために TNF- $\alpha$  および IL-1 $\beta$  に対する中和抗体を適用したが、IFN- $\gamma$ /LPS によるドパミンニューロン数の減少に対しては無効であった。さらに、c-Jun N-terminal kinase (JNK) 阻害薬 SP600125 およ

び抗酸化薬  $\alpha$ -トコフェロールが IFN- $\gamma$ /LPS によるドパミンニューロン死を抑制することを見出した。以上の結果は、中脳の炎症性応答に伴うドパミンニューロン死において、ミクログリアで誘導された iNOS が産生する NO が重要な役割を果たすことを示しており、さらにその制御に JNK の阻害や酸化ストレスの除去が有効である可能性を示している。

### 第三章 パーキンソン病原因遺伝子 DJ-1 の機能解析

DJ-1 は近年その機能欠損が劣性遺伝型早発性パーキンソニズムの原因として同定されたタンパクで、遺伝子転写の調節や酸化ストレスに対する防御などの多様な機能が明らかにされつつあるが、その機能欠損とドパミンニューロン変性との関係は不明である。DJ-1 の発現はニューロンだけでなくグリア細胞にも広範に認められることから、神経芽細胞株 SH-SY5Y およびグリア細胞株 C6 を用いて酸化ストレス下の細胞生存における DJ-1 の役割について検討した。SH-SY5Y と C6 のいずれにおいても過酸化水素の処置は DJ-1 の発現量を増大させた。RNA 干渉により DJ-1 タンパクの発現を抑制すると、ドパミン神経毒である 6-OHDA や MPP<sup>+</sup>、および NO ドナーである NOC-18 の毒性に対する SH-SY5Y 細胞の感受性は増大した。DJ-1 の発現抑制は酸化ストレス時の細胞内グルタチオン量の減少を促進した。以上の結果は、SH-SY5Y および C6 において DJ-1 が酸化ストレスからの内因性の保護機構として重要であることを示唆している。

以上、著者はグルタミン酸神経伝達を介する他のニューロンとの相互作用、および炎症性応答時の NO 産生を介するグリア細胞との相互作用が中脳ドパミンニューロンの生存維持や変性誘導に重要な役割を担うことを明らかにし、さらにパーキンソニズム原因遺伝子産物によるドパミンニューロン死の制御機構の一端を明らかにした。本研究の成果は、未だ不明な点の多いパーキンソン病におけるドパミンニューロン死の機序の解明に寄与するものであり、神経変性疾患の予防・治療薬の開発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

パーキンソン病は中脳黒質ドパミンニューロンの変性および脱落を特徴とする進行性の神経変性疾患である。慢性的経過をたどる神経変性疾患におけるニューロン変性の誘導過程には、当該ニューロンと周囲を取り巻く他の細胞との間の相互作用がさまざまな形で関与する。申請者は、細胞間相互作用と炎症性応答がドパミンニューロン生存に及ぼす影響を明らかにする目的で、中脳切片培養および細胞株を用いた薬理学的研究を行った。

### 第一章 中脳ドパミンニューロンの生存・維持における NMDA 受容体の役割

ニューロンの過剰な興奮性活動は NMDA 受容体の活性化を介して興奮性神経毒性を誘導することが知られているが、一方で神経活動がニューロンの生存維持や形態形成、機能分化などに重要な役割を担う例が知られている。申請者は、NMDA 受容体チャネルを阻害する Mg<sup>2+</sup> を添加した培地を用いてラット新生仔由来中脳切片を培養維持すると、通常培地で培養した切片に比べて生存ドパミンニューロン数が著明に減少することを見出した。NMDA 受容体遮断薬である AP-5、MK-801 あるいはイフェンプロジルの慢性適用によってもドパミンニューロン数が減少した。MK-801 により誘導されるドパミンニューロン数の減少は、高 K<sup>+</sup> 刺激による持続的脱分極、あるいはアデニル酸シクラーゼ活性化薬フォルスコリンの慢性適用によりほぼ完全に抑制された。以上の結果より、ニューロンの自発的活動に伴う NMDA 受容体刺激が、細胞内への Ca<sup>2+</sup> 流入とアデニル酸シクラーゼの活性化を介してドパミンニューロンの生存維持シグナルとして働くことが示唆された。

### 第二章 グリア細胞の活性化によって誘導される中脳ドパミンニューロン死の機序

パーキンソン病患者脳には炎症性応答が伴うこと、および脳内炎症性応答に伴い活性化されたグリア細胞に由来する種々の可溶性因子はニューロンの変性誘導に寄与することが示唆されている。そこで、インターフェロン- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )/リポ多糖 (LPS) を用いてグリア細胞を活性化させた時に惹起される培養中脳切片内の病理変化について検討した結果、IFN- $\gamma$ /LPS 処置はドパミンニューロン数の減少と切片内の細胞全体(全細胞)の障害を引き起こすことを見出した。IFN- $\gamma$ /LPS 処置はミクログリアにおける誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) の発現と一酸化窒素 (NO) 産生の増大、およびシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) の発現を誘導した。iNOS を阻害するアミノグアニジンは IFN- $\gamma$ /LPS による NO 産生増大を顕著に抑制し、ドパミンニューロン数の減少と全細胞の障害をともに抑制した。p38 MAP kinase 阻害薬 SB203580 は IFN- $\gamma$ /LPS 刺激に伴うミクログリアの iNOS 誘導を抑制し、ドパミンニューロン数の減少も抑制した。

COX の関与を調べる目的で LPS 誘発細胞障害に対する各種 COX 阻害薬の作用を検討した結果、インドメタシンはドパミンニューロンに対して保護作用を示したが、選択的 COX-2 阻害薬は保護作用を示さなかった。次いで、グリア細胞から遊離されるサイトカインがニューロン死に及ぼす影響を調べるために TNF- $\alpha$  および IL-1 $\beta$  に対する中和抗体を適用したが、IFN- $\gamma$ /LPS によるドパミンニューロン数の減少に対しては無効であった。さらに、c-Jun N-terminal kinase (JNK) 阻害薬 SP600125 および抗酸化薬  $\alpha$ -トコフェロールが IFN- $\gamma$ /LPS によるドパミンニューロン死を抑制することを見出した。以上の結果は、中脳の炎症性応答に伴うドパミンニューロン死において、ミクログリアで誘導された iNOS が産生する NO が重要な役割を果たすことを示しており、さらにその制御に JNK の阻害や酸化的ストレスの除去が有効である可能性を示している。

### 第三章 パーキンソン病原因遺伝子 DJ-1 の機能解析

DJ-1 は近年その機能欠損が劣性遺伝型早発性パーキンソニズムの原因として同定されたタンパクで、遺伝子転写の調節や酸化的ストレスに対する防御などの多様な機能が明らかにされつつあるが、その機能欠損とドパミンニューロン変性との関係は不明である。DJ-1 の発現はニューロンだけでなくグリア細胞にも広範に認められることから、神経芽細胞株 SH-SY5Y およびグリア細胞株 C6 を用いて酸化的ストレス下の細胞生存における DJ-1 の役割について検討した。SH-SY5Y と C6 のいずれにおいても過酸化水素の処置は DJ-1 の発現量を増大させた。RNA 干渉により DJ-1 タンパクの発現を抑制すると、ドパミン神経毒である 6-OHDA や MPP<sup>+</sup>、および NO ドナーである NOC-18 の毒性に対する SH-SY5Y 細胞の感受性は増大した。DJ-1 の発現抑制は酸化的ストレス時の細胞内グルタチオン量の減少を促進した。以上の結果は、SH-SY5Y および C6 において DJ-1 が酸化的ストレスからの内因性の保護機構として重要であることを示唆している。

以上、申請者はグルタミン酸神経伝達を介する他のニューロンとの相互作用、および炎症性応答時の NO 産生を介するグリア細胞との相互作用が中脳ドパミンニューロンの生存維持や変性誘導に重要な役割を担うことを明らかにし、さらにパーキンソニズム原因遺伝子産物によるドパミンニューロン死の制御機構の一端を明らかにした。本研究の成果は、未だ不明な点の多いパーキンソン病におけるドパミンニューロン死の機序の解明に寄与するものであり、神経変性疾患の予防・治療薬の開発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18年2月28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。