

氏 名	かわむらと 河 村 透
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	論 薬 博 第 605 号
学位授与の日付	平 成 11 年 3 月 23 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	プロスタグランジンE ₁ による神経アポトーシス抑制とその分子薬理学的 機序に関する研究

(主査)

論文調査委員 教授 佐藤 公道 教授 市川 厚 教授 赤池 昭紀

論 文 内 容 の 要 旨

神経細胞は発生段階の初期に細胞分裂を停止し増殖しないとされていることから、様々なストレスによって惹起される神経細胞死を未然に防ぐことは、神経機能維持にとって重要である。一般に細胞死には、虚血が主因に関わる壊死（ネクローシス）と、虚血が引き金とはなっても機序の異なる自死（アポトーシス）がある。近年、アポトーシスは、アルツハイマー病やパーキンソン病の発症あるいは進展に関与する可能性が指摘され、神経アポトーシスを抑制することに一定の意義が見出されているが、このような機序をもつ当該疾患の治療薬は未だ見出されていない。ところで、プロスタグランジンE₁（PGE₁）は慢性動脈閉塞症など末梢循環障害に臨床適応されており、さらに近年糖尿病性神経障害や腰部脊柱管狭窄症など神経機能障害に対する効果が期待されているが、その作用に関しては不明である。著者は、新たに確立した神経アポトーシスモデルにおいてPGE₁がこれを抑制することを初めて示し、さらにその作用機序について検討した結果、PGE₁が標的神経に局在するプロスタグランジン輸送担体（トランスポーター）を介して神経細胞内に取り込まれ、細胞内のアポトーシス誘導系のシグナル伝達を阻害することにより、神経アポトーシス抑制作用を発現するという新知見を得た。

第一編 神経アポトーシスに対するPGE₁の作用

坐骨神経を持続的に絞扼することにより、脊髓投射域である第4から5腰髄の第1, 2層に局限した特異な神経変性すなわち暗調細胞が出現することが知られている。著者は、当該モデルの関心域に虚血性変化がみられないことを確認したうえで、この神経変性がアポトーシスである可能性を推定し、第4腰髄から得たゲノムDNAの電気泳動分析によるヌクレオソーム単位のゲノムDNAの断片化と、第5腰髄を用いたTUNEL法による断片化DNAの組織化学的検出の結果、当該神経変性がアポトーシスによることを初めて明らかにした。

次に同モデルを用いて脊髓における神経アポトーシスに対するPGE₁の安定製剤lipo-PGE₁（以下PGE₁）の作用を検討した。坐骨神経絞扼術1日目より、PGE₁を2週間投与することにより、脊髓組織においてみられる神経アポトーシスは完全に抑制された。一方、PGE₁と同じく血管拡張性プロスタノイドであるPGI₂の安定誘導体カルバサイクリンは、全くこのような作用を示さなかった。以上の知見に加えて、PGE₁の投与により関心領域の血流量に変動がみられなかったことを勘案すると、従来から報告されているPGE₁の血管拡張および血小板凝集抑制作用に基づく局所血流障害の改善が、神経アポトーシス抑制作用に寄与している可能性は少ないと考えられる。

第二編 PGE₁の神経アポトーシス抑制に関する作用部位・作用点の検討

PGE₁が血液脳関門を通過し、脊髓組織に移行することから、PGE₁の当該作用の発現が関心領域である第4腰髄の第1, 2層ニューロンへの直接作用による可能性を探るため、PGE₁/PGE₂の作用点と考えられる特異的受容体あるいはトランスポーターの発現を調べた。特異的プライマーを用いたRT-PCRの結果、EP₁, EP₂, EP₄受容体とともに、プロスタグランジントランスポーターが腰髄に発現していることが示された。またcRNAプローブを用いたin situ同定を行った結果、EP₄受容体およびプロスタグランジントランスポーターが、第4腰髄の第1, 2層ニューロンに発現していることを確認した。以

上より、PGE₁がこれらの系を介して神経細胞に対して作用し、当該神経アポトーシスに対する抑制効果を発現している可能性が考えられる。

第三編 PGE₁の神経アポトーシス抑制機序

第二編においてPGE₁の神経細胞に対する直接作用の可能性が考えられたため、培養系からのNGF除去によりアポトーシスを起こすことが知られているPC12細胞を用いて、PGE₁のアポトーシス抑制作用機序を検討した。培養系からNGFを除去することにより惹起されるPC12細胞のアポトーシスに対して、NGF除去と同時にPGE₁を培地中に添加することにより、アポトーシスに特異的な核変化が抑制された。さらに、この抑制作用は、プロスタグランジントランスポーターの阻害薬およびその特異的アンチセンスオリゴヌクレオチドにより減弱されたことから、PGE₁がトランスポーターによって細胞内に取り込まれることが重要であることが示唆される。さらに、PGE₁の細胞内に移入後の作用機序として、アポトーシスの誘導に関係するSAPK/JNK活性を低下させることが大きく寄与していることを明らかにした。以上の知見から、プロスタグランジントランスポーターを介して細胞内に取り込まれたPGE₁がSAPK/JNK活性を抑制的に調節することにより神経アポトーシスの誘導を阻害することが示唆される。以上、著者は、病態生理的神経アポトーシスに対するPGE₁の抑制作用を発見し、さらに、その分子薬理学的作用機序の一端を明らかにした。これらの成績は、神経アポトーシスに関与している疾患の悪化を阻止する薬剤の開発に資する基礎的知見と考えられる。

論文審査の結果の要旨

近年、アルツハイマー病、パーキンソン病等の神経変性疾患に伴う前脳基底野コリン作動性神経、黒質ドパミン神経等の神経細胞死にアポトーシスに関与する可能性が指摘されており、神経アポトーシスを抑制する物質が神経変性疾患の治療薬となる可能性はあるが、未だこのような機序を持つ治療薬は見出されていない。本論文は、新たに確立した病態生理的神経アポトーシスモデルにおけるPGE₁の神経アポトーシス抑制作用の発見およびその分子薬理学的機序の検討結果を内容としている。

第一編 神経アポトーシスに対するPGE₁の作用

ラット坐骨神経の持続的絞扼により、坐骨神経の脊髄投射域である第4および5腰髄の後角第1～2層（以下関心領域と呼ぶ）で誘導される病態生理的神経細胞死がアポトーシスによることを、ゲノムDNAのヌクレオソーム単位への断片化とTUNEL法による断片化DNAの組織化学的検出により突き止め、この神経アポトーシスが、PGE₁の安定製剤であるlipo-PGE₁を坐骨神経絞扼直後から2週間連日静脈内注射することにより抑制されること、その際局所血流量の変化がないことなどから当該抑制作用に局所血流障害の改善が寄与する可能性が極めて低いことを示した。

第二編 PGE₁の神経アポトーシス抑制に関する作用部位・作用点の検討

2週間連日lipo-PGE₁を静脈内注射した時、PGE₁が脊髄組織中に移行していることを確認した。一方、特異的プライマーを用いたRT-PCR法によりPGE₁の受容体EP₁、EP₂、EP₃およびプロスタグランジントランスポーターをコードする遺伝子が腰髄部に発現していること、さらに、in situ hybridization法によりEP₁およびプロスタグランジントランスポーターが関心領域内のニューロンに発現していることを示し、PGE₁がこれらに直接作用して神経アポトーシスを抑制している可能性を指摘した。

第三編 PGE₁の神経アポトーシス抑制機序

PGE₁による神経アポトーシス抑制作用の機序を詳細に調べるため、培地からのNGF除去によりアポトーシスを起こすことが知られているPC12細胞を用い、NGF除去と同時にPGE₁を添加するとアポトーシスが抑制されることを確認した。この抑制作用発現において、PC12細胞に発現しているプロスタグランジン受容体EP₁、EP₂を介する可能性は低く、プロスタグランジントランスポーターの関与が大きいこと、すなわち、このトランスポーターからPC12細胞内に取り込まれたPGE₁がアポトーシスの誘導因子であるSAPK/JNKの活性化を阻害することが大きく寄与していることを明らかにした。

以上、著者は、病態生理的神経アポトーシスに対するPGE₁の抑制作用を発見し、さらにその分子薬理学的機序の一端を明らかにした。これらの知見は、神経アポトーシスに関与している疾患の悪化を防止する薬物の開発に資するものと思われる。

よって、本論文を博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

さらに、平成11年2月15日に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。