

|           |                                                                                                                              |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名       | なか みぞ とも き<br>中 溝 知 樹                                                                                                        |
| 学位(専攻分野)  | 博 士 (医 学)                                                                                                                    |
| 学 位 記 番 号 | 医 博 第 2569 号                                                                                                                 |
| 学位授与の日付   | 平 成 15 年 3 月 24 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    | Phosphodiesterase inhibitors are neuroprotective to cultured spinal motor neurons<br>(ホスホジエステラーゼ阻害薬は培養運動ニューロンに対して神経保護作用を有する) |
| 論文調査委員    | (主 査)<br>教 授 金 子 武 嗣      教 授 橋 本 信 夫      教 授 柴 崎      浩                                                                    |

### 論 文 内 容 の 要 旨

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) における神経細胞変性・神経細胞死の機序を明らかにし、ALS の進行を抑制する新しい治療法の糸口を見出すことを目的として研究を行った。

ALS における運動ニューロン死の機序のひとつとして興奮性神経毒性の関与が言われている。これまでの研究によりラット脊髄初代培養系において、運動ニューロンは非運動ニューロンに比べ慢性興奮性神経毒性に対して脆弱であることが示されている。この脆弱性は、サイクリック GMP (cGMP) を介した神経細胞保護効果が運動ニューロンにおいては非運動ニューロンに比べ働きにくいことが原因であると考えられた。ところがさらに実験を行うと急性のラジカル毒性に対しては cGMP を介した保護効果は運動ニューロンに対しても非運動ニューロンと同様に有効であることが示された。

本研究では cGMP の分解酵素であるホスホジエステラーゼ (PDE) 阻害薬を投与した場合の培養運動ニューロン保護効果を検討した。慢性グルタミン酸毒性に対しては PDE 阻害薬は運動ニューロン、非運動ニューロンいずれについても保護効果を認めた。PDE のアイソザイム選択的阻害薬を用いた検討では PDE5 選択的阻害薬には運動ニューロン保護効果が認められたが、PDE1-4 選択的阻害薬には保護効果は認められなかった。一方 cGMP アナログである 8br-cGMP は非運動ニューロンのみに保護効果があった。急性ラジカル毒性に対しては PDE 阻害薬、8br-cGMP どちらも運動ニューロン、非運動ニューロン両方に保護効果があった。これらの保護効果は cGMP の下流にある cGMP 依存性タンパクキナーゼ (PKG) の阻害薬である KT5823 によって阻害され、PDE 阻害薬による神経細胞保護効果には PKG が関与していることが示唆された。免疫組織化学的に検討すると、PDE5 と PKG は脊髄全ニューロンに存在しており、2重染色を行うとその局在はニューロンのマーカーである NeuN と極めてよく致していた。蛍光免疫染色の蛍光輝度を半定量的に解析すると、PKG 染色の輝度は運動ニューロン、脊髄後角ニューロン間で差がなかったが、PDE5 染色の輝度は運動ニューロンでは後角ニューロンに比べ有意に高く、PDE5 は運動ニューロンに豊富に存在していることが示唆された。

以上の結果から、運動ニューロンでは PDE5 が非運動ニューロンに比べ豊富なために cGMP が分解されやすく、このため慢性興奮性神経毒性に対して脆弱である可能性が考えられた。また、PDE5 選択的阻害薬による ALS 治療の可能性が示唆された。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究では、初代培養脊髄運動ニューロンの慢性興奮性神経毒性に対する脆弱性の1つの機序として、cGMP を介した神経保護効果の関与を検討した。慢性興奮性毒性に対しては、cGMP の分解酵素であるホスホジエステラーゼ (PDE) の阻害薬は運動ニューロンと非運動ニューロンのいずれに対しても保護効果を認めた。アイソザイム選択的阻害薬を用いた検討から、特に PDE5 が関与していることが示唆された。一方、cGMP アナログは非運動ニューロンのみに保護効果があった。急性ラジカル毒性に対しては PDE 阻害薬および cGMP アナログのどちらも運動ニューロン、非運動ニューロン両方

に保護効果があった。これらの保護効果は cGMP 依存性タンパクキナーゼ (PKG) の阻害薬によって阻害され、PKG が関与していることが示唆された。免疫染色を行うと、PDE5 と PKG は脊髄全ニューロンに存在しており、染色の蛍光輝度を半定量的に解析すると、PDE5 染色の輝度は運動ニューロンでは後角ニューロンに比べ有意に高かった。以上の結果から、運動ニューロンでは、PDE5 が非運動ニューロンに比べ豊富なために cGMP が分解されやすく、このため慢性興奮性神経毒性に対して脆弱である可能性が考えられた。同時に、本実験からは PDE5 阻害薬による ALS 治療の可能性が示唆された。

以上の研究は筋萎縮性側索硬化症の病態の解明に貢献し、同疾患の治療法の開発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15年1月17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。