

氏 名	にしよりあつし 西 依 淳
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 446 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	薬学研究科生命薬科学専攻
学位論文題目	神経—グリア細胞機能連関におけるフラクタルカインの役割に関する分子細胞薬理学的研究

論文調査委員 (主 査) 教授 佐藤公道 教授 赤池昭紀 教授 川寄敏祐

論 文 内 容 の 要 旨

虚血性神経障害をはじめとする神経変性疾患において、変性を被った神経細胞の周囲ではグリア細胞の活性化や集積が観察されるが、グリア細胞の活性化は神経変性以前にも観察されることから、グリア細胞の活性化が神経変性の結果ではなく原因である可能性も考えられている。グリア細胞の活性化・集積の分子機構を解明し神経変性の過程における役割を明らかにすることは、種々の神経変性疾患の病態形成機構の解明に重要である。

ケモカインと呼ばれる構造的に類似した一群のサイトカインは、炎症反応において好中球やマクロファージの炎症部位への集積や活性化を制御することが明らかになりつつある。フラクタルカイン (fractalkine, FKN) は、CX3C というモチーフを有するケモカインであり、他のケモカインと同様に分泌型として存在する以外に、ケモカイン類で唯一膜結合型が存在し、細胞間接着分子としても働く可能性が考えられている。CX3CR1 は FKN 受容体であり、百日咳毒素 (PTX) 感受性 G 蛋白質と共役する 7 回膜貫通型受容体である。脳内において、FKN と CX3CR1 は構成的な遺伝子発現を示すことが知られているが、その役割は明らかではない。本研究において著者は、脳内の FKN およびその受容体の発現分布・発現細胞種に関して詳細に解析し、さらに、虚血性神経障害時のグリア細胞活性化における FKN の役割について検討を行い、以下の新知見を得た。

第一章 ラット脳内におけるフラクタルカインおよび CX3CR1 遺伝子の発現分布と発現細胞種

正常ラット脳内における FKN とその受容体である CX3CR1 の遺伝子発現分布を in situ ハイブリダイゼーション法 (ISH 法) を用いて検討した。FKN mRNA は、大脳皮質、海馬、線条体、視床において特に強く発現し、そのシグナルは神経細胞に局在していた。一方、CX3CR1 mRNA は脳全体におおよそ均一に発現し、グリア細胞における発現が示唆された。次に、培養大脳皮質神経細胞、培養アストロサイト、培養ミクログリアにおける両遺伝子の発現を RT-PCR 法を用いて検討した結果、FKN mRNA は神経細胞において強く発現し、アストロサイトとミクログリアにおける発現は微弱であった。一方、CX3CR1 mRNA はミクログリアにおいて特異的に発現していた。また、FKN は培養ミクログリアに対し走化活性化作用を示し、このケモタキシス反応は PTX の前処置により有意に抑制されたので、CX3CR1 を介した反応であると考えられた。以上より、FKN は脳内において神経細胞からミクログリアへのシグナル伝達分子として機能する可能性が示唆された。

第二章 脳虚血負荷によるフラクタルカインおよび CX3CR1 の発現変化

両側椎骨動脈を電気凝固した後、両側総頸動脈を一過性に閉塞する 4 血管閉塞ラットを用いて、一過性前脳虚血負荷後の脳内における FKN および CX3CR1 mRNA の発現を ISH 法を用いて検討した。FKN mRNA は、sham 処置ラットに比べ虚血負荷後 6 時間と 1 日では発現に変化は見られなかったが、3 日と 7 日の海馬 CA1 野錐体細胞層では神経変性によると考えられるシグナルの減弱が見られた。さらに 7 日では、海馬 CA1 野以外に大脳皮質外錐体細胞層および視床腹外側核においても神経変性によると考えられるシグナルの減弱が見られた。一方、隣接切片を用いた免疫組織化学的検討の結果、

海馬における FKN 様免疫活性は、海馬 CA1 野錐体細胞層で 6 時間後から増大し、1 日、3 日、7 日では、強い FKN 様免疫活性を示す細胞が観察された。虚血負荷後 7 日において CA1 錐体細胞層に残存するほとんどの神経細胞は FKN 様免疫活性陽性かつ TUNEL 染色陽性であったことから、神経細胞がアポトーシスによる細胞死に至る過程で FKN を細胞膜上あるいは細胞内に蓄積する可能性が考えられる。一方、CX3CR1 mRNA は虚血負荷後 3 日と 7 日において、FKN mRNA の発現が消失した領域において顕著に発現が増大し、その発現細胞は double ISH 法により GFAP mRNA 陽性アストロサイトではなく、Mac-1 α mRNA 陽性ミクログリアであることが明らかになった。

第三章 脳虚血による海馬神経細胞死およびミクログリア活性化に対するフラクタルカイン側脳室内投与の効果

脳内 FKN が、脳虚血による海馬神経細胞死に対して保護的に働くか、あるいは障害的に働くかを検討するために、一過性前脳虚血負荷後のラットに組換え FKN ペプチドを側脳室内投与し、海馬 CA1 野と CA3 野の神経細胞数を計数した。その結果、FKN 投与群では、vehicle 投与群と比較して CA1 野の神経細胞数がより減少していたことに加え、vehicle 投与群では見られなかった CA3 神経細胞数の減少も観察された。また、活性化されたミクログリアの細胞数は、vehicle 投与群よりも FKN 投与群で著しく多かった。また、無処置ラットに FKN を側脳室内投与しただけでは、神経細胞死は惹起されなかった。以上の結果から、脳虚血後に神経細胞がアポトーシスによる細胞死に至る過程で蓄積した FKN が細胞死とともに放出され、神経変性部位におけるミクログリアの活性化惹起や神経細胞死増悪に関与する可能性が示唆される。

以上、著者は、ラット脳内における FKN および CX3CR1 の遺伝子発現分布ならびに発現細胞種を明らかにし、脳虚血後に神経細胞がアポトーシスによる細胞死に至る過程で蓄積する FKN が、神経変性部位へのミクログリアの集積と活性化を惹起する可能性を示した。本研究の成果は、脳内におけるミクログリア活性化の分子機構の一端を明らかにしたものであり、神経-グリア機能連関の研究において重要な知見であるとともに、グリア細胞の活性化が関与すると考えられる種々の神経変性疾患の病態形成の機構解明にも有用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

脳組織を構成する主要な細胞であるニューロンとグリアがダイナミックに相互的な影響を及ぼし合っており、そこではサイトカイン類がメディエーターとして一定の役割を果たしていることが近年次第に明らかになりつつある。著者は、サイトカイン類の 1 種ケモカインの中でも、分泌型のみならず膜結合型としても存在するという特徴を持つフラクタルカイン (FKN) に注目し、FKN とその受容体の脳内発現部位・細胞、さらに、虚血性神経障害時のグリア細胞活性化における役割に関する検討を行い、以下の新知見を得た。

第一章 ラット脳内におけるフラクタルカインおよび CX3CR1 遺伝子の発現分布と発現細胞種

正常ラット脳での in situ hybridization (ISH) 法を用いた検討の結果、FKN mRNA は、大脳皮質、海馬、線条体、視床において特に強く、且つ神経細胞と考えられる細胞に局限して、発現していること、その受容体 CX3CR1 mRNA は、脳全体にはほぼ均一に、且つグリア細胞と考えられる細胞に、発現していることを明らかにした。さらに、培養大脳皮質神経細胞、培養アストロサイト、培養ミクログリアにおいて RT-PCR 法を用いて検討した結果、FKN mRNA は神経細胞において強く発現し、アストロサイトやミクログリアでの発現は弱いこと、CX3CR1 mRNA はミクログリアに特異的に発現していることを見出した。また、この培養ミクログリア細胞は FKN 添加により百日咳毒素で阻害される遊走反応を起こしたので、ミクログリアの CX3CR1 は百日咳毒素感受性 GTP 結合蛋白質と機能的に共役していることが示された。これらの成績から、FKN が脳内で神経細胞からミクログリアへの情報伝達因子として機能する可能性を指摘した。

第二章 脳虚血負荷によるフラクタルカインおよび CX3CR1 の発現変化

ラットの両側椎骨動脈の電氣的凝固に加えて両側総頸動脈を一過性に閉塞する一過性前脳虚血負荷後の脳内 FKN および CX3CR1 mRNA の発現状態を ISH 法で調べた結果、6 時間後および 1 日後ではどこにも変化は現れなかったが、3 日および 7 日後では海馬 CA1 野錐体細胞層、7 日後には大脳皮質外錐体細胞層および視床腹外側核、において神経変性によると考えられる FKN mRNA の減少が見られた。また、隣接切片を用いて FKN 様免疫活性を調べたところ、海馬 CA1 野錐体細胞層では、6 時間後から増大が見られ、1～7 日後には強い活性を示す細胞が観察された。さらに、7 日後に当該部に残存する神経細胞のほとんどが FKN 様免疫活性陽性かつ TUNEL 染色陽性であったので、神経細胞がアポトーシスにより死に至る過程で FKN を細胞膜上あるいは細胞内に蓄積する可能性を指摘した。一方、CX3CR1 mRNA の発現は、虚血負荷

後3日と7日に FKN mRNA が消失した領域で、アストロサイトではなくミクログリアに顕著に増大することを二重 ISH 法により証明した。

第三章 脳虚血による海馬神経細胞死およびミクログリア活性化に対するフラクタルカイン側脳室内投与の効果

一過性前脳虚血負荷後のラットに組換え FKN ペプチドを側脳室内投与したところ、海馬 CA1 野での神経細胞死増悪、CA3 野での神経細胞死誘発、活性化ミクログリア数増加が認められたことと、無処置ラットに FKN を側脳室内投与しても神経細胞死は惹起されなかったことを勘案し、脳虚血後に神経細胞がアポトーシスにより死に至る過程で蓄積された FKN が細胞死と共に放出され、神経変性部位でのミクログリア活性化や神経細胞死増悪を惹起する可能性を指摘した。

以上の成果は、脳内におけるミクログリア活性化の分子機構の一端を明らかにした、ニューロン-グリア機能連関における重要な知見であり、神経変性疾患の病態形成機構解明に基礎的知見を提供するものである。

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12年3月1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。