

学位論文題名

Glutamate neurotoxicity in mesencephalic
dopaminergic neurons in culture

(培養中脳ドパミンニューロンにおけるグルタミン酸の神経毒性)

学位論文内容の要旨

はじめに

興奮性アミノ酸(excitatory amino acid, 以下EAA)は、脳虚血、低血糖、てんかん、外傷に加え、種々の変性疾患でもその関与が示唆されている。変性疾患の中では、パーキンソン病患者剖検脳および、MPTP投与動物の中脳ドパミン(DA)ニューロンの減少にEAAが関与しているという報告が散見される。EAA、特にグルタミン酸のレセプターには三つのグループが知られ、NMDAレセプター、AMPA/Kainate(KA)レセプター、代謝調節型レセプターがある。それぞれに、subtype、isoformが数種類あり、イオンチャネルの特性、セカンドメッセンジャーとの結合様式に、多様な違いが見られ、さらに、その発現様式、分布にも特徴がある。グルタミン酸の、中脳DAニューロンに対する毒性が、どの様なレセプターを介しているかを明らかにすることは、レセプター発現の部位および神経細胞種特異性が示唆され、DAニューロンに対する特異的神経保護の可能性を見いだせる。一方、グルタミン酸刺激と、signal transduction systemについては、protein kinase C(PKC)、Ca/calmodulin dependent protein kinase II、tyrosine kinase、MAP kinaseなどの関与が示唆されている。本研究では、マウス培養中脳DAニューロンに対するEAA、特にグルタミン酸の神経毒性(GNT)を明かにし、関与するレセプターのサブタイプを特徴づけ、さらに、種々薬剤によるGNTのmodulationの可能性を検討した。

方法

1) 中脳DAニューロンの培養： 胎生13-14日、CD1マウスの中脳腹側のみをdissectして集め、0.25%トリプシン、0.02% DNaseを含むPBS (Ca, Mg-)にて37℃、20分incubateする。次いでtriturationにてsingle cellにdissociateする。poly-lysine(10μg/ml) でコートしたAclar cover slipにplateし、以後10% fetal bovine serumを含む、MEMにて維持する。培養3日目に、15μg/ml 5-fluorodeoxyuridine、40μg/ml uridineにてglia等の分裂細胞の増殖を阻止する。この処理は、2日間続ける。培養10-14日目で、実験に使用した。

2) Exposure to EAA： Mg(-)、10μM glycine加、HBSS(CaCl₂ 2.50mM, KCL 5.00mM,

NaCl 137.0mM, KH₂PO₄ 4.0mM, Na₂HPO₄ 0.3mM, glucose 5.6mM, HEPES 10mM, pH7.4)中で10分間、EAAに反応させた。通常の培養液に戻し、18-24時間後に評価を行った。

3) Tyrosine hydroxylase (TH) immunostaining: Coverslip上の細胞は、PBSで洗浄後4% paraformaldehydeで固定した。Eugintech社のrabbit polyclonal anti-TH antibodyとABC kit(Vector)により染色をし、DAニューロンのマーカーとした。

4) Dopamine uptake (DA/UT): 10mM HEPES, 0.6% glucose, 0.2mM pargyline, 0.01% ascorbic acidを含む、HBSSに[³H]dopamine (444GBq/mmol, final concentration 83.3nM)を加えた。この溶液中で、37°C 20分間、細胞をincubateした。細胞を洗浄後、0.2N NaOHで溶解し、scintillation vial中で放射活性を測定し、摂取率とした。これをもう一つのDAニューロンマーカーとした。

5) MAP2 immunostaining: Coverslip上の細胞は、-20°C 100% methanolで固定した。anti-MAP2 mouse monoclonal antibody (gift of Dr. V. Lee)とABC kitにより染色をし、トータルニューロンのマーカーとした。

結果

1) 培養DAニューロンに対するGNT: 50-200 μ M glutamate、10分間のexposure直後、細胞質のswellingが多くニューロンに認められたが、4-5時間後には、その殆どが、正常の形態に戻っていた。遅発性GNTは、18-24時間後に評価した。DAニューロン生存率は、33-45%と減少していた。DA摂取率は、50%に減っていた。

2) 選択性: GNTのDAニューロンとnon-DAニューロンに対する選択性は、全ニューロンをMAP2 陽性細胞として評価を行った。MAP2 positive のニューロン数も47%に減少しており、GNTのDAニューロンへの選択性は、明かでなかった。

3) レセプターサブタイプ: GNTは、NMDAレセプターの非競合性拮抗薬のMK801で、ほぼ完全に抑えられた。MK801は、200 μ Mのグルタミン酸にたいし、1 μ Mから有効性を示し、その作用は、10 μ Mで飽和状態となった。NMDA自体も、明かな神経毒性を示すことから、少なくとも、我々のシステムでは、GNTは、NMDAレセプターを介していると推察された。GNT (グルタミン酸 200 μ M 10分 exposure) は、KAレセプター拮抗薬のCNQX (50 μ M) では、全く抑制されなかった。カイニン酸は500 μ M以上の高濃度でしかも30分以上の暴露でなければ、明かな毒性を示さなかった。一方、glycineへの反応性 (glycineをexposing bufferより除くとGNTは、抑制される。) や、GNTがNMDAレセプターのglycine結合部位阻害剤の7-chlorokynurenic acidで抑えられることも、先の推察を支持する。

4) GNTへのPKCの関与: 10nM phorbol myristate acetate(PMA)、24時間の前処理によりPKCのdown regulationを起こしてやると、GNTが認められない。10nM、3時間の前処理では、このprotective effectは、認めなかった。PKC inhibitorであるstaurosporinの前処置では、明かな影響はなかった。

5) ガングリオシドのGNT抑制作用: ガングリオシドで2時間preincubationすると、GNTは、明らかに抑制される。GT1b 100 μ M 3時間の前処置では、ほぼ完全にblockされ

た。ガングリオシドはPKC translocation を阻害することが知られている。

6) Forskolin, okadaic acid, genisteinの影響: Forskolinは、adenylate cyclaseのactivatorで結果的にPKAを活性化する。本実験では、GNTに対して、僅かではあるが、明かな抑制効果を認めた。Phosphatase 1および、2Aのinhibitorである、okadaic acid、tyrosine kinase inhibitorであるgenisteinは、共に、影響を示さなかった。

考察

グルタミン酸、10分間のexposure後、一過性に細胞質のswellingが多くのニューロンに認められたが、これは、Choiらによれば、non-NMDA receptorを介してのNa⁺ionの流入によると考えられる。4-5時間後には、その殆どが、正常の形態に戻っていた。しかし、本実験でも明らかのように、カイニン酸による刺激も、高濃度、長時間に及べば、神経障害を引き起す。このような病態は、脳虚血、外傷などの急性疾患で推測される。一方、神経変性疾患に関与していると考えられるのは遅発性GNTであり、それはNMDA receptorを介した反応と本実験からも考えられた。GNTのtransmitter特異的な選択性、つまりニューロンのtransmitterの違いによりEAAに対する脆弱性が異なるという事実は、in vivo、in vitroで、おもに、海馬、線条体ニューロンについて報告されていたが、今回本実験で、中脳ニューロンについて初めて検討した。本実験ではGNTのDAニューロンへの選択性は、明かでなく、in vitroとin vivoの実験系の差異を考慮しなくてはならないが、GNTが、パーキンソン病の第一義的、かつ唯一の原因とは考え難いことが示唆された。DAニューロンに特徴的な代謝過程からoxidative stressとの相互作用が、今後の検討課題といえる。GNTへのPKCの関与については、すでに小脳顆粒細胞、大脳皮質細胞において、PMAの長時間前処理によりPKCのdown regulationを起こしてやると、GNTが認められないとの報告があるが、この現象が、EAA感受性ニューロンに一般的なものなのかどうかの検討はなされていなかった。ガングリオシドのprotective effectも合わせて考えると、PKCのGNTへの関与は、共通であると推測された。

結論

培養中脳DAニューロンに対する、GNTを検討した。EAAへの曝露後、TH positive cell数、及び、DA/UTは、それぞれ、40 %、50 %に減少した。しかし、MAP2 positive cell数も、同程度に減少し、パーキンソン病の原因への関与を推測する場合、oxidative stressなど他のメカニズムとの共働を、考慮しなければならない。

GNTがNMDAレセプターを介していることを、以下の点より、明らかにした。

- 1) GNT が、MK801で完全に抑えられる。
- 2) NMDAそれ 自体によるGNT。
- 3) GNTはCNQXでは抑制されない。
- 4) NMDAレセプターのmodulatorに対する反応性。

さらに、PMA、ガングリオシドによるprotective effectを明らかにした。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 代 邦 雄
副 査 教 授 小 山 司
副 査 教 授 本 間 研 一

学 位 論 文 題 名

Glutamate neurotoxicity in mesencephalic dopaminergic neurons in culture

(培養中脳ドパミンニューロンにおけるグルタミン酸の神経毒性)

興奮性アミノ酸(excitatory amino acid, 以下EAA)は、脳虚血、低血糖、てんかん、外傷に加え、種々の変性疾患でもその関与が示唆されている。変性疾患の中では、パーキンソン病患者剖検脳および、MPTP投与動物の中脳ドパミン(DA)ニューロンの減少にEAAが関与しているという報告が散見される。EAA、特にグルタミン酸のレセプターには三つのグループが知られ、それぞれに、subtype、isoformが数種類あり、イオンチャネルの特性、セカンドメッセンジャーとの結合様式に、多様な違いが見られ、さらに、その発現様式、分布にも特徴がある。一方、グルタミン酸刺激と、signal transduction systemについては、protein kinase C(PKC)、Ca/calmodulin dependent protein kinase II、tyrosine kinase、MAP kinaseなどの関与が示唆されている。本研究では、マウス培養中脳DAニューロンに対するEAA、特にグルタミン酸の神経毒性(GNT)を明かにし、関与するレセプターのサブタイプを特徴づけ、さらに、種々薬剤によるGNTのmodulationの可能性を検討した。方法：1) 中脳DAニューロンの培養は、胎生13-14日、CD1マウスの中脳腹側を0.25%トリプシンとtriturationにてsingle cellとして用いた。10% fetal bovine serumを含む、MEMにて維持した。培養10-14日目、実験に使用した。2) EAAへのexposureは、Mg(-)、10 μ M glycine加、HBSS中で10分間行った。通常の培養液に戻し、18-24時間後に評価を行った。3) Tyrosine hydroxylase(TH) immunostainingはEugintech社のrabbit polyclonal anti-TH antibodyにより染色をし、DAニューロンのマーカーとした。4) Dopamine 摂取率をもう一つのDAニューロンマーカーとした。5) MAP2 immunostainingは anti-MAP2 mouse monoclonal antibodyにより染色をし、トータルニューロンのマーカーとした。結果：1) 培養DAニューロンに対するGNT： 50-200 μ M glutamate、10分間のexposure後、18-24時間後に評価した。DAニューロン生存率は、33-45%と減少してい

た。DA摂取率は、50%に減っていた。2) 選択性: GNTのDAニューロンとnon-DAニューロンに対する選択性は、全ニューロンをMAP2 陽性細胞として評価を行った。MAP2 positiveのニューロン数も47%に減少しており、GNTのDAニューロンへの選択性は、明かでなかった。3) レセプターサブタイプ: GNTは、NMDAレセプターの非競合性拮抗薬のMK801で、ほぼ完全に抑えられた。NMDA自体も、明かな神経毒性を示すことから、少なくとも、我々のシステムでは、GNTは、NMDAレセプターを介していると推察された。GNT (グルタミン酸 200 μ M 10分 exposure) は、KAレセプター拮抗薬のCNQX (50 μ M) では、全く抑制されなかった。カイニン酸は500 μ M以上の高濃度でしかも30分以上の暴露でなければ、明かな毒性を示さなかった。一方、glycineへの反応性や、GNTがNMDAレセプターのglycine結合部位阻害剤の7-chlorokynurenic acidで抑えられることも、先の推察を支持する。4) GNTへのPKCの関与: 10nM phorbol myristate acetate(PMA)、24時間の前処理によりPKCのdown regulationを起こすと、GNTが認められない。5) ガングリオシドのGNT抑制作用: ガングリオシドで2時間preincubation すると、GNTは、明らかに抑制される。GT1b 100 μ M 3時間の前処置では、ほぼ完全にblockされた。ガングリオシドはPKC translocation を阻害することが知られている。6) Forskolin, okadaic acid, genisteinの影響: Forskolinは、GNTに対して、僅かではあるが、明かな抑制効果を認めた。okadaic acid、genisteinは、共に、影響を示さなかった。考察: 1) 遅発性GNTはNMDA レセプターを介した反応と考えられた。2) GNTのtransmitter特異的な選択性は、おもに、海馬、線条体ニューロンについて報告されていたが、中脳ニューロンについて検討したのは、本実験が初めてである。本実験ではGNTのDAニューロンへの選択性は、明かでなく、GNTが、パーキンソン病の第一義的、かつ唯一の原因とは考え難いことが示唆された。DAニューロンに特徴的な代謝過程からoxidative stressとの相互作用が、今後の検討課題といえる。3) GNTへのPKCの関与については、すでに小脳顆粒細胞、大脳皮質細胞において、PMAの長時間前処理によりPKCのdown regulationを起こすと、GNTが認められないとの報告があるが、この現象が、EAA感受性ニューロンに一般的なものなのかどうかの検討はなされていなかった。ガングリオシドのprotective effectも合わせて考えると、PKCのGNTへの関与は、これらEAA感受性細胞に共通であると推測された。