

学 位 論 文 題 名

1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine 誘導サルParkinson病モデルにおける brain-derived neurotrophic factorの神経保護作用

学位論文内容の要旨

近年神経成長因子(nerve growth factor : NGF)を始めとする神経栄養因子に関する知見が急速に深まり,基礎的実験にとどまらず臨床応用の報告も散見されるようになってきた。脳由来神経栄養因子(brain-derived neurotrophic factor : BDNF)は neurotrophin-3 (NT-3), neurotrophin-4/5 (NT-4/5) とともにNGF familyを形成する塩基性蛋白であり,ニワトリ胚脊髄知覚神経の栄養因子として知られていた。

1992年HymanらがBDNFがratの培養黒質ニューロンの生存・維持に促進的な働きをし,1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+)の毒性に対し保護的な作用をも有することを*in vitro*で証明して以来,BDNFは黒質ドパミンニューロンのtrophic factorとして,特に特発性Parkinson病との関連からその生理的な意義が注目されている。

その後,ratを用いたunlesionedモデルでBDNFがドパミンニューロンの働きを促進することが示されていたが,6-hydroxydopamine (6-OHDA)やaxotomyによるlesionedモデルでは必ずしも細胞傷害に対し保護的な作用を示さないこともあり,*in vivo*の実験系におけるBDNFの作用にはいまだ議論が多い。また,よりヒトに近いprimatesでの知見も欠如していた。

本研究ではBDNFの中脳黒質ドパミンニューロンに対する*in vivo*での作用を,1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)にて誘導したサルParkinson病モデルを用いて検討した。

体重7kg前後の日本サルのメス成獣12頭に以下の投与計画に従いMPTPを全身投与しParkinson病モデルを作成した。

group I: 正常対照群(n=2), group II: MPTP 15mgを浸透圧ポンプ(Alzet: 2ML2, mean pumping rate 5 μ ml/hour)にて14日間持続静脈内投与(n=2), group III: MPTP 5mgをday 0,4,7にbolusに静脈内投与(n=2), group IV: MPTP 5mgをday 0および4にbolusに静脈内投与(n=6)。

group Iを除く各groupの実験動物の半数はBDNFの投与を受け,他の半数は対照

群とした。BDNF投与群には1 μ g/mlのBDNF蛋白を含むChinese hamster ovaryの培養液を浸透圧ポンプ(Alzet 2ML2:mean flow rate 5 μ l/hour)に充填し、day 0に全身麻酔下大槽内に留置したシリコンチューブに接続し後頭部皮下に埋め込んだ。これにより総量6.5 μ lのBDNFが14日間にわたり髄腔内に投与された。対照群にはBDNF活性のない培養液を同様に投与した。

術後、連日実験動物の神経学的所見を観察し、day14にpentobarbitalによる深麻酔下にscarificeし、摘脳後組織学的検索を行った。神経学的所見はKurlanらのMonkey Parkinsonism Rating Scale (MPRS)を用いてParkinsonismをtremor, posture, gait, bradykinesia, balance, gross motor skills, defence reactionの7つに要素化し重症度を定量化した。

摘出した脳はただちに10%ホルムアルデヒド緩衝液にて浸潤固定した。脳を前頭極と後頭極を結ぶ線に平行に切り出し、中脳黒質を含む厚さ6 μ mの切片を作成し、Hematoxylin - eosin染色を行った。組織学的検索はpars compacta内側部、中央部、外側部の3部分に分けて行い、単位面積当たりの細胞数および計測可能な神経細胞の面積をイメージアナライザー(Olympus VIDEO MICROMETER VM-30)を用いて算出した。

group II (MPTP 15mg 14日間持続静注)のサルはBDNF投与群、非投与群ともに14日間の観察期間を通して無症状であった。group III (MPTP 5mg 3回静脈内投与)のサルはBDNF投与群、非投与群ともに第1週後半から重度のParkinsonismを呈し、その症状、重症度に明らかな差はなかった。group IV(MPTP 5mg 2回静脈内投与)では、BDNF非投与群の3頭のサルは第1週後半から重篤なParkinsonismを呈し、経口摂取が不能となり、manual feedingにて水分およびヒト治療用流動食を補給した。

Parkinsonismの内容を検討するとdefence reactionの障害が早期に出現し、それにやや遅れてgait, bradykinesia, balance, gross motor skills, postureの障害が続いた。tremorはさらに遅れて出現し、その程度も軽かった。

これに対し、group IVのBDNF投与群ではParkinsonismはより遅く第2週に出現し、その程度も比較的軽度であった。

症状別に見ると、tremorはほとんど出現せず、その他の症状は第2週中盤にはほぼ同時に出現しており、その程度もBDNF非投与群に比べより軽度であった。

これらの症状をMPRSにて定量化し検討するとBDNF非投与群ではday4以降急激にスコアが上昇するのに対し、BDNF投与群では遅れて第2週に上昇し、その増分も少ないため、day6以降で両group間にスコアの有意な差を示した。

MPTPの投与を受けたgroup II-IVの中脳黒質pars compactaでは、BDNF投与群および非投与群共通に、神経細胞の胞体の膨化、chromatolysis、一部核の消失と神経細胞の減少およびそれに伴うグリア細胞の増生が認められた。これらの所見は特にpars compacta内側部で明らかであった。

組織学的所見は臨床症状とよく相関しており、重篤なParkinsonismを呈したBDNF非投与群のpars compactaでは神経細胞の減少が著明であった。対してBDNF投与群のサルでも同様の所見は観察されたが、程度は比較的軽度であった。BDNF投与群、非投与群とも正常対象群に比べ有意に細胞数が減少しており、その細胞面積の平均値も小さかったが、BDNF投与群と非投与群との間にはどの部位をとっても細胞数、細胞面積とも有意差を認めなかった。

しかしpars compacta全体の細胞を大きさにより分けて比較すると、group IVでは面積 $250\mu\text{m}^2$ 以上の細胞数は有意にBDNF投与群に多く、面積 $250\mu\text{m}^2$ 以下の細胞数は非投与群に多い傾向が認められた。

BDNFの投与の有無によらず、細胞面積 $250\mu\text{m}^2$ 以上の残存細胞数はMPRSと負の相関を、細胞面積 $250\mu\text{m}^2$ 以下の残存細胞数は正の相関を示し、光顕所見を勘案すれば、それぞれニューロンの変性、壊死と、それに続くグリア細胞の増生に対応するものと考えられた。

以上の結果からBDNFがMPTPによる黒質ニューロンの細胞死を抑制し、その機能を部分的にはあるが保存した事が示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 阿 部 弘

副 査 教 授 田 代 邦 雄

副 査 教 授 長 嶋 和 郎

学 位 論 文 題 名

1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine 誘導サルParkinson病モデルにおける brain-derived neurotrophic factorの神経保護作用

近年神経栄養因子に関する知見が急速に深まり、基礎的実験にとどまらず、臨床応用の報告も散見されるようになってきた。神経変性疾患ではAlzheimer病や筋萎縮性側索硬化症に対する臨床研究が試みられているが、Parkinson病に関しては未だ予備段階である。本研究ではbrain-derived neurotrophic factor (BDNF)のドパミンニューロンに対する保護作用を1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)により誘導したサルParkinson病モデルにて検討した。

体重7kg前後の日本サルのメス成獣12頭を用い、最低2週間の観察期間の後、1 μ g/mlのBDNF蛋白を含むChinese hamster ovaryの培養液6.5mlを、浸透圧ポンプ(Alzet 2ML2, mean pumping rate 5 μ l/hour)に充填し、皮下に埋め込んだ。このポンプより大槽内に留置した17ゲージの翼状針を介して、総量6.5 μ gのBDNFが2週間にわたり持続的に髄腔内に注入された。BDNF非投与群にはBDNF活性のないChinese hamster ovary培養液が同様にして髄腔内に投与された。

次に以下の投与計画に従いMPTPを全身投与し、重症度の異なるParkinson病モデルを作成した。I群：MPTPもBDNFも投与せず正常対照群とした(2頭)。II群：MPTP 15mgを浸透圧ポンプ(Alzet 2ML2)にて14日間持続静脈内投与した(BDNF投与、非投与各1頭)。III群：MPTP 5mgをday 0, 4および7の計3回bolusに静脈内投与した(BDNF投与、非投与各1頭)。IV群：MPTP 5mgをday 0および4の計2回bolusに静脈内投与した(BDNF投与、非投与各3頭)。

術後2週間にわたり神経学的所見を観察し、Monkey Parkinsonism Rating Scale (MPRS)にてParkinsonismをtremor, gait, bradykinesia, balance, gross motor skills, defence reactionの7つに要素化し重症度を定量化した。

実験動物は2週間後にsacrificeし、中脳黒質の組織所見を観察した後、イメージアナライザー(OLYMPUS VIDEOMICROMETER VM-30)にて細胞数および細胞面積を計測し、定量化を行った。

実験期間中I群およびII群のサルはすべて無症状であった.III群ではBDNFの投与の有無によらず重篤なparkinsonismを呈し、day 14のMPRSも両群とも17であり、差は認められなかった. IV群のBDNF非投与群では、第1週後半にdefence reactionが消失し、歩行障害、bradykinesiaが出現した. さらに第2週には経口摂取も不可能となり重篤なparkinsonismを呈した.これに対してBDNF投与群では、第1週は無症状であり、第2週中盤により軽度のparkinsonismを呈したにとどまった. BDNF投与群と非投与群の間にday 6以降MPRS上有意な差が認められ(day 6-10: $p<0.01$, day 11-: $p<0.05$), day 14のMPRSの平均値はそれぞれ5および17であった.

病理学的にはparkinsonismを呈したサルで著明な神経細胞の脱落と、グリア細胞の増生が見られ、臨床症状とよく相関していた. IV群において神経細胞の脱落はBDNF非投与群に比べ、BDNF投与群で有意に少なかった($p<0.01$).

これらの結果より、霊長類のParkinson病モデルにおけるBDNFのドパミンニューロンに対する保護的作用が明らかとなった.より高力価のBDNFの精製、BDNF分泌細胞の中樞神経系内への植え込み、脳血液関門を通過する製剤の開発等による特発性Parkinson病への臨床応用の可能性が示された.

本研究は、Parkinson 病に対する BDNF の臨床応用を行う際に、非常に有意義な研究と考えられ、学位授与に値する.