

博士（獣医学）丸山 豊

学位論文題名

内因性ドパミン神経毒 6,7-dihydroxy-
1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (norsalsolinol) の
ドパミン分泌に与える影響とその細胞内動態

学位論文内容の要旨

パーキンソン氏病は未知の原因により黒質-線条体系のドパミン作動性神経の傷害によつて発生すると考えられている。パーキンソン氏病の大部分を占める孤発性パーキンソン氏病は55歳齢以上の約1%に発症することが知られているが、その発症原因は未だ不明である。

ドパミンとアルデヒドの縮合により生成されるアルカロイドである 6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline 誘導体 (DHTIQs)がヒト脳内に存在することが確認されている。実験動物の脳室内投与や培養細胞への曝露による実験から、DHTIQs はドパミントransporter (DAT)を介して細胞内に取り込まれ、細胞死を引き起こすことが明らかとなっている。しかし、これらパーキンソン氏病惹起候補物質による神経伝達物質の分泌などの神経機能に対する影響についてはほとんど明らかになっていない。一方、ホルムアルデヒドとドパミンの縮合 (Pictet-Spengler 反応) によって生体内で産生される 6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (norsalsolinol)は、パーキンソン氏病患者では健常者に比較して脳脊髄液や尿中の濃度が上昇していることが報告されている。そこで本研究では、ドパミン作動性神経細胞のモデル細胞として汎用されているラット褐色細胞腫 PC12 細胞を用い、パーキンソン氏病惹起候補物質である norsalsolinol が PC12 細胞のドパミン分泌に与える影響を検討した。さらに PC12 細胞への細胞内取込み経路および細胞内動態についても検討した。

Norsalsolinol の 12 時間の前処置は静止時の自発的分泌には影響を与えたかったのに対し、50 mM KCl あるいは 100 μM ATP 刺激時の PC12 細胞からのドパミン分泌を濃度依存的に抑制した。Norsalsolinol によるドパミン分泌の抑制は処置後 10 時間以降に認められ、短時間の曝露では観察されなかった。神経伝達物質の分泌は細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の上昇に依存している。従って、PC12 細胞の分泌刺激による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇、および β -escin により膜のイオン透過性を増大させた PC12 細胞（膜透過性細胞）における分泌装置の Ca^{2+} 感受性に対する norsalsolinol の影響を検討した。Norsalsolinol 前処置によっても静止時、および刺激時の $[\text{Ca}^{2+}]_i$

は有意な差は認められなかった。従って、norsalsolinol によるドパミン分泌抑制は $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の阻害によるものではないと考えられた。一方、膜透過性 PC12 細胞における Ca^{2+} 誘発性ドパミン分泌は norsalsolinol の前処置により有意に減少したことから、norsalsolinol は分泌装置に影響を与えていた可能性が考えられた。Norsalsolinol はその構造がドパミンと類似していることからドパミン分泌を抑制する受容体である D₂ ドパミン受容体を活性化することが考えられた。しかし、D₂ ドパミン受容体阻害薬 (sulpiride, 50 μM) は norsalsolinol によるドパミン分泌抑制を解除しなかったことから、norsalsolinol によるドパミン分泌は D₂ ドパミン受容体の活性化によるものではないと考えられた。

パーキンソン氏病惹起物質は、DAT に親和性を有することでドパミン作動性神経細胞への作用の特異性が獲得されると考えられている。PC12 細胞を norsalsolinol に曝露することにより、norsalsolinol の細胞内への蓄積が観察された。DAT 阻害薬 GBR-12909 の前処置、外液 Na⁺ の除去によりこの蓄積が抑制されることから、PC12 細胞内への取り込みには DAT が主に関与することが明らかになった。また、norsalsolinol の取り込みは DAT の内因性基質であるドパミンによって競合的に抑制されたことから、ドパミンと norsalsolinol は DAT の同一の基質認識部位によって認識されることが明らかとなった。

精製分泌顆粒を用いた取り込み実験において、分泌顆粒性モノアミントransporter (VMAT) の阻害薬である reserpine や VMAT の内因性基質であるドパミンによって norsalsolinol の取り込みが抑制されたことから、分泌顆粒中への取り込みには VMAT の関与が予想された。Norsalsolinol を前処置した PC12 細胞より作製したホモジネートのショ糖密度勾配遠心により、norsalsolinol とドパミンの局在パターンは類似していることが明らかになった。さらに、norsalsolinol を前処置した PC12 細胞に分泌刺激を与えるとドパミンと norsalsolinol の放出が観察された。また、両者の分泌の時間経過は一致していた。以上から、DAT によって細胞内に取り込まれた norsalsolinol は VMAT を介して分泌顆粒内に取り込まれ、ドパミンと共に存していることが明らかとなった。

以上の成績は、norsalsolinol がドパミン作動性神経細胞の分泌を抑制することを示す。この機序として transpoter、あるいは貯蔵部位におけるドパミンと norsalsolinol の競合によるドパミンのホメオスタシスの異常が関与するのかかもしれない。Norsalsolinol はホルムアルデヒドとドパミンの縮合によって生成されるが、ホルムアルデヒドはメタノールやアンチピリンなどの薬物の代謝によっても発生することから、孤発性パーキンソン氏病のみではなく、薬剤性パーキンソン氏病症候群の発生にも関与する可能性が考えられる。本研究の成績は、パーキンソン氏病の発症には黒質ドパミン作動性神経細胞の傷害に加えて、ドパミン分泌抑制の可能性を示唆するものである。パーキンソン氏病惹起物質の探索には、細胞傷害作用に加え、神経機能に対する影響も検討する必要があると考えられる。

学位論文審査の要旨

主査教授 藤田正一
副査教授 葉原芳昭
副査教授 伊藤茂男
副査助教授 数坂昭夫

学位論文題名

内因性ドパミン神経毒 6,7-dihydroxy- 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (norsalsolinol) の ドパミン分泌に与える影響とその細胞内動態

パーキンソン氏病は黒質ドパミン神経細胞の選択的変性・脱落による神経変性疾患である。内因性ドパミン神経毒 6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines (DHTIQs) が原因物質として疑われている。しかし、DHTIQs に関しては、神経細胞傷害作用について報告されているものの、神経伝達物質分泌に対する影響や細胞内動態等についてあまり研究されていない。申請者は、神経成長因子処置により神経細胞様に分化させた PC12 細胞を用い、DHTIQs の一種である norsalsolinol (NS) のドパミン分泌に与える影響とその細胞内動態について検討し、以下の結果を得た。

ATP (100 μ M) および K⁺ (50 mM) 刺激によるドパミン分泌は、前処置した NS 濃度 (1 – 100 μ M) に依存して抑制された。NS (30 μ M) の前処置により刺激時の細胞内 Ca²⁺濃度変化は影響を受けなかったが、 β -escin 処置による高透過性細胞の Ca²⁺誘発性ドパミン分泌は NS により抑制された。NS 前処置後、細胞に分泌刺激を与えると、ドパミン分泌量に比例する NS の放出が認められた。NS はドパミントランスポーターを介して細胞内に取り込まれた。また、NS は分泌顆粒性モノアミントランスポーターを介して精製分泌顆粒内に取り込まれた。

以上の成績から、申請者は、NS によるドパミンの取り込み阻害による分泌顆粒のドパミン含量の低下によりドパミン分泌抑制が引き起こされるとの結論を得た。また、NS はドパミンと同様の細胞内動態を示すことが明らかとなった。これらの知見は、パーキンソン氏病あるいは薬

剤性パーキンソンズムの発症メカニズム解明に大きく貢献すると考えられた。よって、審査委員一同は、上記博士論文提出者丸山 豊氏は博士（獣医学）の学位を受けるのに充分な資格を有するものと判断した。