

学位論文題名

ROLE OF BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR
IN WOBBLER MOUSE MOTOR NEURON DISEASE

(ウォブラーマウス運動ニューロン疾患における
脳由来神経栄養因子の役割)

学位論文内容の要旨

背景と目的

筋萎縮性側索硬化症をはじめとするいわゆる運動ニューロン疾患では、原因として一酸化窒素 (NO) を介した神経細胞の障害などが言われているが、未だ不明点は多く、治療の道も開かれていない。その中で、脳由来神経栄養因子 (BDNF) は各種の実験系や、運動ニューロン疾患の動物モデルであるウォブラーマウスの脊髄前角細胞の変性を防御することが知られており、運動ニューロン疾患の治療の有力候補となっている。しかし、BDNF が運動ニューロン変性にあたってどのような動態を示すか、BDNF がどうやって変性から神経細胞を守るのか、不明点が多い。今回我々は、ウォブラーマウスを用いて神経細胞変性における BDNF の発現の状況、また、それが一酸化窒素合成酵素といかに関連しているかを検索したので報告する。

対象と方法

内因性 BDNF の発現を評価するため、運動ニューロン疾患を発症する生後4週目と症状がかなり進行した8週目のウォブラーマウスの、障害部位 (C5) と非障害部位 (L3)、さらには正常マウスの C5 の脊髄前角における BDNF の免疫染色性を半定量的画像解析法 (semiquantitative video-image analysis) を用いて評価した。また、生後4週目から4週にわたって BDNF を投与したウォブラーマウスの頸髄 (C6) において、NADPH-d 組織科学で染まる運動ニューロンの数を BDNF 非投与群と比較し、BDNF が一酸化窒素合成酵素 (NOS) 活性に与える影響を間接的に調べた。

結果

半定量的画像解析法を用いると、生後4週及び8週ウォブラーマウスの障害部位 (C5) 前角の BDNF 免疫組織染色における光学的染色濃度 (optical density) は、同年齢の正常マウスの C5

前角の光学的染色濃度に比べ有意に上昇していた。さらに、4週齢ウォブラーマウスのC5前角は、L3に比し明らかにBDNF光学的染色濃度が上昇していた。また、4週齢ウォブラーマウスのL3では正常のそれとBDNF光学的染色濃度は有意な差はなかった。また、正常マウスでは染色されないNADPH-d染色で、8週齢ウォブラーマウスの脊髄前角細胞は小数だが染色され、外的にBDNFを皮下注射する事により染色された前角細胞の数は有意に減少した($p=0.002$)。以上より、障害部位での内因性のBDNFの増加は障害を受けた脊髄前角運動ニューロンに対する代償的なものと考えられたが、内因性の増加だけでは障害の機転を変えるに至らず、外的に大量のBDNFを加えることにより、はじめて一酸化窒素合成酵素の発現を抑制し、運動ニューロンの変性を抑制すると思われた。このことからBDNFは、一酸化窒素を介した運動ニューロンの変性抑制に重要な役割を担っていることが示唆され、神経変性疾患の原因解明および治療への手がかりになると思われた。

学位論文審査の要旨

主査 教授 田代邦雄
副査 教授 長嶋和郎
副査 教授 真野行生

学位論文題名

ROLE OF BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR IN WOBBLER MOUSE MOTOR NEURON DISEASE

(ウォブラーマウス運動ニューロン疾患における
脳由来神経栄養因子の役割)

筋萎縮性側索硬化症をはじめとする運動ニューロン疾患では、原因として一酸化窒素 (NO) を介した神経細胞の障害などが挙げられているが、未だ不明点は多く、治療の道も開かれていない。その中で、脳由来神経栄養因子 (BDNF) は各種の実験系や、運動ニューロン疾患の動物モデルであるウォブラーマウスの脊髄前角細胞の変性を防御することが知られており、運動ニューロン疾患の治療の有力候補となっている。本研究では、ウォブラーマウス脊髄の BDNF 免疫組織染色切片を半定量的画像解析法で解析し、BDNF の発現、分布を調べ、ウォブラーマウスの脊髄前角細胞の一酸化窒素合成酵素 (NOS) の発現と、それが BDNF の投与で変化するかを調べた。半定量的画像解析法を用いると、生後4週及び8週ウォブラーマウスの障害部位 (C5) 前角の BDNF 免疫組織染色における光学的染色濃度は、同年齢の正常マウスの C5 前角の光学的染色濃度に比べ有意に上昇していた。さらに、4週齢ウォブラーマウスの C5 前角は、非障害部位 (腰髄 L3) に比し明らかに BDNF 光学的染色濃度が上昇していた。また、4週齢ウォブラーマウスの L3 では正常のそれと BDNF 光学的染色濃度は有意な差はなかった。また、NOS の分布に一致する NADPH-d 組織化学染色で、8週齢ウォブラーマウスの脊髄前角細胞は染色され、外的に BDNF を筋肉注射する事により、染色された前角細胞の数は有意に減少した ($p=0.002$)。以上より、障害部位での内因性の BDNF の増加は障害を受けた脊髄前角運動ニューロンに対する代償的なものと考えられたが、内因性の増加だけでは障害の機転を変えるに至らず、外的に大量の BDNF を加えることにより、はじめて一酸化窒素合成酵素の発現を抑制し、運動ニューロンの変性を抑制すると思われた。

公開発表にあたって、副査の長嶋教授から、BDNF を障害部位である上肢筋では

なく下肢筋に投与した理由についての質問があった。申請者は、ウォブラーマウスの上肢はきわめて小さく、技術的にも難しい上、筋肉注射そのものによる筋損傷で上肢筋力の評価ができなくなるのを避けるためと回答した。次に、ウォブラーマウスの脊髄前角の空胞変性の出現機序についての質問があった。申請者は、未だ解明されておらず、これからの研究課題であると回答した。次に、ウォブラーマウス脊髄の BDNF 受容体の発現、分布の変化についての質問があった。申請者は、この点も今回は明らかにできず、今後の研究課題であると回答した。次いで、副査の真野教授より、ウォブラーマウスと人間の運動ニューロン疾患の関係についての質問があった。申請者は、今までの文献等を引用し、若年発症である Kugelberg-Welander 病や Werdnig-Hoffmann 病に近いが、最近では筋萎縮性側索硬化症の薬物治療の研究に使われていると回答した。次に、空胞変性と BDNF 発現増加の時間的關係についての質問があった。申請者は、BDNF 発現増加は代償性のものであると考えるので、変性過程が先に始まると思われると回答した。次に、8週以降のウォブラーマウスの症状経過と BDNF 発現についての質問があった。申請者は8週以降、症状は鎮静化するが、8週以降の BDNF については今回検索していないと回答した。最後に、主査の田代教授から、BDNF の臨床応用の現状についての質問があった。申請者は、文献等を引用し、結局 BDNF の人間への臨床応用の試みは現時点では成功していないと回答した。次に、ウォブラーマウスにおける他の神経栄養因子ならびに多剤併用療法についての質問があった。申請者は、文献、自験例をあげて CNTF、GDNF、CT-1 などに効果があったこと、またスライドを用いて多剤併用がさらに有効と思われると回答した。

本研究は、運動ニューロンの変性過程における BDNF の動態を明らかにし、その BDNF が NO を介した神経細胞死を抑制するというを示し、今後、人間の運動ニューロン疾患における原因解明、治療へとつながる研究であることが期待された。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。