

学位論文題名

脳虚血誘発神経細胞死に対する GDNF の防御効果

学位論文内容の要旨

1. はじめに

脳虚血に対し中枢神経系はきわめて脆弱であり、いかに神経細胞を虚血侵襲から保護し、また機能を保持するかが脳虚血研究の主要課題である。局所脳虚血における脳梗塞辺縁部や全脳虚血における海馬 CA1 領域においては、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇、細胞内フリーラジカルの産生、ミトコンドリア機能不全などに起因したネクロシスとアポトーシスとの複合的な機序によって選択的に細胞死を誘発すると考えられている。今回、ラット脳虚血に誘発される神経細胞死のメカニズム解明を目的に、カルシウムチャネル拮抗作用およびカルモジュリン阻害作用を有するジヒドロピリジン誘導体 CV-159 の作用、およびグリア細胞株由来神経栄養因子 GDNF の役割について検討を行った。

2. 結果および考察

1) 脳虚血障害に対するカルシウム拮抗薬 CV-159 の保護効果

一過性前脳虚血に伴って、海馬 CA1 領域に選択的な遅発性神経細胞死が誘発される。今回、脳虚血の 2 時間前に CV-159 (10 mg/kg, p.o.) を投与すると、有意な神経細胞死保護効果が認められた。また中大脳動脈閉塞による脳梗塞および脳浮腫の誘発を顕著に抑制した。一方、対照薬の nicardipine および nifedipine はこれら脳虚血障害に対し有効性を示さなかった。以上の結果から、急性期における脳血管障害、とくに神経細胞死や脳梗塞を伴う虚血性脳疾患に対し、CV-159 は予防あるいは治療薬として有用であることを示唆した。

2) ラット一過性前脳虚血における GDNF の発現変化

15 分間のラット一過性前脳虚血を施すことによって、海馬および大脳皮質に虚血 6 時間後をピークとする GDNF mRNA 発現の誘導が認められた。とくに海馬 CA1 領域では遺伝子発現の変化に伴って GDNF 産生量が増加し、脳虚血 3 日後の遅発性神経細胞死誘発と同時に GDNF 量の減少を示した。正常動物および脳虚血急性期において、GDNF の産生細胞は主として神経細胞であることが免疫組織化学的検討から明らかとなったが、遅発性神経細胞死に伴って海馬 CA1 領域の GDNF 産生細胞は散在性を示し、虚血誘発反応性アストロサイトが GDNF を産生することを見出した。このようなことから、脳虚血に伴う GDNF の発現上昇、および海馬 CA1 領域における虚血誘発反応性アストロサイトの GDNF 産生は海馬

神経細胞死に深く関与していることが示唆された。

3) GDNF の遅発性神経細胞死保護作用

一過性前脳虚血に誘発される GDNF 発現の役割を明らかにするため、海馬 CA1 領域あるいは脳室内に GDNF の微量投与を試みた。一過性前脳虚血の 20 分前に GDNF (1.0 $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$) を CA1 領域に直接投与することによって、遅発性神経細胞死は有意に抑制されることが明らかとなった。また、脳室内投与 (2.5 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$) によって、両側海馬の神経細胞死が有意に抑制された。さらに、TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling) 染色の検討から、GDNF は海馬におけるアポトーシス様神経細胞死を抑制することが示唆された。これらのことから、GDNF は *in vivo* モデル動物において、アポトーシス様神経細胞死を抑制する可能性を示唆し、脳虚血誘発海馬遅発性神経細胞死に対して生存・保護因子として重要な役割を果たしていることが示唆された。

4) 神経細胞死に対する GDNF の保護機構

一過性前脳虚血に伴って、海馬では glutamate の放出と同時に dopamine (DA) の過剰放出が引き起こされ、海馬神経細胞死に対して憎悪因子として作用することが知られている。また、GDNF は DA ニューロンに対して強い賦活作用を有することから、海馬における DA ニューロンに対する GDNF の作用を検討したところ、GDNF は tyrosine hydroxylase (TH) の発現を誘導する一方で、脳虚血ストレスに誘発される TH の過剰発現を顕著に抑制することが明らかとなった。TH の発現は、mitogen-activated protein kinase を介した細胞内シグナル伝達により調節をうけていることが知られている。また、TH の発現は D₂ 受容体および DA transporter を介した DA の取り込みによって調節をうけている。このようなことから GDNF は DA の取り込みを促進すると同時に、細胞内情報伝達系を介して TH 遺伝子の発現上昇を調節している可能性が示唆された。

GDNF は GDNF family receptor $\alpha 1$ (GFR $\alpha 1$) 受容体と結合して複合体を形成し、Ret receptor tyrosine kinase (Ret) と会合することにより細胞内の情報伝達を活性化することが知られている。このようなことから、GDNF の神経細胞死保護機構を解明する目的で、各受容体発現およびこれら受容体を介する細胞内シグナル伝達経路の活性化について検討を行った。その結果、脳虚血に伴って海馬の Ret 発現が誘導されると同時に、GDNF によって発現調節されている可能性が示唆された。また、GDNF によって Ret のチロシンリン酸化が誘発され、extracellular signal-regulated kinase (ERK) および phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) / serine-threonine kinase (Akt) のリン酸化を誘導することが明らかとなった。さらに、cAMP response element binding protein (CREB) のリン酸化を誘導し、これらの活性化が TH 遺伝子の発現調節を含む GDNF の神経細胞死抑制機構および神経細胞の生存維持に関わっているものと考えられた。

5) 老化促進モデルマウス SAM における GDNF 発現の加齢変化

老化促進モデルマウス SAM の加齢に伴う GDNF 発現の変化を検討した結果、SAMP8 お

よび SAMP10 の若齢期（2 ヶ月齢）において、海馬における GDNF 発現量は SAMR1 に比して有意に減少していた。また、SAMP8 および SAMP10 の海馬 CA1 領域における神経細胞数は加齢に伴って減少することが明らかとなった。このことから、GDNF は加齢に伴った海馬機能低下、および海馬 CA1 領域の神経細胞死に対し重要な役割を担っていることが示唆された。若齢期における GDNF 発現量の低下は、その後の成長過程における神経細胞死、および海馬の学習記憶能に関連する機能障害の一因をなしているのかも知れない。

以上、本研究結果は GDNF の神経細胞死保護作用を明らかにし、臨床における脳虚血障害に対する有用性を示唆し、今後の臨床応用が期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 野 村 靖 幸
副 査 教 授 鈴 木 利 治
副 査 助教授 大 熊 康 修
副 査 助教授 松 岡 一 郎

学 位 論 文 題 名

脳虚血誘発神経細胞死に対する GDNF の防御効果

申請者は、ラット脳虚血に誘発される神経細胞死のメカニズム解明を目的にジヒドロピリジン誘導体カルシウム拮抗薬 CV-159 の作用、および神経栄養因子 GDNF の保護効果について種々検討を行った。CV-159 は脳虚血に伴う細胞障害を抑制し、急性期脳血管障害の予防あるいは治療薬として有用であることを示唆した。また、神経栄養因子 GDNF の神経細胞死に対する保護効果を明らかにし、GDNF の臨床応用の可能性を示唆した。老化に伴う海馬機能低下に対する GDNF の役割についても新たな知見を得た。

CV-159 はカルモジュリン阻害作用を併せ持つユニークなカルシウム拮抗薬であり、一過性前脳虚血に伴う海馬の遅発性神経細胞死に対し顕著な保護効果を有し、また中大脳動脈閉塞による脳梗塞および脳浮腫の誘発を顕著に抑制することを明らかにした。Nicardipine 等のカルシウム拮抗薬による改善効果は認められなかったことから、CV-159 は、従来のカルシウム拮抗薬よりも有効に脳虚血障害を防御することを示唆し、急性期における脳血管障害、とくに神経細胞死や脳梗塞を伴う虚血性脳疾患に対し有用であることを示唆した。なお、CV-159 の本効果に関し虚血性脳血管障害の予防あるいは治療薬として特許を申請中である。

一方、一過性前脳虚血を施すことによって、海馬および大脳皮質に6時間後をピークとする GDNF 遺伝子の発現誘導が認められ、GDNF の産生細胞は主として神経細胞であるが、その後反応性アストロサイトが GDNF を産生する新知見を得た。脳虚血に伴う GDNF 発現は、神経細胞死が誘発される部位において強発現していることから、GDNF の役割を明らかにするため、in vivo

実験による GDNF の海馬内投与および脳室内投与を試み、神経細胞死に対する保護効果を証明した。すなわち、GDNF を海馬あるいは脳室内に投与することによって遅発性神経細胞死は有意に抑制されること、また、TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling) 染色の検討から、GDNF はアポトーシス様神経細胞死を抑制することを明らかにした。このことから、GDNF は *in vivo* モデル動物において、アポトーシスの抑制を示唆し、神経細胞死に対して生存・保護因子として重要な役割を果たしていることを示唆した。

GDNF の神経細胞死抑制機構はドパミンニューロンを用いた *in vitro* 実験において報告されているが、詳細は不明である。申請者は今回 *in vivo* モデル動物を用いることにより、より生体に近い反応を詳細に検討し GDNF の有用性を明らかにした。とくに、海馬神経細胞死に対する GDNF の生存維持あるいは保護機構を示唆したのは本研究が初めてであり、脳虚血研究分野において本知見は非常に興味深い。つまり、1) GDNF は、脳虚血に伴う海馬 CA1 領域の tyrosine hydroxylase 過剰発現を調節し、憎悪因子であるドパミンの遊離を制御すること、2) GDNF は、関連受容体の一つである Ret 受容体の発現を促し、自己リン酸化に伴う ERK および PI3K/Akt 経路を介した細胞内シグナル伝達経路を活性化すること、3) GDNF はオートクライン的調節機構によって産生を促すと同時に、また、グリア細胞からの trophic support 機構によって海馬神経細胞の生存シグナルを活性化していることを示唆した。これらの機構によって GDNF は、少なくともアポトーシスを含む海馬神経細胞死に対して生存維持・保護因子として重要な役割を担っていることを詳細かつ明瞭に証明し、神経細胞死に対する GDNF の有用性を示唆している。

さらに、老化促進モデルマウス SAM を用いて、加齢に伴う海馬神経細胞死および海馬機能低下に対する GDNF の役割を明らかにし、痴呆モデル動物における GDNF の有用性も示唆した。

以上の結果から、申請者は GDNF の臨床応用として、神経細胞死を伴う脳虚血障害や脳血管性痴呆症などへの応用を示唆し、本専門分野に対する多大な情報をもたらすものと考えている。

以上、本論分審査委員会は、CV-159 および GDNF の脳虚血障害に対する有用性を明らかにし、臨床応用の可能性について示唆した論文であると判定し、本論文は、博士（薬学）の学位を受けるに十分値するものと認めた。