

[2]

氏名(本籍)	黒崎 瑠美子(東京都)		
学位	博士(学術)		
学位記番号	博甲第25号		
学位授与年月日	平成16年3月		
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当		
論文題目	疾患モデルマウスを用いた加齢及び神経変性に対する抗酸化物の影響		
論文審査委員	(主査)	教授	木村 修一
		元教授	内川 登
		教授	小此木 成夫
		教授	戸谷 誠之
	徳島大学	教授	荒木 勉

論文要旨

老人性神経疾患の一つであるParkinson病は、加齢に伴い中年期以降に発症し、安静時振戦・筋固縮・無動・姿勢反射障害などを主症状とする進行性の神経変性疾患である。中脳・黒質のdopamine神経細胞の変性・脱落を主病変とし、その変性機序に関してfree radicalが関与していることが報告されている。近年、Parkinson病における分子生物学的な検討により α -synucleinやparkin遺伝子の異常が指摘されているが、それぞれがもたらす異常にもfree radical、酸化的ストレスが関与するという興味深い報告が相次いでいる。しかしその詳細は未だ不明である。Parkinson病などの神経疾患を含む病態は加齢変化の一つと認識されている現在、この病態のリスクを軽減する可能性を持つと考えられている抗酸化能を有する物質によるリスク軽減の研究は極めて有意義である。

本研究は、疾患モデルマウス、特にParkinson病モデルマウス及び老齢モデルマウスを用い、神経機能の低下や神経変性についての解析と、それらの病態リスクを軽減するのに有効性を示す物質を模索検討したものである。ここでは特に、抗酸化能を有することが報告されている物質を用いて検討されている。

本論文は4章からなっている。第1章ではParkinson病モデルマウスを作製する方法について検討している。すなわち、中脳のdopamine作動性神経細胞を選択的に変性させる神経毒として知られているMPTP (1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine) を用い、Parkinson病モデルマウスを作製することを試みた。さまざまなMPTP投与スケジュールを作成して実験し、線条体dopamine濃度の変化と行動異常の発現との関連で検討し、MPTPを急性的に短時間で連続投与することで、重度の線条体dopamine濃度の減少や行動異常を引き起こすことを示しモデルマウスを作ることに成功した。第2章では、第1章で作成したParkinson病モデルマウスについて免疫組織化学的検討を行い、モデル動物における脳内の機能性発現タンパクの変動を観察し、また病態を解析した。その結果、MPTP投与後、黒質-線条体系のdopamine作動性神経細胞が選択的に変性・脱落し、重度の障害がみられ、Parkinson

病のモデルになることを確認した。また、黒質のインターニューロンは、MPTP投与により機能的ダメージを受けることを示し、さらに、反応性アストロサイトや活性化したミクログリアは本モデルにおける傷害に対して代償的に機能し、MPTPの神経毒性によって引き起こされる損傷を修復するための重要な役割を担っている可能性を示唆した。また、カルシウム結合タンパクであり神経疾患を悪化させる要因であると報告されているS100 β は、本モデルにおける神経障害に迅速に反応することが観察され、アストログリアにより生成代謝されることを示した。一方、本モデルにおいて、NO合成酵素であるnNOSとiNOS発現の変化が観察されたことから、MPTPによる神経障害の発現に酸化ストレスが関与することが検証された。また、free radical scavengerであるCu/Zn-SOD, Mn-SODの発現がMPTPの投与によって増大されたことにより、細胞内において酸化ストレスが増大し、神経障害が誘発されていることが示された。グリア細胞に発現したSODは、MPTPによって生成されたfree radicalから神経細胞やインターニューロンを守る機能を有していることが示唆された。これらの事実から、MPTP神経毒性によるfree radicalが、神経細胞やインターニューロンの傷害を増大させる一つの原因であることを強く示唆することができた。

第3章では、Parkinson病モデルマウスにおける各種抗酸化物の効果を検討した結果を示している。Parkinson病やその他の酸化ストレスによって導かれる疾病を治療する上で有効とされる物質を模索し、その作用メカニズムを解明することを目的として、抗酸化性を示す物質についてParkinson病モデルマウスを用い生化学的、免疫組織化学的に検討を行った。その結果、ACE阻害剤Perindoprilの有効性が示された。しかし、Ca²⁺拮抗薬Amlodipineと内因性抗酸化物Carnosineの有効性はみられなかった。Perindoprilは、本モデルにおける線条体dopamine, DOPAC, HVA含量の減少を抑制し、dopamine作動性神経細胞やインターニューロンの神経変性に対して有効であることを示し、それはMPTP神経毒性に起因するfree radical生成を抑制する作用によるものであることが示唆された。これらの結果は、神経変性疾患の治療において、free radical scavenging効果を有する物質の有効性を論証するものとなった。第4章では、加齢に伴う脳内の変化の観察と各種神経保護作用物質の効果を生化学的、行動薬理的、免疫組織化学的方法で検討している。Parkinson病やその他の神経疾患の発症率を増大する重要な因子である加齢に伴う脳内の変化を、生化学的、行動薬理的、免疫組織化学的に観察し、さらに、老齢期の脳機能に有効性を示す物質を検討することを目的としている。その結果、加齢に伴い、線条体dopamine濃度の減少、運動機能の低下、海馬CA1領域における神経細胞の脱落とグリア細胞の増大が観察された。さらに、神経細胞保護効果が報告されているCa²⁺拮抗薬Nilvadipineの老齢マウスに対する有効性が示された。Nilvadipineは、老齢マウスのdopamine作動性システムの減退を抑制し、運動機能の欠陥を抑制することが示された。一方、同じCa²⁺拮抗薬であるAmlodipineの効果は老齢マウスにおいてみられなかった。また、筋肉や脳内に比較的高濃度に存在する内因性抗酸化物質であるCarnosineを投与された老齢マウスでは、神経細胞の脱落とグリア細胞の活性化が抑制され、神経保護作用を有することが示唆された。これらの結果は、加齢に伴う脳機能の低下に対して有効性を示す物質のあることを新たに示したことになる。

審査報告要旨

神経系の加齢変化(老化)は、Alzheimer病・Parkinson病といった中枢神経系の発症頻度を著しく

増加させることは言うまでもない。高齢社会を迎えた今日では特に重要な問題となっている。したがって、老化に伴う神経系の変化を正確に捉え、この病態を引き起こすリスクを軽減する方法を検討することは、単に神経系疾患だけでなく、種々の生活習慣病を予防する上でも極めて重要な課題である。

これまでの研究によれば、中枢神経系 (CNS) におけるdopamine作動性神経の伝達が老化に伴い減少することが数多く報告されている。それらの報告の多くは、老化に伴うdopamine作動性神経細胞の減少が大きな原因であると結論している。また、神経伝達物質や受容体の老化に伴う変化は、神経伝達物質を放出する神経細胞の変性や脱落と相関すると考えられており、老化に伴うこのような変化には、酸化ストレスの関与も重大であることが知られている。

本研究は、疾患モデルマウス、特にParkinson病モデルマウス及び老齢マウスを用い、神経機能の低下や神経変性についての解析と、それらの病態リスクを軽減するのに有効性を示す物質として抗酸化物質投与の効果を模索検討したものである。

本論文は4章からなっている。まず第1章ではParkinson病モデルマウスをdopamine作動性神経細胞を選択的に変性させる神経毒として知られているMPTP (1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine) を用いて作成する方法を述べ、第2章では、上記で得られたParkinson病モデルマウスの免疫組織化学的検討をおこない、脳内の機能性発現タンパクの変動や免疫組織化学的観察で、このモデル動物がParkinson病モデルとして充分使えることを確認した。また、種々の検討結果から、MPTPによる神経障害の発現に酸化ストレスが関与することを検証し、MPTPの投与によって、細胞内において酸化ストレスが増大し、神経障害が誘発されたことを立証している。このモデルマウスの作成の上に立って、第3章では、Parkinson病を起こすリスクを軽減する可能性のある各種抗酸化物の効果を検討するとともに、その作用メカニズムを解明を目的とした生化学的、免疫組織化学的検討を行った。その結果、これまで抗酸化作用の認められている数種の物質の有効性が示され、その作用がMPTPの神経毒性に起因するfree radical生成を抑制する作用によるものであるを示唆する結果を得ている。第4章では、加齢に伴う脳内の変化の観察と、各種神経保護作用物質の効果を生化学的、行動薬理学的、免疫組織化学的方法で検討し、Parkinson病やその他の神経疾患の発症率を増大する重要な因子である加齢に伴う脳内の変化が、いかなるメカニズムによるかを追求している。その結果、加齢に伴い、線条体dopamine濃度の減少、運動機能の低下、海馬CA1領域における神経細胞の脱落とグリア細胞の増大が観察され、MPTP神経毒性物質の投与で得られた病態と近似していることを見だし、このリスクを軽減する抗酸化物質もParkinson病モデルの場合と一部共通していることを示唆する結果を得ている。また、筋肉や脳内に比較的高濃度に存在する内因性抗酸化物質であるCarnosineはParkinson病モデルマウスでははっきりとした効果が見られなかったが、老齢マウスでは、神経細胞の脱落とグリア細胞の活性化を抑制し、神経保護作用を有することが示唆された。この結果は、加齢に伴う脳機能の低下に対して抗酸化性の栄養物質の有効性を示唆するものとして極めて重要な知見といえよう。

本研究は、高齢者に見られる神経疾患の病態把握やそのリスクの軽減に栄養的なアプローチが有効であることを示唆するものであり、加齢に関する領域での新たな研究方向を示したものと見えよう。

審査員一同は、本論文が博士 (学術) を授与されるにふさわしい十分な内容をもつものであると判定した。