

論文の内容の要旨

論文題目： 1-Methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) の胎子および新生子マウスの中樞神経毒性に関する研究

氏名：才貴史

1-Methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) は、ヘロイン様の作用を有する鎮痛性オピオイド化合物の合成過程で生じる副産物であり、一部のほ乳類において、中脳黒質から線条体へと投射するドパミン神経細胞を傷害することによりパーキンソン病 (PD) と類似する症状を引き起こす。MPTP を投与したマウスおよびコモンマーモセットは PD モデル動物として医薬品の研究開発に多用されている。

ドパミン神経細胞は、神経伝達物質としてドパミンを用いる神経細胞である。細胞内では、アミノ酸の一種であるチロシンが tyrosine hydroxylase (TH) によって水酸化されドパミンが生成される。また、ドパミン神経細胞は細胞外へ放出したドパミンを細胞内に取り込んで再利用するため、細胞膜上に dopamine transporter (DAT) を発現する。不要となったドパミンはドパミン神経細胞周囲のアストログリア細胞内に存在する monoamine oxidase (MAO) -B によって代謝される。

MPTP に高感受性である成熟 C57BL/6 マウスに MPTP を腹腔内投与すると、MPTP は血液-脳関門 (BBB) を通過し、アストログリア細胞内の MAO-B によって 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) に代謝される。さらに、MPP⁺ は DAT と高い親和性があるため DAT を介してドパミン神経細胞内に取り込まれ、ミトコンドリアに蓄積されて酸化ストレスにより細胞のアポトーシスを引き起こす。これに対し、MPP⁺ を腹腔内に投与してもこのような変化は認められない。これは、水溶性の高い MPP⁺ が BBB を通過できないことに起因すると考えられている。さらに近年、MPTP あるいは MPP⁺ を側脳室内に投与すると、subventricular zone (SVZ) に存在する神経芽細胞にアポトーシスが起ることが明らかになった。

以上のように、MPTP および MPP⁺ の成熟マウス中枢神経系に対する毒性の研究は盛んに行われているが、胎子あるいは新生子マウスを用いた研究は極めて少ない。そこで、本研究では、MPTP および MPP⁺ の胎子あるいは新生子マウスに与える影響を評価することを目的とした。

最初に、妊娠 12 日目の C57BL/6 雌マウスあるいは生後 9 日目の新生子マウスに MPTP (25 mg/kg) あるいは MPP⁺ (17 mg/kg) を単回腹腔内投与し、投与 6、12 および 24 時間後に妊娠マウスからは胎子の脳を、新生子マウスからは中脳および線条体を摘出した。採取した胎子脳、新生子の中脳および線条体における DAT、TH、MAO-B および-A の mRNA およびタンパク質発現量を、それぞれ RT-PCR および Western blotting により評価した。また、液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析法により新生子の中脳および線条体におけるドパミンおよびその代謝産物の濃度を測定した。

その結果、MPTP を投与した胎子および新生子の TH および DAT の mRNA 発現量は投与 6~12 時間後に、胎子の TH、新生子の TH および DAT のタンパク質発現量は 12 時間後に減少した。また、新生子のドパミンおよびその代謝産物濃度も投与 6~12 時間後に最も大きく減少した。しかし、これらの減少は投与 24 時間後には概ね回復した。一方、胎子および新生子で MAO-B および-A の mRNA およびタンパク質発現量に変化は認められなかった。なお、胎子では DAT タンパク質の発現は認められず、胎子および新生子で MAO-B タンパク質の発現量は極めて少なかった。MPP⁺投与群においても MPTP 投与群とほぼ同様の結果が得られた。

以上の結果より、MPTP および MPP⁺は胎子および新生子にも中枢神経毒性を示すことが明らかとなった。また、これらの単回投与による胎子および新生子脳への毒性は、投与 12 時間後に最も強くなるが、一過性であり回復可能であると考えられた。また、MPP⁺投与群でも MPTP 投与群と同様の結果が得られたことから、妊娠マウスの腹腔内に投与された MPP⁺は血液-胎盤関門および胎子と新生子の BBB を通過すると考えられた。

次に、妊娠 12 日目の C57BL/6 雌マウスあるいは生後 9 日目の新生子マウスに MPTP あるいは MPP⁺ を単回腹腔内投与し、投与 12 時間後に妊娠マウスからは胎子を、新生子マウスからは脳を摘出した。胎子および新生子脳を 10%中性緩衝ホルマリンで固定し、それぞれの黒質、線条体および SVZ を含む領域の連続パラフィン切片を作製して HE 染色、ドパミン神経細胞のマーカである TH に対する免疫染色およびアポトーシス細胞を検出する TUNEL 染色を行った。

その結果、MPTP 投与群の胎子および新生子の黒質および線条体では形態的な組織変化は認められなかったが、溶媒対照群に比べて TH 陽性細胞が減少し、アポトーシス細胞が増加した。また、胎子および新生子の SVZ ではアポトーシス細胞が顕著に増加した。MPP⁺投与群は MPTP 投与群と同様の結果であった。

以上の結果より、MPTP および MPP⁺は胎子および新生子のドパミン神経細胞および SVZ の神経芽細胞に対して毒性を有し、細胞死を引き起こすことが示された。また、SVZ のアポトーシス細胞の増加は、黒質および線条体よりも顕著であったことから、ドパミン神経細胞と神経芽細胞では細胞毒性の機序もしくは感受性が大きく異なると考えられた。

さらに、妊娠 12 日目の C57BL/6 雌マウスあるいは生後 9 日目の新生子マウスに MPTP あるいは MPP⁺を単回腹腔内投与し、妊娠マウスからは胎子を、新生子マウスからは脳を摘出し、胎子および新生子脳を 10%中性緩衝ホルマリンで固定、それぞれの黒質、線条体および SVZ を含む領域のパラフィン切片を作製して MAO-B および DAT の免疫染色を施した。また、黒質、線条体および SVZ における MAO-B 発現細胞を特定するため、神経細胞マーカーおよびグリア細胞マーカーの抗体を用いた二重蛍光染色法を行った。

その結果、MAO-B の発現は、胎子では SVZ に隣接する lamina terminalis (LT)、肝臓および鼻腔上皮に、新生子では黒質、線条体および SVZ に認められた。また、胎子の LT、新生子の黒質および SVZ では、MPTP 投与により MAO-B 発現量が溶媒対照群と比較して増加した。一方、MPP⁺を投与しても MAO-B 発現量に変化は認められなかった。また、胎子の LT、新生子の黒質および SVZ において、MAO-B はグリア細胞マーカー陽性細胞に発現することが確認された。DAT の発現は、新生子の黒質および線条体で認められたが、胎子の黒質、線条体、SVZ、LT および新生子の SVZ では認められなかった。

以上の結果より、妊娠マウスに投与された MPTP は、脳の LT を含む胎子の様々な部位で MAO-B により MPP⁺に代謝され、最終的に胎子のドパミン神経細胞および神経芽細胞に毒性を示すと考えられた。なお、MPTP を投与した場合のみ胎子および新生子の脳の一部の領域で MAO-B 発現量が増加したが、この理由として、MAO-B の基質である MPTP が増加したことによる反応性の変化であると推察された。また、MPP⁺を神経細胞内に取り込む DAT の発現は、成熟神経細胞マーカーである neurofilament 陽性細胞が存在する新生子の黒質および線条体のみで認められ、未熟神経細胞マーカーである nestin 陽性細胞から構成される胎子の脳および新生子の SVZ では認められなかった。従って、新生子マウスのドパミン神経細胞以外の神経細胞内への MPP⁺取り込み機序は不明であった。

最後に、MPTP あるいは MPP⁺を腹腔内投与後 12 時間の妊娠マウスから胎盤を摘出して 10%中性

緩衝ホルマリンで固定し、パラフィン切片を作製して HE 染色、TUNEL 染色、Caspase-3 および MAO-B に対する免疫染色を行った。その結果、形態的な組織変化もアポトーシス細胞の増加も認められなかったことから、MPTP および MPP⁺は胎盤に対してはほとんど毒性を示さないと考えられた。また、MAO-B は胎盤の基底層および迷路層に発現し、迷路層では MPTP 投与により発現量が増加したことから、胎盤でも MPTP が MAO-B により MPP⁺に代謝されていると考えられた。

本研究の結果から、胎子および新生子マウスでも MPTP および MPP⁺がドパミン神経細胞および SVZ の神経芽細胞に対して毒性を示すことが明らかとなった。また、MPTP および MPP⁺による中枢神経毒性は、単回投与の場合、投与 12 時間後に最も顕著になるものの、投与 24 時間後には概ね回復すると考えられた。新生子マウスの脳におけるドパミン神経細胞毒性の機序は成獣と同様で、アストログリア細胞内で MPTP が MAO-B により MPP⁺に代謝され、MPP⁺が DAT を介してドパミン神経細胞内に蓄積するためであると考えられた。しかし、胎子マウスの脳および新生子マウスの SVZ では、MAO-B の発現は認められたが DAT の発現は認められなかった。胎子脳の神経細胞および新生子マウスの SVZ の神経芽細胞は未熟な神経細胞である点が共通することから、未熟な神経細胞では未知の MPP⁺取り込み機構が存在すると推察された。さらに、胎子および新生子マウスの脳では MAO-B タンパク質の発現量は極めて少なく、かつ脳以外の組織でも発現していたこと、および MPTP 投与群でも MPP⁺投与群でも中枢神経毒性が認められたことから、胎子および新生子マウスでは、投与された MPTP は脳以外の部位でも MPP⁺に代謝された後、未成熟な BBB を通過して脳へ移行し中枢神経毒性を示すと推察された。

PD 発症には、加齢に伴うドパミン神経細胞の傷害および脳内 MAO-B タンパク質発現量の増加が関与していると考えられている。なお、中枢神経系の傷害に際し、SVZ の神経芽細胞が神経細胞に分化し、傷害部位へ遊走して神経細胞を補うことが知られている。しかし、胎児期または新生児期に SVZ に対する中枢神経毒性を有する物質に暴露されることで神経細胞の補完不全が生じ、成年期以降に影響を与える可能性も考えられる。本研究の結果、胎子および新生子でも脳へ移行した MPP⁺によりドパミン神経細胞および SVZ の神経芽細胞が傷害されることが判明した。PD は高齢者に多く見られる疾患であるが、胎子あるいは若齢動物を用いて PD を誘発する実験系はその発症機序解明に有用であり、今後の PD の研究に大きく貢献すると考えられる。