

[別紙2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 才 貴史

1-Methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) をマウスに投与すると中脳黒質から線条体へ投射するドパミン神経細胞を傷害し、動物はパーキンソン病様症状を示す。ドパミン神経細胞は tyrosine hydroxylase (TH) の作用によりドパミンを産生して神経伝達物質として用い、dopamine transporter (DAT) を介して再度取り込む。不要なドパミンは近傍のグリア細胞で monoamine oxidase (MAO) -B により代謝される。

成熟 C57BL/6 マウスに MPTP を腹腔内投与すると、血液-脳関門 (BBB) を通過して脳に入り、MAO-B により 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) に代謝される。MPP⁺ は DAT を介してドパミン神経細胞内に取り込まれ、細胞死を誘発する。一方、腹腔内投与された MPP⁺ は BBB を通過できない。近年、MPTP が subventricular zone (SVZ) の神経芽細胞にも細胞死を誘発することが判明した。

MPTP および MPP⁺ の成熟マウスへの毒性の研究はパーキンソン病モデルとして、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。本研究では、MPTP の胎子および新生子マウスへの影響を評価した。

初めに、妊娠 12 日目および生後 9 日目の C57BL/6 マウスに MPTP あるいは MPP⁺ を単回腹腔内投与した。投与 6、12 および 24 時間後に妊娠マウスから胎子脳を、新生子マウスから中脳および線条体を摘出し、DAT、TH および MAO-B の mRNA およびタンパク質発現量を評価した。また、新生子については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 mRNA 発現量、胎子の TH、新生子の TH および DAT タンパク質発現量は 12 時間後に溶媒対照群より低値を示した。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 時間後に低値を示したが、これらは投与 24 時間後には回復した。一方、胎子および新生子の MAO-B タンパク質発現量は極めて少なく、胎子では DAT タンパク質は発現していなかった。MPP⁺ 投与群は MPTP 投与群と同様の結果であった。

以上の結果から、MPTP および MPP⁺ の単回投与により、投与 12 時間後に胎子および新生子に中枢神経毒性がみられること、およびこの毒性は一過性であることが判明した。また、MPP⁺ 投与群でも MPTP 投与群と同様の結果であったことから、MPP⁺ は胎盤および新生子の BBB を通過すると考えられた。

次いで、上述と同様に妊娠マウスおよび新生子マウスに MPTP あるいは MPP⁺ を投与し、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ホルマリンで固定した。

胎子および新生子の黒質、線条体およびSVZのパラフィン切片を作製してTHに対する免疫染色および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でもアポトーシス細胞が顕著に増加した。MPP⁺投与群の結果はMPTP投与群と同様であった。

以上の結果から、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神経芽細胞に対して毒性を示すことが判明した。また、SVZにおけるアポトーシス細胞の増加は黒質および線条体より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異なると考えられた。

さらに、妊娠マウスおよび新生子マウスにMPTPあるいはMPP⁺を投与し、胎子および新生子の黒質、線条体およびSVZの切片を作製してMAO-BおよびDATの免疫染色を行った。また、MAO-B発現細胞を確認するため、未熟あるいは成熟グリア細胞のマーカーを用いた二重免疫染色も行った。その結果、MAO-B発現は、胎子ではSVZに隣接するlamina terminalis (LT)を含む複数の部位に、新生子では黒質、線条体およびSVZにみとめられた。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発現量が増加した。DATの発現は新生子の黒質および線条体のみで認められた。

以上の結果から、妊娠マウスに投与されたMPTPは、胎子脳のLTを含む様々な部位でMAO-Bにより代謝され、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投与によるMAO-B発現量の増加は、基質であるMPTPの増加による反応性変化と推察された。また、DATの発現は成熟細胞で構成される新生子の黒質および線条体のみで認められ、未熟細胞で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。

最後に、MPTPあるいはMPP⁺を投与した妊娠マウスの胎盤の切片を作製し、MAO-Bに対する免疫染色を行った。その結果、MPTPの投与により胎盤迷路層でMAO-Bの発現量が増加したことから、胎盤でもMPTPの代謝が行われていると考えられた。

本研究により、胎子および新生子マウスでは、MPTPおよびMPP⁺はBBBを通過して脳へ移行し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判明した。したがって、新生子マウスのドパミン神経細胞に対する毒性機序は成獣と同様であると考えられたが、胎子マウスの脳および新生子マウスのSVZではDATの発現が認められなかったことから、未熟神経細胞にはDAT非依存性のMPP⁺取り込み機構が存在すると推察された。本研究の成果は、パーキンソン病の発病病理研究において極めて重要な知見と考えられた。よって審査委員一同、本論文が博士（農学）の学位を授与するにふさわしいと判断した。