

## [別紙 2]

### 論文審査の結果の要旨

ほ しじゅん  
申請者氏名 何 希君

1960年のドーパミンの発見および1983年の1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) 投与によるパーキンソン症状発現の発見は、パーキンソン病の病態研究に突破口を開いた。この時以来 MPTP を霊長類およびげっ歯類に投与した動物モデルがパーキンソン病研究に頻繁に用いられている。本研究では MPTP が黒質ドーパミン作動性ニューロン以外に、subventricular zone (SVZ) と rostral migratory stream (RMS) の神経前駆細胞にもアポトーシスを誘導することについて検討した。

#### 第一章 ドーパミン作動性ニューロンの MPTP 感受性と年齢依存性

10日、21日、6週、12週、24週と48週齢の C57BL/6 マウスに MPTP を腹腔内投与し、黒質緻密部におけるチロシン・ヒドロキシラーゼ (TH) 陽性ドーパミン作動性ニューロンの減少を指標として、MPTP の神経毒性と年齢の相関を評価した。対照群マウスの TH 陽性ニューロン数は年齢に関わらず一定であった。MPTP を投与した6週～48週齢のマウスでは黒質ドーパミンニューロン (TH 陽性ニューロン) の数は年齢に相関して減少したが、若齢 (10日と3週齢) マウスでは対照群と同様であった。

#### 第二章 MPTP 誘発 SVZ/RMS 神経前駆細胞アポトーシス

3ヶ月齢 C57BL/6 マウスに MPTP (50 mg/kg) を腹腔内投与し、24時間後に脳を採取、SVZ と RMS を組織学的に観察した。その結果、同部に多数のアポトーシス細胞が観察され、活性化 caspase 3 の発現と TUNEL 法陽性の断片化 DNA が確認された。蛍光二重染色および電顕観察したところ、SVZ と RMS におけるアポトーシス細胞は doublecortin (Dcx) 陽性の神経前駆細胞、migrating neuroblast、すなわち type A cell であることが分かった。これらの神経前駆細胞は MPTP 投与2日後にもっとも減少した。さらにミクログリアによるアポトーシス細胞の食食も観察され、ミクログリアがアポトーシスをおこした神経前駆細胞の除去に重要であることが示唆された。

#### 第三章 MPTP 投与神経前駆細胞アポトーシスにおける遺伝子発現プロファイルの変化

10-12週齢の C57BL/6 マウスに MPTP を腹腔内投与し、12、24、36時間後に嗅球を採取し、アポトーシス関連遺伝子オリゴマイクロアレイおよび DNA Damage Signaling Pathway 特異的遺伝子オリゴマイクロアレイを用いて神経前駆細胞における遺伝子発現解析を行った。12から24時間後にアポトーシス誘導遺伝子と DNA 傷害関連遺伝子の発現が上昇したが、36時間後には少数の遺伝子が発現上昇しただけであった。発現量に変動があったいくつかの遺伝子についてリアルタイム PCR 法を行い同様の結果を得た。

#### 第四章 MAO-B 阻害剤による MPTP 誘導神経前駆細胞アポトーシスの年齢非依存性抑制

MPTP は脳内のグリア細胞内で monoamine oxidase B (MAO-B) によって MPP<sup>+</sup> になり、この MPP<sup>+</sup> が選択的にドーパミン作動性ニューロンを傷害する。本章ではまず、生後21日および48週齢の C57BL/6 マウスを用いて、神経前駆細胞の週齢依存性 MPTP 感受性を検討したが、年齢依存性は認められなかった。続いて、急性 MPTP モデルを用いて MAO-B 阻害剤の R(-)-deprenyl および pargyline 投与による SVZ と RMS の神経前駆細胞アポトーシスの抑制をしらべた。その結果、MPTP による神経前駆細胞アポトーシスは R(-)-deprenyl および pargyline 投与により著しく抑制された。

## 第五章 MPTP 誘導されたアポトーシスの神経再生阻害

成体における神経再生に関しては、SVZ で増殖した神経前駆細胞が RMS を経て嗅球へ移動し、顆粒細胞と介在神経細胞へ最終分化することが知られている。そこで、MPTP による神経前駆細胞アポトーシスが神経再生に与える影響を調べた。成体 C57BL/6 マウスに MPTP を 2 時間の間隔をおいて 4 回投与し、その後 BrdU を 6 時間間隔で 8 回投与、2, 7, 14, 28 日後に脳を採取した。SVZ と嗅球で MPTP 投与により BrdU+細胞数が減少していた。嗅球の顆粒層では MPTP 投与後 14、28 日に BrdU と神経細胞マーカー NeuN 両方陽性の細胞数の減少が観察された。嗅球傍系球体層では MPTP 投与後 7 日から TH 陽性の介在神経細胞の減少がみられた。また MPTP 投与後 2 日、7 日に SVZ と嗅球において Dcx 陽性神経前駆細胞数の有意な減少がみられたが、14、28 日目には回復した。

本研究により MPTP 投与 C57BL/6 マウスはパーキンソン病だけでなく、*in vivo* の神経前駆細胞アポトーシス研究にとっても有用なモデルであることが明らかになった。本研究の結果は、胎児中枢神経系の発生、さらには薬物の中枢神経系毒性の発現機構の解明に極めて有用な情報を提供すると考えられる。よって審査委員一同は本論文が博士（獣医学）の学位を授与するに値するものと認めた。