

## 論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成 20 年度博士課程 入学

氏名 伊藤 強

指導教員名 中山 裕之

論文題目 Roles of monoamine oxidase-B (MAO-B) in the neurotoxicity of  
1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in mice  
(マウスにおける 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)の  
神経毒性発現に関する monoamine oxidase-B (MAO-B)の役割)

パーキンソン病 (PD) のモデル作製に用いられる 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) は腹腔内 (ip) あるいは皮下 (sc) 投与によりドパミンニューロンの選択的欠失を起し、ヒト PD の病態を良好に再現しているとされる。投与された MPTP はまず肝臓など、脳実質外の monoamine oxidase-B (MAO-B) により 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>) へと代謝される。MPP<sup>+</sup>は血液脳関門を通過できないため、代謝を免れた MPTP のみが脳実質内に侵入する。MPTP はグリア細胞内の MAO-B により MPP<sup>+</sup>となる。MPP<sup>+</sup>はドパミントランスポーター (DAT) を介してドパミンニューロンに侵入し、神経細胞死を起す。

MPTP はマウスにおいて、その感受性に系統差が認められる。その原因因子は明らかになっていないが、とくに MPTP 代謝に重要な MAO-B の関与が疑われている。また近年、MPP<sup>+</sup>の直接的な作用に加え、一酸化窒素合成酵素 (NOS) により合成される一酸化窒素 (NO) が MPTP 毒性発現に関与していることが明らかになっている。したがって、NOS 発現の系統差が MPTP 感受性に影響する可能性も考えられる。本研究の第一章、第二章では、高感受性系統 C57BL/6 マウスおよび低感受性系統 BALB/c マウスを用い、MPTP 感受性の系統差について、関与が疑われる因子を検討した。

また、当研究室のこれまでの研究から、MPTP を ip 投与した C57BL/6 マウスでは、脳室下帯 (SVZ) における doublecortin (Dcx) 陽性神経芽細胞 (migrating neuroblast, A cell) のアポトーシスが誘導されることが明らかにされている。このアポトーシスにも、MPTP から生成さ

れる MPP<sup>+</sup>が関与すると考えられている。本研究の第三章では、SVZ アポトーシス発現への MAO-B の関与を調べた。

第一章では、MPTP 感受性のマウス系統差について MAO-B の関与を調べるため、感受性が異なる 2 系統のマウスに MPTP あるいは MPP<sup>+</sup>を側脳室内 (icv) 投与した。すなわち、(1) 8 週齢の C57BL/6 (高感受性) および BALB/c (低感受性) 雄マウスに MPP<sup>+</sup> (0.8 mg/kg) を icv 投与し、1、3 および 7 日後に脳を採材、線条体および黒質を含む中脳組織について tyrosine hydroxylase (TH) 免疫染色を行った。MPP<sup>+</sup> 投与 C57BL/6 マウスの線条体の TH 陽性領域は投与 3 日後から、黒質 TH 陽性細胞数は投与 1 日後から、対照群と比較し有意な減少を認めた。また、MPP<sup>+</sup> 投与 BALB/c マウスの線条体 TH 陽性領域は投与 1 および 3 日後、黒質 TH 陽性細胞数は投与 3 日後に対照群と比較し、有意な減少を認めた。しかし、BALB/c マウスの減少率は C57BL/6 マウスと比較し、有意に低かった。(2) 8 週齢の C57BL/6 マウスに MPTP 1.54mg/kg あるいは 7.14 mg/kg を icv 投与し、1 および 7 日後に脳を採材、同様の染色を行った。しかし、MPTP 投与 C57BL/6 マウスでは投与 1 および 7 日後に TH 陽性領域および TH 陽性細胞数の減少は観察されなかった。以上の結果から、MPP<sup>+</sup> を icv 投与しても MPTP 投与と同様に、C57BL/6 マウスは高感受性、BALB/c マウスは低感受性であることが示された。このことから、MPTP 感受性の系統差に関与する因子は MPTP から MPP<sup>+</sup> への代謝後に作用すること、すなわち MAO-B は関与しないことが示唆された。

第二章では、MPTP 感受性を規定する具体的な因子の発現を調べるため、C57BL/6 および BALB/c マウスについて、MAO-B、DAT、神経型 NOS (nNOS) および誘導型 NOS (iNOS) の発現量を調べた。(1) 8 週齢の C57BL/6 および BALB/c 雄マウスに MPTP (20 mg/kg) を 2 時間毎に 4 回 ip 投与し、1 および 7 日後に脳を採材、線条体および黒質を含む中脳組織について TH 免疫染色を行った。MPTP 投与 C57BL/6 マウスの線条体 TH 陽性領域および黒質 TH 陽性細胞数は投与 1 および 7 日後に対照群と比較し、有意に少なかった。一方、MPTP 投与 BALB/c マウスでは有意な変化は見られなかった。(2) 無処置の 8 週齢 C57BL/6 および BALB/c 雄マウスの脳を採材、線条体および黒質を含む中脳組織について Western blot 法を用いて、MAO-B、DAT、nNOS、iNOS 発現量を比較した。2 系統間で MAO-B の発現量に差は認めなかった。しかし、BALB/c マウスの線条体 DAT および中脳 TH 発現量は、C57BL/6 マウスと比較し有意に高かった。(3) 8 週齢 C57BL/6 および BALB/c 雄マウスに MPTP (20 mg/kg) を 2 時間毎に 4 回 ip 投与し、6、12 時間、1 および 2 日後に脳を採材、線条体および黒質を含む中脳組織について Western blot 法を用いて、MAO-B、nNOS、iNOS 発現量を比較した。MAO-B 発現量は、MPTP 投与 BALB/c マウスの線条体において投与 12 時間後に MPTP 投与 C57BL/6 マウスと比較し、有意に高かった。また、MPTP 投与 BALB/c マウスの nNOS および iNOS 発現量は線条体および黒質において 12 時間後、2 日後に、MPTP 投与 C57BL/6 マウスと比較し、有意に高かった。以上の結果から、MAO-B、DAT、nNOS および iNOS の発現量は MPTP 感受性の系統差に関与しないことが示唆された。

第三章では、MPTP によって誘導される SVZ アポトーシスに注目した。このアポトーシスが、

MAO-Bにより代謝されたMPP<sup>+</sup>の直接的作用によるかを検討した。(1) 8週齢のC57BL/6雄マウスにMPTP (36または162  $\mu$ g/head)あるいはMPP<sup>+</sup> (18  $\mu$ g/head)をicv投与した。1および3日後、採取したSVZを含む脳組織についてTUNEL染色を行った。MPTP、MPP<sup>+</sup>投与群いずれも投与1日後に、SVZでTUNEL陽性細胞の有意な増加を認めた。(2) 8週齢のC57BL/6雄マウスにMPTP (36または162  $\mu$ g/head)あるいはMPP<sup>+</sup> (18  $\mu$ g/head)をicv投与し、1日および3日後にSVZを含む脳組織を採取し、Dcxあるいはepidermal growth factor receptor (EGFR)免疫染色を行った。MPTP投与群(1日後)、MPP<sup>+</sup>投与群(3日後)いずれもDcx陽性細胞の有意な減少を認めた。(3) 8週齢のC57BL/6雄マウスにMAO-B阻害剤(R(-)-deprenyl : 18  $\mu$ g/head)をicv投与後、MPTP (36または162  $\mu$ g/head)あるいはMPP<sup>+</sup> (18  $\mu$ g/head)をicv投与し、1日後、SVZを含む脳組織についてTUNEL染色を行った。deprenylの前投与によりMPTPによるアポトーシスは抑制されたが、MPP<sup>+</sup>によるアポトーシスは抑制されなかった。(4) 8週齢のC57BL/6雄マウスにMPTP (36または162  $\mu$ g/head)あるいはMPP<sup>+</sup> (18  $\mu$ g/head)をicv投与した。1日後、採取したSVZを含む脳組織について、抗MAO-Bおよび抗GFAP抗体を用いた蛍光二重免疫染色を行った。すべてのマウスの上衣およびSVZにGFAPとMAO-Bの共陽性細胞を認めた。以上の結果から、MPTPをicv投与すると、その代謝産物MPP<sup>+</sup>によりSVZのA cellアポトーシスが誘導されることが明らかになった。さらに、MPTPからMPP<sup>+</sup>への変換には、上衣およびSVZのGFAP陽性細胞に存在するMAO-Bが関与することが示された。

第一章および第二章から、MPTP投与後のMAO-Bの発現量について、系統差は認められたもののMPTP感受性の系統差には関与していないことが明らかとなった。また、DAT、nNOS、iNOSも感受性の系統差には関与しないことが示された。残念ながら、MPTP感受性の系統差に関与する因子はいまだ不明であるが、第一章の結果より、MPTPからMPP<sup>+</sup>への変換後に作用する因子である可能性が高いと考えられた。また、第三章からは、SVZ神経芽細胞のアポトーシスにはMAO-BによるMPTPからMPP<sup>+</sup>への代謝が必須であり、MPP<sup>+</sup>の直接作用でアポトーシスが誘導されることが分かった。今回の一連の研究により、MPTPの神経細胞傷害メカニズムにおけるMAO-Bの役割について新たな知見を得ることができた。また、PD発症には遺伝的要因を含め、様々な要因が関与することから、その発症機序解明にも寄与すると考えられた。