

## 論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成 21 年度博士課程 入学

氏名：ロドリゲス セバスティアン

指導教員名：中山 裕之

## 論文題目

Pathological study on the toxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and 6-hydroxydopamine (6-OHDA) upon the nigrostriatal dopaminergic system of the golden hamster (ゴールデンハムスターの黒質線条体系における 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) と 6-hydroxydopamine (6-OHDA)の毒性発現に関する病理学的研究)

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) と 6-hydroxydopamine (6-OHDA) は、いずれもドーパミン神経細胞を選択的に傷害する。腹腔内 (ip) あるいは皮下 (sc) 投与された MPTP は血液脳関門 (BBB) を通過して、脳に到達し、グリア細胞の 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> はドーパミントランスポーター (DAT) を介してドーパミン神経細胞に侵入し、これを傷害する。一方、MPTP の一部は BBB を構成する血管内皮細胞の MAO-B によっても MPP<sup>+</sup> へと代謝される。脳実質外で産生された MPP<sup>+</sup> は BBB を通過できないので、BBB は MPTP の神経毒性に対する最初の防御機構であると考えられている。MPTP の神経毒性には動物種差が存在し、マウスでは C57/BL6 の感受性が高い。これに対し、ゴールデンハムスター (GH) は抵抗性であると報告されている。このような動物種または系統による MPTP 抵抗性の相違の機序については十分解明されていない。一方、BBB を通過出来ない 6-OHDA をラットやマウスの線条体に片側性に投与すると、黒質緻密部のドーパミン細胞の脱落と、線条体ドーパミン神経の神経線維減少がおくとされている。しかし、GH の 6-OHDA

に対する神経毒性についてはこれまで報告がない。そこで、本研究では MPTP と 6-OHDA の GH における神経毒性の機序についてそれぞれ検討した。

第一章では、GH の MPTP 抵抗性に関する機序を検討した。8 週齢の雌 GH (90~130g) (n=6) に MPTP 20 mg/kg を 2 回あるいは 4 回、2 時間毎に ip 投与した。投与 5 日後に GH を安楽殺して、脳を採取した。線条体と中脳黒質についてチロシンヒドロキシラーゼ (TH) と GFAP に対する免疫染色を実施し、それぞれの陽性領域あるいは陽性細胞数を測定した。また、MPTP 投与により誘導される subventricular zone (SVZ) のアポトーシスを調べるため、TUNEL 染色も行った。次いで雌および雄の GH に MPTP (6.9 mg/kg) あるいは MPP<sup>+</sup> (0.8 mg/kg) を脳室内 (icv) に単回投与した。投与 5 日後に安楽殺して、上記と同様の検討を行った。さらに雌 GH に MPP<sup>+</sup> (0.8 mg/kg) を icv 単回投与し、投与 1 日後に安楽殺、脳について TUNEL 染色を行った。

MPTP を ip または icv 投与した GH の線条体と中脳黒質で TH と GFAP の陽性領域および TH 細胞数にそれぞれ変化は認められなかった。MPP<sup>+</sup> を投与した GH でも同様であった。また、SVZ においても TUNEL 陽性細胞数の有意な増加は認められなかった。さらに、MAO-B の発現を調べたところ、アストロサイトに加えて BBB を構成する血管内皮細胞も陽性であった。すなわち、BBB より前にまたは BBB で MPTP が MPP<sup>+</sup> に変わったため、BBB を通過できず、神経毒性が発現されないことが GH の MPTP 抵抗性に関連すると考えられた。また、GH の場合は BBB を構成する血管内皮細胞が MPTP 神経毒性に関わる最初のメカニズムである可能性が高いと考えられた。しかしながら、icv 投与した MPP<sup>+</sup> に対する抵抗性に関与する因子については特定できなかった。

第二章では、6-OHDA 投与に対する GH の感受性を検討した。10 週齢~12 週齢の雄 GH の線条体に 6-OHDA (20 µg/2 µl) を単回投与して、投与 3 日後から 21 日後まで経時的に解剖した。線条体と中脳黒質について、TH と DAT に対する免疫染色を行い、陽性領域あるいは陽性細胞数を調べた。その結果、投与側の線条体では TH および DAT 陽性領域は反対側と比べて、投与 3 日、5 日、7 日、15 日、21 日後でそれぞれ少なかった。しかし、投与 15 日、21 日後には弱いながらも回復する傾向がみられた。中脳黒質では TH 陽性細胞数は反対側と比べて、7 日、15 日、21 日後で少なかった。すなわち、GH に 6-OHDA を線条体内投与すると、投与側の中脳黒質で TH 陽性

細胞と DAT 陽性細胞が投与後 7 日より消失することが明らかになった。中脳黒質でみられた TH 陽性細胞の減少は、6-OHDA の逆行性輸送により生じたと考えられた。また、黒質の DAT 陽性細胞の減少は線条体より遅れて生じたことから 6-OHDA は、線条体の DAT 陽性軸索より取り込まれると推測された。さらに、線条体で TH および DAT 陽性領域が若干回復したことから 6-OHDA の DAT 神経傷害は可逆性と推測された。

第三章では、GH における 6-OHDA 感受性を特定する際の炎症反応の役割を明らかにするため、6-OHDA と同時に抗炎症薬を投与し、DA 神経の傷害を調べた。雄の GH の線条体に 6-OHDA (20  $\mu$ g/2  $\mu$ l) とミノサイクリン (MINO) (45 mg/kg, ip)、6-OHDA とプレドニゾロン (Pred) (2 mg/kg, sc) あるいは 6-OHDA とミノサイクリン+プレドニゾロン (MINO+Pred) を投与した。コントロール群 (CONT) には 6-OHDA のみを投与した。5 日後に線条体の Iba-1、TH、GFAP 陽性領域および中脳黒質の Iba-1、TH、GFAP 陽性細胞数を調べた。また、RT-PCR 法により各種サイトカイン (IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, INF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ )、一酸化窒素合成酵素 (NOS) および神経保護因子 (BDNF, GDNF) の発現量を調べた。その結果、MINO、Pred あるいは MINO+Pred を処置した GH の線条体と中脳黒質では、CONT と比較して Iba-1 陽性領域が有意に減少した。しかし、Pred 処置の線条体では CONT と比べ TH 陽性領域が有意に多かった。いずれも群でも GFAP 陽性領域は CONT と同レベルであった。Pred の線条体と中脳黒質では CONT と比較して TNF- $\alpha$ 、iNOS、BDNF および GDNF の発現量が低かった。一方、MINO と MINO+Pred では CONT と比べて、各種サイトカイン、NOS、神経保護因子の発現量に差は認めなかった。以上より、Pred の投与により 6-OHDA による Iba-1 陽性細胞の増加と TH 陽性領域の減少が抑制された。この現象は TNF- $\alpha$  と iNOS の発現抑制に起因すると考えられた。すなわち、6-OHDA を投与された GH では TNF- $\alpha$  と iNOS が DA 細胞傷害に重要な役割を果たしていると考えられた。

今回の一連の研究により、GH における MPTP 抵抗性に関与する因子として BBB を構成する血管内皮細胞内 MAO-B の役割が示唆された。また、GH は 6-OHDA に対しては感受性であること、ラットと比較すると 6-OHDA 投与後より短期間に神経変性と炎症反応を示すことも明らかになった。本研究の成果により GH は PD の発病メカニズム、進行、神経系での免疫反応を研究

する上で、非常に有用なモデルになると考えられた。