

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 ロドリゲス セバスティアン

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、ドーパミン (DA) 神経細胞を選択的に傷害する。感受性系統のマウスに投与された MPTP は血液脳関門 (BBB) を通過して、脳内のグリア細胞で 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 DA 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。一方、ゴールデンハムスター (GH) は MPTP 抵抗性であると報告されている。また、BBB を通過出来ない 6-hydroxydopamine (6-OHDA) をラットとマウスの線条体に片側性に投与すると、黒質緻密部の DA 細胞または神経線維の減少～消失がおこるとされている。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 (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、5 日後に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 glial fibrillary acidic protein (GFAP) に対する免疫染色を実施し、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、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、BBB を構成する血管内皮細胞が陽性であった。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 抵抗性に関連していると考えられた。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、3 日から 21 日後まで解剖した。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。

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 日後より減少した。中

脳黒質では TH および DAT 陽性細胞数は反対側と比べて、7 日より減少した。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、TH 及び DAT 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。

**第三章**では、GH の 6-OHDA 感受性と炎症反応の関係を調べるため、6-OHDA と抗炎症薬を同時に投与し、DA 神経の傷害を調べた。雄の GH の線条体に 6-OHDA (20  $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$ ) 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 (iNOS) および神経保護因子 (BDNF, GDNF) の発現量を調べた。

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 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 陽性領域が増加した。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 TNF- $\alpha$ 、iNOS、BDNF および GDNF の発現量が CONT と比較して、有意に減少した。MINO と MINO+Pred では各種サイトカイン、iNOS、神経保護因子の発現量に CONT の有意差は認められなかった。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 は MPTP に抵抗性であり、この機構として BBB を構成する血管内皮細胞内 MAO-B が重要であると考えられた。また、GH は 6-OHDA に感受性であることが示された。6-OHDA は線条体の DAT 陽性軸索で取り込まれ、逆行性に黒質 TH 陽性細胞を傷害すると推測された。さらに、GH に 6-OHDA を投与すると、TNF- $\alpha$  と iNOS の発現が増加し、DA 細胞あるいは神経線維が減少することが分かった。

本研究で得られた一連の知見は、MPTP または 6-OHDA を投与した GH がパーキンソン病の優れたモデルになりうる可能性を示しており、パーキンソン病研究に非常に重要な情報を提供するものと考えられた。よって審査委員一同は本論文が博士 (獣医学) の学位論文として価値あるものと認めた。