

(第7号様式)

学位論文審査結果の要旨

氏名	檜垣 ひろみ
審査委員	主査 大八木 保政 副査 茂木 正樹 副査 伊賀 淳一 副査 川上 良介 副査 永井 勅久

論文名 催眠薬ブロモバレリル尿素はマイクログリアのインターフェロン調節因子発現を抑制することにより、6-ヒドロキシドパミン誘発ドパミン作動性ニューロン障害を改善する

審査結果の要旨

【背景と目的】

パーキンソン病は最も一般的な神経変性疾患の一つであり、黒質緻密部におけるドパミン神経細胞の変性脱落が進行する。脳内のマイクログリアはマクロファージや単球類似の機能を持ち、脳内で炎症を惹起することでさらなる神経細胞障害を促進すると考えられている。したがって、マイクログリアの起炎性活性化を抑制することがパーキンソン病の病態改善につながると期待されてきた。申請者らはこれまで、催眠鎮静薬のブロモバレリル尿素(bromovalerylurea, BU)の抗炎症作用を研究してきており、今回はBUのリポ多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激したマイクログリアに対する作用、およびドパミン神経細胞障害物質 6-hydroxydopamine (6-OHD A)によって誘発されたラットパーキンソン病モデルに対する効果を検討した。

【方法】

ラット新生仔全脳より脳細胞を採取し、マイクログリアを分離・培養した。マイクログリア培養および大脳皮質由来一次培養神経細胞とマイクログリアの共培養を作成し、培地にLPSやBUを添加して48時間後にマイクログリアから放出された一酸化窒素(NO)を Griess reaction で

測定し、マイクログリア起炎症性活性化の指標とした。さらに定量的リアルタイム PCR やウェスタンブロットで種々のシグナル関連分子やサイトカインの遺伝子や蛋白の発現を解析した。一方、パーキンソン病の生体モデルとして、7 週齢のオス Wistar ラットの右線条体に 6-OHDA を注入した。BU 経口投与として、500 mg/L BU 含有水を自由飲水し、ヒトの投与極量の 3 g/日となるようにした。7 日間投与後のロタロッドによる運動機能解析後、黒質を含む中脳腹側被蓋野組織を採取し、培養細胞系と同様に定量的 RT-PCT やウェスタンブロットを行った。動物実験については、愛媛大学動物実験委員会の承認を受けて、動物実験規則に従って実施した。

【結果】

培養細胞実験においては、100 µg/ml BU 添加で LPS 誘導 NO 産生が有意に抑制された。マイクログリアの NO 産生酵素である inducible NO synthase (iNOS) の mRNA および蛋白の発現が抑制され、また共培養系では LPS による神経細胞死が BU で抑制された。LPS 刺激後の iNOS、IL-1β、IL-6、COX2 の BU による発現抑制効果はデキサメサゾンと同程度であった。BU は LPS 刺激による NF-κB の核内移行を抑制しなかったが、JAK1、STAT1、STAT3 のリン酸化の抑制、および interferon regulatory factor (IRF) 1 および IRF8 の発現抑制が見られた。マイクログリアの IRF1 または IRF8 発現をノックダウンすると NO 産生が抑制された。

6-OHDA 注入ラットにおいては、BU 投与は黒質ドパミン神経細胞の脱落を抑制し、ロタロッドテストの運動機能を改善した。また、中脳腹側被蓋組織では、IRF1、7、8 の起炎症性転写因子や IL-1β の発現低下、insulin-like growth factor-1 (IGF-1)、hepatocyte growth factor (HGF) や platelet-derived growth factor A (PDGF-A) などの神経保護的因子の発現上昇を認めた。

【考察】

BU は、in vitro でも in vivo でもマイクログリアの起炎症性活性化を抑制し、神経保護的作用を有すると考えられた。BU の効果は、NF-κB 抑制を介さずに JAK/STAT 経路の活性化を抑えることで IRF1 および IRF8 の発現を抑制することが示唆された。BU は本来、催眠鎮静薬として知られているが、マイクログリアによる神経炎症を抑制することで、新規のパーキンソン病薬としての可能性が考えられた。

公開審査会は令和元年 8 月 29 日に開催され、申請者が研究内容を英語で明確に発表した後に、審査員から本研究に関する以下の質問がなされた。1) BU の作用は M1/M2 分化の変化によるものか、2) BU は臨床的には副作用が強いが実用範囲での効果か、3) 脳梗塞など他の疾患にも使えるのではないかと、4) BU には神経細胞死を抑える効果があるか、5) BU の培養細胞とラットでの作用の違いはなぜか、6) BU のアストロサイトへの影響はないか、7) 6-OHDA 注入はパーキンソン病モデルとして適切か、8) 培養細胞とラットで LPS と 6-OHDA の傷害処理の違いが BU 作用に及ぼす影響など。

申請者は質問の内容を十分理解した上で的確に応答した。審査委員は、申請者が本論文関連領域に対して学位授与に値する十分な見識と能力を有することを全員一致で確認し、本論文が学位授与に値すると判定した。