

(第 12 号様式)

学位論文の要約 (研究成果のまとめ)

氏 名 檜垣 ひろみ

学位論文名 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

学位論文の要約

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進行性のドパミン神経細胞の変性脱落を生じる。マイクログリアは脳の唯一の中胚葉由来細胞であり、マクロファージや単球と類似した機能を持つ。神経細胞の変性に伴いマイクログリアは Toll-like receptor (TLR)4 を発現する。これに high mobility group box1 (HMGB1) が結合することにより誘導型一酸化窒素合成酵素 (inducible nitric oxide synthase: iNOS) や interleukin-1 β (IL-1 β) の発現が誘導され起炎症性反応が進み、さらなる神経細胞障害が起こる。これらより、パーキンソン病においてマイクログリアの起炎症性活性化を抑制することが病態の改善につながると期待されてきた。我々は今回、リポ多糖 (lipopolysaccharide: LPS) を負荷したマクロファージに対し、催眠鎮静薬ブロモバレリル尿素 (bromovalerylurea: BU) が著明な抗炎症性活性を示し、ドパミン神経細胞障害物質 6-hydroxydopamine (6-OHDA) によって誘発されたラットパーキンソンモデルでの神経変性の改善に有効である可能性を見出した。

ラット新生仔前脳より脳細胞を採取し、これよりマイクログリアを得た。マイクログリアと大脳皮質由来一次培養神経細胞との共培養系を作成し、LPS と BU を添加したものを 48 時間培養した。マイクログリアから放出された一酸化窒素 (NO) を間接的に測定しマイクログリアの起炎症性活性化の指標とした。その他、定量的リアルタイム PCR、ウエスタンブロットで分析した。また、6-OHDA を 7 週令オス Wistar ラット (220g-250g) の右線条体に注入し、片側パーキンソン病モデルを作成した。BU 投与群に対しては、500mg/L の BU 水溶液を自由飲水させ、ヒトへの投与の極量 3g/日と同程度となるよう投与した。7 日間投与したのち、黒質を含む中脳腹側被蓋野を採取し、定量的 RT-PCR、イムノブロットなどで分析した。動物実験については、愛媛大学動物実験委員会に計画書を提出し審査・承認を受け、愛媛大学動物実験規則に従って実施した。

動物実験では、ラット片側パーキンソン病モデルに対し、BU 投与は黒質のドパミン神経細胞

の脱落を抑制した。また BU は、黒質を含む中脳腹側組織での interferon regulatory factors (IRFs)1、7、8 などの起炎症性転写因子、IL-1 β などの起炎症性サイトカインの発現低下、insulin-like growth factor-1 (IGF-1)、hepatocyte growth factor (HGF) や platelet-derived growth factor-A (PDGF-A) などの神経保護因子の発現上昇を誘導した。培養実験では、BU 添加濃度 100 μ g/ml において、LPS 誘発 NO 産生を有意に抑制した。また定量的 RT-PCR およびイムノブロットにより、BU は iNOS mRNA およびタンパク質発現を抑えることを示した。共培養系では、LPS 負荷による神経細胞死が BU 添加で抑制された。また BU は LPS 刺激後の iNOS、IL-1 β 、IL-6、cyclooxygenase (COX2) の mRNA 発現をデキサメサゾンと同定度に抑制した。BU は LPS 刺激による、nuclear factor-kappa B (NF- κ B) の核内移行を抑制しなかったが、LPS 刺激後の Janus kinase1 (JAK1)、signal transducers and activator of transcription (STAT)1、3 のリン酸化を抑制し、IRF1、IRF8 の発現を減少させた。マイクログリアの IRF1 または IRF8 発現ノックダウンにより、LPS 誘発 NO 産生が抑制された。

BU はマイクログリアの起炎症性活性化を強力に抑え、神経保護的な活性型へ誘導することが示唆された。BU は、NF- κ B の核内移行は抑制しないものの、JAK/STAT 経路の活性化を抑えることで IRF1 および IRF8 の発現を抑制し、マイクログリアの起炎症性活性化を抑制する可能性がある。同様のメカニズムにより、黒質緻密部の起炎症性マイクログリア活性化を抑制し、神経細胞死を減少させる。BU は本来、催眠鎮静薬として開発されたが、抗炎症作用発揮に要する投与量は、催眠鎮静作用に必要な投与量より少ないことがわかっており、パーキンソン病治療薬としての BU の臨床応用が期待される。なお、この学位論文の内容は、以下の原著論文に既に公表済である。

主論文 : Hiromi Higaki, Mohammed Emamussalehin Choudhury, Chisato Kawamoto, Keisuke Miyamoto, Afsana Islam, Yurika Ishii, Kazuya Miyanishi, Haruna Takeda, Naoto Seo, Kana Sugimoto, Hisaaki Takahashi, Hajime Yano, Junya Tanaka : The hypnotic bromovalerylurea ameliorates 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic neuron loss while suppressing expression of interferon regulatory factors by microglia
Neurochemistry International 99:158-168, 2016 DOI :10.1016/j.neuint.2016.06.013.

参考文献 : Hitomi Aono, Mohammed Emamussalehin Choudhury, Hiromi Higaki, Kazuya Miyanishi, Yuka Kigami, Kohdai Fujita, Jun-ichi Akiyama, Hisaaki Takahashi, Hajime Yano, Madoka Kubo, Noriko Nishikawa, Masahiro Nomoto, Junya Tanaka : Microglia may compensate for dopaminergic neuron loss in experimental Parkinsonism through selective elimination of glutamatergic synapses from the subthalamic nucleus
Glia 65, 11:1833-1847, 2017 DOI :10.1002/glia.23199