



Title	MPTP誘発パーキンソン病モデルマウスのドパミン神経障害におけるNa ⁺ /Ca ²⁺ 交換系の病態的意義に関する研究
Author(s)	梨子田, 哲明
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58575
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

【13】	
氏 名	梨 し だ 哲 明
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 2 4 5 2 0 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 23 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学 位 論 文 名	MPTP誘発パーキンソン病モデルマウスのドバミン神経障害における Na ⁺ /Ca ²⁺ 交換系の病態的意義に関する研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 松田 敏夫 (副査) 教 授 藤尾 慶 教 授 橋本 均 教 授 八木 清仁

論 文 内 容 の 要 旨

細胞内 Ca²⁺濃度は通常、細胞外濃度の約 10,000 分の 1 程度に保たれており、細胞内 Ca²⁺は細胞の接着や生存、膜興奮、シナプス活動などの広範な細胞機能を制御している。こうした Ca²⁺の生理学的重要性から、電位依存性 Ca²⁺チャネルをはじめとする Ca²⁺濃度調節分子の多くが創薬標的と考えられている。形質膜に存在する Na⁺/Ca²⁺交換系 (NCX) は、細胞内 Ca²⁺の細胞外への排出 (順モード) と細胞外 Ca²⁺の細胞内への流入 (逆モード) という両

方向性の Ca^{2+} 輸送によって細胞内 Ca^{2+} 濃度調節に働いている。Matsuda らにより開発された SEA0400 は最も優れた選択性及び阻害活性を有する NCX 阻害薬であり (*J Pharmacol Exp Ther* **458**: 155-162, 2001)、NCX の基礎研究に広く用いられている。NCX の病態的意義については、これまでに心臓や脳などの虚血性細胞死において、NCX 逆モードを介した Ca^{2+} 流入の関与が示されている。また、当研究室では NCX が一酸化窒素 (NO) により活性化されることを見出している。さらに、NO はパーキンソン病をはじめとする神経変性疾患や虚血において、細胞障害に関与することが示唆されている。最近、当研究室では、アストロサイト及びミクログリアの NO 誘発細胞死において NCX の関与を明らかとした。しかしながら神経細胞 NO 誘発細胞障害における NCX の役割は不明である。

パーキンソン病は、中脳黒質-線条体路ドパミン神経の変性及び脱落を解剖学的特徴とし、運動機能失調を主症状とする神経変性疾患である。1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) は、ドパミン神経障害ならびに協調運動機能障害を誘起する化合物で、齶歯類や靈長類におけるパーキンソン病モデル作成に汎用されている。MPTP による神経障害機序は、NO 合成酵素欠損マウスにおいてその毒性の減弱が認められ、障害進行における NO の重要性が示唆されている。また最近、Chan らはドパミン神経への Ca^{2+} 流入により MPTP の神経毒性が増強することを報告し、パーキンソン病のドパミン神経障害における Ca^{2+} 濃度調節機構の重要性を示した (*Nature* **447**: 1081-1086, 2007)。さらにパーキンソン病で細胞死が起こる黒質には、NCX の 1~3 のアイソフォームのうち NCX1 の発現が、線条体には NCX1~3 全てのアイソフォームの発現が報告されており、NCX がパーキンソン病のドパミン神経障害に関わっていることが考えられる。本研究では MPTP 誘発ドパミン神経障害を NO 関連の *in vivo* 病態モデルとして捉え、NO 関連神経障害における NCX の病態的意義を追究した。

まず、ドパミン神経系細胞である SH-SY5Y 細胞を用いて NO ドナーである sodium nitroprusside が引き起こす細胞障害の分子機構を検討した。NO 誘発活性酸素種 (ROS) 産生及び細胞死において、extracellular signal-regulated kinase (ERK) 及び p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) の関与を明らかにした。また細胞内 Ca^{2+} キレーターや細胞外 Ca^{2+} 除去の検討から、細胞外からの Ca^{2+} 流入が MAPKs 活性化とそれに引き続く ROS 産生を引き起こすことを示した。

次に、NCX 阻害薬 SEA0400 を用いて NCX の関与を検討した。NO による Ca^{2+} 流入、そして細胞外 Ca^{2+} に依存している MAPKs 活性化及び ROS 産生に対して SEA0400 が抑制作用を示すことを明らかにした。さらに、SEA0400 と異なり、電位依存性 Ca^{2+} チャネル阻害薬 nifedipine、容量性 Ca^{2+} チャネル阻害薬 2-aminoethoxydiphenyl borate は NO 誘発細胞死に対して抑制作用を持たないことを示した。これまで NO 誘発神経細胞死における Ca^{2+} 濃度上昇

機構の詳細は不明であったが、以上の成績より NCX 逆モードを介した Ca^{2+} 流入が、一連の障害過程の上流シグナルとして機能することが明らかとなった。また、NCX 調節系である cGMP/PKG シグナルが本細胞の NO 誘発 Ca^{2+} 流入に関与することを示した。当研究室では既に、ミクログリア及びアストロサイトの NO 誘発細胞死において NCX の関与を見出しているが、本研究ではドパミン神経細胞において、NO-NCX 系による Ca^{2+} 流入が細胞障害に関与することを明らかにした。

MPTP 誘発パーキンソン病モデルマウスにおいて、神経型 NO 合成酵素 (nNOS) 阻害薬 7-nitroindazole 前処置によりドパミン神経障害及びニトロチロシン增加の抑制が認められた。そこで MPTP 投与マウスを nNOS 由来 NO と関連した神経障害モデルと捉え、SEA0400 の作用を検討した。SEA0400 が黒質ドパミン神経障害及び協調運動機能低下に対して抑制作用を示すことを見出した。またその障害経路に関して、SEA0400 が MPTP 最終投与後 1 時間以内で認められる MPTP の代謝及び NO 産生に対して影響せず、24 時間後以降で認められる ERK リン酸化、及び ROS 産生の指標である脂質過酸化を抑制することを明らかにした。これらの成績より、MPTP 投与マウスにおいて、NCX が NO 産生に引き続いて認められる ROS 産生に、そして最終的なドパミン神経障害に関与していることを明らかにした。

本研究で見出したドパミン神経細胞における NO-NCX を介した Ca^{2+} 流入機構の存在は、パーキンソン病の分子病態における NCX の重要性を示唆するものであり、本研究成果が NO 関連の神経変性疾患の病態解明そして治療薬開発に寄与することを期待する。

論文審査の結果の要旨

$\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ 交換系 (NCX) は、11回膜貫通型のタンパク質で細胞内 Ca^{2+} 濃度の調節に関わっている。また、NCX は逆モードで Ca^{2+} 流入を引き起こし、虚血性障害などでの病態的意義が注目されている。当分野では NCX の創薬的意義に関する一連の研究をしており、一酸化窒素 (NO) が NCX を活性化すること、さらにミクログリア、アストロサイトなどの *in vitro* 培養系において、NCX が NO 誘発細胞障害に関わっていることを明らかにした。しかしながら、NO 誘発細胞障害の分子機構の詳細は細胞により異なっており、未だ検討していない神経細胞での NO 障害における NCX の関与については不明であった。これらの背景のもと、本研究では、神経細胞での NO 誘発細胞障害における NCX の関与について検討し、また NCX の関与を *in vivo* の障害モデルシステムで初めて追究した。

その結果、ドパミン神経系細胞である SH-SY5Y 細胞において、NO が MAPK シグナル (ERK、p38-MAPK が関与するが、アストロサイトと異なり JNK は関与しない) を介し細胞死を引き起こすこと、そのトリガーとしての細胞内 Ca^{2+} 増加に NCX の逆モードが関与

していることを薬理学的に検証した。また、NOの関与している病態モデルとして、MPTP誘発パーキンソン病モデルマウスを採り上げ、ROS産生、NO産生、MAPKのリン酸化、ドバミン神経障害、行動異常の面からNCXの関与について検討し、NCXがin vivoでのNO関連神経障害に関わっていることを初めて示した。

これらの結果は、パーキンソン病の病態発現にNCXが関わっていることを初めて明らかにしたもので、神経系におけるNCXの新たな創薬的意義を示したものである。NO-NCX相互作用をin vitro、in vivoで追究した本研究成果は、今後の創薬研究に貢献することが期待され、博士（薬学）の学位授与に充分値するものと考えられる。