

論文の要旨

申請者 田村 吏沙

研究論文題目

皮質線条体急性スライスに対する虚血後再灌流モデルにおけるアデノシンデアミナーゼ補充の細胞保護効果

1. 背景と目的

脳神経細胞は毒物、物理ストレスや虚血に脆弱である。現在、脳虚血疾患は早期診断および血栓溶解療法等も可能になったが、再灌流障害は大きな課題である。活性酸素除去剤のエダラボンの他に脳保護薬として使用できる薬剤はない。

大脳基底核線条体は脳の中でも最も虚血等に脆弱な部位の一つである。ここを病巣とする疾患は、ラクナ梗塞、頭部外傷後精神障害、乳幼児の低酸素脳症など、幅広い。しかし線条体ではエダラボンの神経保護効果に否定的な見解がある。新規に、内在性の生体物質によって、神経保護効果が示唆され、かつ、線条体で効果が認められれば、治療法に発展する可能性がある。

アデノシンは、ヌクレオシドの一種で、普遍的に生体に内在する。瞬時に細胞内外を移動し、動態が複雑である。アデノシンは脳虚血後数分で細胞外濃度が10倍以上に上昇することは、*vivo*でも、急性スライスでも、確認されている。しかし、アデノシン作動薬・拮抗薬が細胞保護薬になりうるかは、複数の受容体に関わる複雑な分子機構の前に未だ議論がある。

アデノシンは、アデノシンデアミナーゼ (adenosine deaminase: ADA) によって比較的不活性なイノシンに分解が促進される。ADAは、細胞内外に普遍的に存在し、免疫担当細胞に高く発現する酵素で、線条体でも高く発現する。中

中枢神経系の虚血ストレスに関する細胞保護効果の報告は渉猟した限りなかった。

本研究では、急性スライスを用いてラット脳虚血後再灌流モデルを調整し、ADA による神経保護効果を検証した。

2. 対象と方法

① 電気生理学的応答の検討

今回の手法は、電気刺激を一定間隔で入力し続けて、脳神経の電氣的応答から、虚血前後の影響を経時的に評価する。急性スライスでは虚血後再灌流状態がこの手法で評価できることが知られている。今回、光刺激入力でもシナプス前後に活動電位を発生させられる遺伝子改変ラット (W-Tg(Thy-1-COP4/YFP*)4Jfhy rat) から皮質線条体急性スライスを作成し、10 分間の oxygen-glucose deprivation (OGD) ストレスをかけたのちに再び通常の酸素・グルコース濃度である人工脳脊髄液灌流に切り替え、電気刺激および光刺激での応答を経時的に評価した。OGD 中の灌流液中に、ADA を含有するものと、含有しないものを、比較した。

② OGD 後死細胞数の検討

OGD 後数時間で、遅発性に急性スライス試料内に死細胞数が増大することが知られているため、ADA 含有 OGD 負荷群と、OGD のみ負荷群での PI 陽性細胞数で、面積当たり死細胞数を比較した。

③ 蛋白発現の抑制検討

細胞傷害・可塑性に強く関与するオートファジー関連タンパク LC3-II は、低酸素状態後に増加することが知られている。OGD 負荷群および OGD 中に ADA を補充した群の急性スライス試料のウェスタンブロットで LC3-II 量を比較し、オートファジーに関わる機序が関連するか評価した。

3. 結果

- ① OGD 開始後約 5 分～再灌流時に、電気刺激に対する応答の減弱および光刺激に対する応答の減高を認めた。再灌流開始後復帰はそれぞれ $65.1 \pm 5.0\%$ および $82.4 \pm 5\%$ にとどまった。光応答を併用して虚血負荷応答を評価した試みは検索しえた限りほかに見当たらない新規のものである。また、光刺激への応答は電気刺激に対する応答より安定していた。オプトジェネティクスによる field potential を viability 評価に用いた報告も他にない。新たな手法として有用である可能性がある。

ADA 含有 OGD 負荷では、電気刺激・光刺激に対する応答の復帰率は、それぞれ $103.9 \pm 11.8\%$ および $101.3 \pm 5.5\%$ で、単なる OGD 負荷より良好であった。

- ② 6 時間後の死細胞数は有意に ADA 含有 OGD 負荷で抑制された。
- ③ 1 時間後の LC3-II の発現が ADA 含有 OGD 負荷で抑制された。OGD 中の ADA 補充には、オートファジー抑制効果があるとみられる。

4. 考察

従来、線条体急性スライスでの OGD モデルに ADA 投与を試みた報告が認められなかったが、今回細胞保護効果を認めた。ADA 欠損症およびプリン代謝回路異常症の小児に報告される神経学的異常への対処に、脳保護を目的とした酵素の補充が有用となりえることを示唆した。

さらに、オプトジェネティクスを用いた光刺激入力に対する応答と、電気刺激入力に対する応答を、並行して取得できた。光刺激によって得られた応答は安定していて、実験に供する動物の頭数を減らせる可能性がある。

5. 結論

- A. アデノシンデアミナーゼは、ラット皮質線条体急性スライスへの虚血ストレスに対して、①神経細胞の電気生理学的応答の維持、②死細胞数の抑制、③オートファジー関連タンパク LC3-II 発現の抑制、の 3 つの点で神経保護作用をもつ。
- B. 線条体急性スライスの電気生理学的応答を評価する際に、従来からの電気刺激に比べて光科学的刺激は安定して用いることができた。