

培養ニューロンにおけるTDP-43凝集体形成の経時的観察

石井智裕¹、河上江美子²、遠藤堅太郎²、三澤日出巳¹、渡部和彦³

¹慶應義塾大学薬学部、²東京都医学総合研究所基盤研究センター、

³杏林大学保健学部

【目的】 TAR DNA binding protein 43kDa (TDP-43) の細胞内凝集は筋萎縮性側索硬化症 (ALS) における90%以上の症例で観察され、最も重要な病理所見の一つである。神経前駆細胞より誘導した培養ニューロン・グリア細胞系へ正常TDP-43とそのC末断片を導入し、プロテアソーム阻害剤であるMG132で処理すると、ヒト症例に類似した凝集体が形成される。しかし、凝集体形成と細胞死の関連性は明確ではないため、本研究では、タイムラプス・イメージングにより経時的に観察を行い、両者の関係を検討した。

【方法】 ラット神経前駆細胞よりTubulin beta III promoter制御下EGFPを発現するstable lineを樹立した。同細胞株をレチノイン酸によってEGFP陽性ニューロンに分化させたのち、ヒト正常またはC末断片 (208-414) TDP-43をDsRed融合蛋白として発現する組換えアデノウイルスを共感染させた。感染24 時間後、プロテアソーム阻害剤MG-132 (0.5 μ M) を負荷し、DeltaVision (GE) によるタイムラプス蛍光撮影を72時間行い、細胞質凝集体の形成と細胞死を経時的に観察した。

【結果】 組換えアデノウイルスはEGFP陽性分化ニューロンの80%以上に感染発現した。この感染ニューロンにMG-132を投与すると、12時間後よりDsRed陽性凝集体が形成されはじめ、細胞質に徐々に充満し、やがて細胞膜の破綻とともに細胞死に至る像が多数観察された。凝集したTDP-43は不溶性となり、細胞膜破綻後も30時間以上残留することがわかった。

【考察】 培養ニューロンにおけるTDP-43凝集体の形成過程を経時的に観察することに成功した。また現在、凝集体の細胞間伝播の可視化についても検討を行っている。

O-2-2 

抗腫瘍性抗生物質Mithramycinの筋萎縮性側索硬化症治療薬としての可能性

○兼古絵里菜、小菅 康弘、鈴木 里実、南郷 拓嗣、石毛久美子、伊藤 芳久
日本大・薬・薬理

【目的】筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis; ALS) は、運動ニューロン選択的な変性を特徴とする極めて予後不良の神経変性疾患である。我々は、これまでに放線菌由来の抗腫瘍性抗生物質であるMithramycin (MTM) が、培養海馬神経細胞のツニカマイシン誘発神経細胞死において、小胞体ストレス誘導性転写因子 C/EBP-homologous protein (CHOP) の発現レベルの上昇を抑制し、神経細胞保護効果を示すことを報告している。本研究では、ALSモデルとして汎用されている G93A superoxide dismutase 1トランスジェニックマウス (G93A) を用いて、MTMの治療薬としての可能性を検討した。

【方法】実験には、雄性G93Aを用い、MTMは、150 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ で1日1回、週5日間、計4週間腹腔内投与した。対照群には、生理食塩液を投与した。腰髄におけるCHOP mRNAの発現レベルはreal time PCR法により、ALS症状はRotarod法により評価した。症状の発現をもって発症とし、発症までの期間および生存期間はKaplan-Meier法により評価した。タンパク質の発現は、Western blot法および免疫組織化学的手法により検討した。

【結果・考察】腰髄におけるCHOP mRNAの発現レベルは、発症前の11週齢と比べ、発症直前の13週齢以降で増加傾向を示し、17週齢で最大値を示した。13週齢からMTMを4週間投与したところ、17週齢におけるCHOP mRNAの増加は有意に抑制された。発症までの期間も、対照群では 100 ± 2.4 日、MTM投与群では 113 ± 6.4 日であり、有意に延長された。また、生存期間も、対照群では 139 ± 5.5 日、MTM投与群では 145 ± 9.3 日であり、延長傾向が認められた。さらに、MTMの投与は腰髄におけるミクログリアの増加を顕著に抑制した。以上より、G93AのALSの発症および症状の進行には、脊髄におけるCHOP mRNAの発現増加を伴う小胞体ストレスが重要な役割を演じていることが明らかとなった。また、MTMはCHOP mRNA発現やミクログリアの増加を抑制することで発症を遅延させることから、ALS治療薬となる可能性が示された。

カフェインは in vitro 海馬鋭波の頻度を増加させる

○渡邊 裕亮¹、乗本 裕明²、宮脇 健行¹、上村 成章¹、阿部 麗美¹、松本 信圭¹、池谷 裕二¹

¹東京大学大学院薬学系研究科 薬品作用学教室、²脳科学総合研究センター システム神経生理学研究チーム

【目的】睡眠時に海馬で観察される鋭波（Sharp wave、以下SW）は、行動時の神経活動の再生を含み、また記憶固定化に寄与していることが知られている。また一方、カフェインは複数の行動試験で記憶固定化を促進することが報告されている。そこで我々は、カフェインが SW を調節しているのではないかと考え、これを薬理的に検討した。

【方法】C57BL/6J マウスから脳を取り出し、水平方向に12.7° 傾けて海馬急性スライスを作成した。そして人口脳脊髄液中において、この海馬急性スライスから多電極アレイを用いて 64 チャンネル同時に細胞外電位を記録し、自発的に発生する SW を観察した。今回、人口脳脊髄液中にカフェインを投与することによって、海馬急性スライス全体にカフェインを作用させ、SW の変化を観察した。

【結果・考察】海馬急性スライスにカフェイン（アデノシン受容体非選択的アンタゴニスト）を作用させると SW の発生頻度が上昇した。このとき平均ピーク強度は低下した。この作用は可逆的かつ濃度依存的であった。またアデノシン1受容体選択的アンタゴニストの DPCPX は SW の発生頻度を上昇させたが、アデノシン2A受容体選択的アンタゴニストの SCH58261には効果は観察されなかった。以上から、カフェインが SW に影響を与えること、この作用がアデノシン1受容体阻害を介している可能性が示された。本実験で用いたカフェイン濃度は生理的条件に近いと考えられるので、カフェインの持つ記憶促進作用のメカニズムに上述の SW の変化が関わっている可能性がある。

O-2-4  YIA

Parkinson 病患者 iPS 細胞由来神経細胞におけるメタボライトの変動と DNA メチル化変化の解析

石見華恵¹、葛巻直子^{1,2}、須田雪明¹、大西彩加¹、赤松沙綾¹、五十嵐勝秀³、
成田道子¹、竹島秀幸⁴、牛島俊和^{3,4}、服部信孝⁵、末松 誠⁶、岡野栄之²、
成田 年^{1,3}

1) 星薬科大学薬理学教室、 2) 慶應大学医学部生理学教室、 3) 星薬科大学先端生命科学
研究センター (L-StaR)、 4) 国立がん研究センター研究所・エピゲノム解析分野、 5) 順
天堂大学医学部脳神経内科、 6) 慶應大学医学部医化学教室

生体恒常性の維持は、環境変化やストレス刺激などに対して生体が順応するための必須の生理機構であり、その破綻が疾患の発症に繋がると考えられている。一方、生体内には DNA や RNA、タンパク質のほかに、糖、アミノ酸、有機酸などの低分子代謝物が存在しており、疾患病態における生体恒常性の変動を理解するためには、ゲノミクスやプロテオミクスに加えて、メタボロミクスを把握することが重要である。そこで、本研究では、パーキンソン病 (PD) 病態下における中脳ドパミン (DA) 神経の器質的脆弱性を探索する目的で、疾患特異的 iPS 細胞技術を用いて PD 病態下における代謝変動ならびにエピゲノム変化の網羅的解析を行った。まず、健常者ならびに PD 患者由来 iPS 細胞から疾患感受性細胞である DA 神経細胞へ分化誘導し、網羅的メタボローム解析を行った。その結果、健常者と比較し、PD 患者 iPS 細胞由来の DA 神経細胞において、解糖系およびグルタチオン代謝経路に関連した種々の代謝物に変動が認められた。中でも、DNA 脱メチル化に関与する Ten-eleven translocation (TET) の働きを阻害する 2-hydroxyglutaric acid (2-HG) ならびにヒストンリジン残基のメチル化や DNA のメチル化においてメチル基供与体として働く S-adenosylmethionone (SAM) といったエピジェネティクス修飾に関連した代謝物の産生が、PD 患者 iPS 由来 DA 神経細胞において著明に亢進していることが明らかとなった。このことから、PD 病態下で認められる代謝変動が DA 神経細胞のエピゲノム変化へ影響している可能性が想定される。そこで、Infinium Methylation assay 法に従い、DNA メチル化の網羅的解析を行った。遺伝子の発現調節に最も重要な領域と考えられる転写開始点直上領域に照準を絞り、健常者と比較し PD 患者 iPS 細胞由来 DA 神経細胞において DNA メチル化の変動を解析したところ、HtrA4 および MEG3 遺伝子の DNA メチル化が著明に増加していることが明らかとなった。以上、本研究の結果より、PD 患者 iPS 細胞由来 DA 神経細胞において、代謝変動に連動した DNA メチル化の変化が認められ、こうした変化が PD 病態下における DA 神経細胞の脆弱性に一部関与をしている可能性が示唆された。

in vitroにおけるTRPV4チャネルの脳浮腫への関与

星雄高、小山隆太、池谷裕二、松木則夫

東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室

脳浮腫は脳梗塞に伴う虚血やウイルス感染により脳組織に水分が過剰に溜まることで脳が膨張する疾患である。脳浮腫発症時における脳組織の容積変化に着目した知見は少なく、病態メカニズムも未解明である。また、これまでに有効な治療薬は見出されていない。本研究では、脳浮腫の発生を経時的に観察できるin vitro 評価モデルを用いた。このin vitro評価モデルは、マウスの脳から急性脳スライスを作製し、その断面積の経時変化を測定するというものである。まず、脳浮腫の原因の一つである脳梗塞時の虚血状態を模倣した環境として、脳スライス標本にOxygen-Glucose Deprivation (OGD) 処置を行ったところ、OGD 処置後に標本の断面積が有意に増加した。この断面積変化は虚血により脳組織が増大するという脳浮腫の一面を捉えている。

脳に豊富に発現している非選択的カチオンチャネルの一つ、TRPV4は、網膜神経細胞の容積制御に関与するという報告がある。OGD 処置と同時にTRPV4 アンタゴニストである HC-067047 を処置したところ、急性脳スライスの断面積増加が抑制された。逆に、TRPV4 アゴニストである GSK1016790Aを適用したところ、OGD処置をしなくても単剤で断面積が有意に増加した。これらの結果から、TRPV4 の活性化が脳浮腫を引き起こすことが示唆された。また、TRPV4は、温度感受性を持ち、熱により活性化することが知られている。そこで、in vitro評価系で熱刺激処置を行ったところ、急性脳スライスの断面積は有意に増加し、そしてこの増加はTRPV4の阻害により抑制された。発熱を伴う感染症が引き起こす脳浮腫は、ウイルスに応答した白血球が放出したサイトカインによる血管の障害が原因であると考えられてきた。しかし、発熱が脳浮腫を引き起こす一因となり得るという事実は本研究により初めて明らかとなった。この脳浮腫におけるTRPV4の関与の発見は、病態メカニズムの解明に新たな視点を提供するものである。

Methamphetamine による摂取感覚効果発現機序解明のためのニューラルサーキットジェネティクス法および ON cell 解析法の応用

菅 綾香¹、林 明音¹、長井雅子¹、佐々木雅大¹、岩澤千鶴¹、渡邊 萌¹、
濱田祐輔¹、成田道子¹、田村英紀²、葛巻直子¹、森 友久¹、成田 年^{1,2}

¹星薬科大学薬理学教室 ²星薬科大学先端生命科学研究センター(L-StaR)

覚せい剤である methamphetamine (METH) は日本で最も乱用されている依存形成薬物である。METH が精神依存を引き起こす機序には、中脳辺縁 dopamine 神経系の活性化、さらには、側坐核における dynorphin や enkephalin といった内因性オピオイドならびに GABA を含有する中型有棘神経細胞 (MSN) への刺激が重要であることが知られている。一方、各脳領域に存在する細胞群は、個々にそれぞれ異なる分子発現を示す、いわゆる細胞特異性を持っている可能性が想定されるため、METH 依存形成機序を解明するためには、特定細胞の個別の役割をより詳細に理解し、依存時における変化を解析していく必要がある。そこで本研究では、まず初めに cFos-eNpHR マウスを使用し、側坐核領域における METH 活性化細胞の人工的活性制御を行った。その結果、METH 誘発自発運動促進作用には、側坐核領域における特定細胞の活性化が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。続いて、薬物弁別法に従い、METH 摂取感覚効果発現における D1-ならびに D2-受容体の関与を検討したところ、METH の摂取感覚効果に対して、D1-受容体作動薬によるのみ般化が認められた。これらのメカニズムを細胞レベルで確認するために、cFos-TetTag マウスを用い、側坐核領域における METH 活性化細胞および D1-受容体作動薬活性化細胞の解析を、免疫組織化学的染色法に従って行った。その結果、METH 活性化細胞および D1-受容体作動薬活性化細胞は、一部、同一細胞である可能性が示唆された。次に、内因性オピオイド遺伝子欠損マウスを用いて D1-受容体作動薬による般化試験を行った。その結果、METH の摂取感覚効果に対する D1-受容体作動薬による般化は、内因性オピオイド遺伝子欠損マウスにおいて有意に減弱した。続いて、METH 活性化細胞および内因性オピオイド含有神経の解析を行った結果、METH 活性化細胞の一部は内因性オピオイド含有神経であることが明らかとなった。さらに、METH 活性化細胞における GABA 発現の有無を検討したところ、METH 活性化細胞には、GABA 含有神経と GABA 非含有神経が存在することが確認された。以上のことから、METH 誘発摂取感覚効果発現に対する D1-受容体作動薬による般化は、一部、側坐核における同一細胞の活性化によることが示唆され、さらには METH 活性化細胞は D1-受容体及び、一部内因性オピオイドを含有する神経細胞であることが明らかとなった。