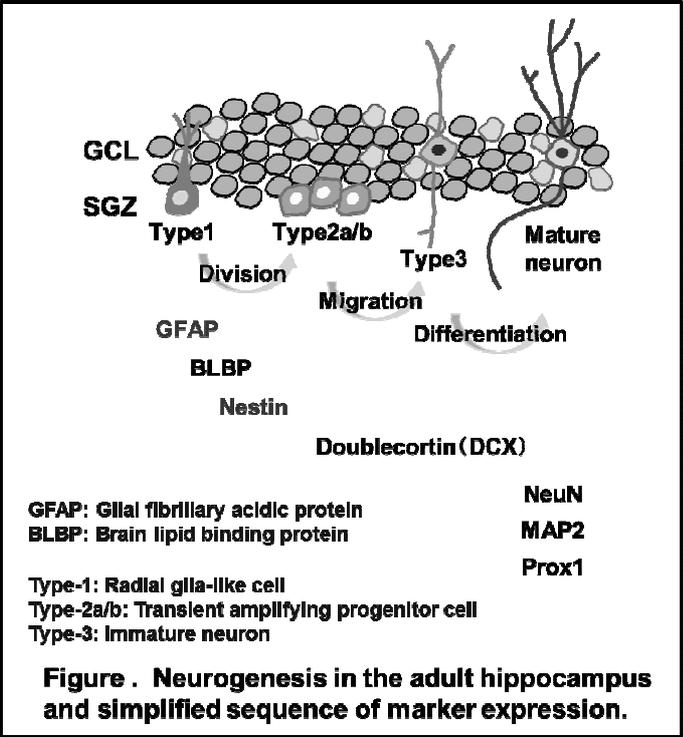


氏名	た な か ま さ ゆ き 田 中 雅 幸
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	薬博甲 第 3 1 号
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当者
学位授与の年月日	平成 2 9 年 3 月 2 4 日
学位論文題目	脳内ニューロン新生に対する 脳梗塞再発予防薬の効果に関する研究
論文審査委員	（主査）前田 定秋 （副査）荻田 喜代一 （副査）米山 雅紀

論 文 内 容 の 要 旨

近年、ヒトをはじめとする成体哺乳動物中枢神経系には神経系幹・前駆細胞（neural stem/progenitor cells: NPCs）が存在し、新たにニューロンが生まれること（ニューロン新生）が明らかとなっている。その代表的な部位が側脳室下帯および海馬歯状回である。海馬は大腦辺縁系の一部であり、CA1 領域、CA2 領域、CA3 領域および歯状回領域からなる。歯状回は内側から歯状回門、顆粒細胞下帯（subgranular zone: SGZ）を含む顆粒細胞層（granule cell layer: GCL）、および分子層から構成される。成体哺乳動物の海馬歯状回の成熟 NPC には、成熟度の違いにより Type-1、Type-2a/2b および Type-3 に分類される（Figure）。NPCs は、自己増殖を繰り返し中枢神経系のニューロン、アストロサイトおよびオリゴデンドロサイトの 3 種類の細胞に分化する多分化能をもつ未分化な前駆細胞と定義されている。この多分化能をもつ NPCs が成体脳から分離培養が可能となり、中枢神経の再生・再構築を活用した中枢神経変性疾患に対する治療法が注目されている。また、近年の再生医学の発展により胚性幹細胞や胎児脳から得られた細胞を用いた脳内移植療法が注目されている。し



かしながら、腫瘍発生、免疫拒絶、生着率などの解決しなければならない課題を抱えている。したがって、障害した中枢神経組織を修復する方法として脳内の内在性 NPCs を賦活してニューロン新生を促進することが考えられる。

中枢神経系に大きな障害がみられる疾患として脳梗塞が挙げられる。脳梗塞発症後は、再発予防に向け、抗凝固薬や抗血小板薬などの脳梗塞再発予防薬を投与するとともに、早期の日常生活動作向上と社会復帰を図るため、積極的なリハビリテーションを行うことが推奨されている。一方、脳梗塞発症 48 時間以内にアスピリンあるいはシロスタゾールなど血液凝固阻止薬を開始すると、死亡率とともに要介護患者を有意に減少させることが認められており、脳梗塞発症後の脳梗塞再発予防薬の早期開始は機能予後の改善に有用である可能性がある。さらに、これらの脳梗塞再発予防薬による治療は、高次機能の改善も期待されることから、これらの薬物が脳損傷部位付近でのニューロン新生を促進するために NPCs の増殖および生存の維持を促進する可能性が推察される。

以上のことから、本研究では、成体脳の海馬における NPCs の増殖・分化に対する脳梗塞再発予防薬への影響を明らかにする目的で、海馬歯状回の NPCs の増殖に対する各種脳梗塞再発予防（抗トロンビン薬、抗血小板薬）の効果について解析した。また、海馬歯状回障害後のニューロン新生に対する脳梗塞再発予防薬の影響を検討した。

【成体マウス海馬歯状回由来 NPCs の増殖における Protease activated receptor-1 (PAR-1) の役割】

トロンビンは、出血性脳血管疾患や虚血性脳血管疾患などの病態時において血液中から脳実質内に漏出して神経細胞のアポトーシスを誘導する。一方、トロンビンは、脳内でも合成されており、正常脳において protease-activated receptors (PARs) を介した細胞内シグナルによりグリア細胞の増殖・分化の調節などの生理的役割を演じる可能性が示唆されている。しかしながら、NPC の増殖に対する PARs の役割は不明である。したがって、本章では、成体マウス海馬歯状回由来 NPCs の増殖に対するトロンビンおよび PAR-1 関連ペプチドの影響について解析を行った。

5 週齢 ddY 系雄性マウス歯状回から NPCs を単離し、そのマーカー蛋白質である nestin および brain lipid binding protein (BLBP) の抗体による蛍光免疫染色を行ったところ、両蛋白質共に 95%以上が陽性であることが確認された。また、分化誘導条件化での培養により、MAP2 (成熟ニューロンマーカー蛋白質) 陽性 Prox1 (歯状回成熟顆粒細胞マーカー蛋白質) 陽性細胞を多数確認した。さらに、nestin および PAR-1 の蛍光免疫二重染色を行ったところ、nestin 陽性細胞の 90%以上に PAR-1 の発現が確認された。本実験条件下で得られた培養 NPCs にトロンビンの曝露は NPCs の増殖の有意な低下が認められた。また、

トロンビン添加時に AEBSF（トロンビンを含むセリンプロテアーゼ阻害剤）、ダビガトラン（直接トロンビン阻害剤）あるいは RWJ56110（PAR-1 アンタゴニスト）を共存されると、トロンビンによる増殖能低下はいずれの薬物によっても有意に阻止された。さらに、PAR-1 アゴニストペプチド（AP）の曝露は濃度依存的に NPC 増殖能を有意に低下させた。次いで、成体動物脳内 NPC の増殖に対するトロンビンの影響を解析する目的で、インビボ実験系としてマウス脳室内に AEBSF を投与した。その結果、AEBSF は NPCs 数を有意に増加させることが判明した。一方、AP を脳室内投与は、NPCs 数に有意な影響を与えなかった。したがって、常態時には NPCs は PAR-1 により増殖抑制を受けている可能性が示唆される。このように、成体海馬歯状回では常態時においてトロンビン/PAR-1 シグナルが NPC の増殖抑制を介してニューロン新生を抑制する可能性およびトロンビン阻害薬が海馬のニューロン新生を促進することが示唆される。

成体海馬歯状回の NPCs における PAR-1 の細胞内シグナルを解明するため、培養 NPCs を用いて Rho シグナル伝達経路について検討を行った。培養 NPCs にトロンビンまたは AP を曝露したところ、曝露 1 時間後に RhoA 発現量の有意な上昇を認めた。また、Rho キナーゼ阻害薬（Y27632、ファスジル）は、トロンビンおよび AP による NPCs の細胞増殖能の低下を阻止した。したがって、PAR-1 の活性化は Rho シグナルを介して NPC の増殖抑制を惹起することが判明した (1)。

【成体マウス海馬歯状回神経細胞障害後のニューロン新生における PAR-1 の役割】

マウスにトリメチルスズ（TMT）を腹腔内投与すると、TMT 処置 2 日目に海馬歯状回で神経細胞（顆粒細胞）が選択的に脱落する。しかし、その後にニューロン新生が著しく促進し、障害 30 日後には海馬を再生することが示されている (2)。本章では、TMT 処置マウスを海馬歯状回神経細胞障害・再生モデル動物として用い、海馬歯状回神経細胞障害後のニューロン新生における PAR-1 の役割について解析した。

5 週齢 ddY 系雄性マウスに TMT を腹腔内投与し、3 日後に海馬歯状回を摘出し、NPCs を単離・培養した。本培養 NPCs の 90%以上が nestin と PAR-1 が共発現していることが免疫組織化学的解析により明らかとなった。本培養 NPCs にトロンビンを曝露すると、NPC 増殖能の有意な低下が認められた。また、AP もトロンビンと同様な NPC 増殖能低下作用を示した。したがって、海馬歯状回神経細胞障害時に出現する NPCs も常態時の場合と同様に、PAR-1 を介する増殖の負の制御を受けている可能性が判明した。

次いで、インビボ実験系として TMT 処置マウス海馬歯状回における PAR-1

の発現量を解析したところ、TMT 処置後 3 日目より PAR-1 蛋白質の発現量が増加した。また、TMT 処置後の成体マウス海馬歯状回のパラフィン切片を作成し、神経細胞障害後の PAR-1 発現細胞を解析したところ、PAR-1 は 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU、新生細胞) および nestin 陽性細胞に発現し、その細胞数が TMT 処置後 3 日・5 日目 (NPCs 増殖期) で著明に増加することが明らかとなった。以上の結果から、TMT 処置マウスにおいて海馬歯状回神経細胞障害後の NPC 増殖期には、PAR-1 陽性 NPCs が著明に増加することが明らかとなった。

【成体マウス海馬歯状回神経細胞障害後のニューロン新生に対するシロスタゾールの効果】

シロスタゾールは、ホスホジエステラーゼ 3 阻害作用を有する抗血小板薬であり、臨床においてアテローム性脳梗塞およびラクナ脳梗塞再発予防目的で適応される。また、中大脳動脈閉塞によって誘発された脳卒中において、側脳室下帯中の NPCs の発生を増強するとの報告がある (3)。しかしながら、海馬歯状回における神経障害後に一過性に増加するニューロン新生に対するシロスタゾールの影響は不明である。本章は、TMT 処置マウスを用いて、海馬歯状回障害後のニューロン新生に対するシロスタゾールの効果について解析した。

TMT 処置マウスに BrdU とともにシロスタゾールを 15 日間連続投与後に灌流固定し、作成した海馬歯状回のパラフィン切片について BrdU 陽性細胞の検出をおこなったところ、シロスタゾール投与により BrdU 陽性細胞数が有意に増加した。同様の実験条件下で、NeuN (成熟ニューロンマーカー) と BrdU あるいは DCX (未成熟ニューロンマーカー) と BrdU の蛍光免疫二重染色を行ったところ、シロスタゾールは NeuN 陽性 BrdU 陽性細胞数および DCX 陽性 BrdU 陽性細胞数の有意に増加させることが判明した。また、TMT 処置マウス海馬歯状回から単離した NPCs による培養実験系において、シロスタゾールの曝露は培養 NPCs の増殖能を有意に増強することが示された (4)。以上の結果より、シロスタゾールの連続投与は、海馬歯状回神経細胞障害後に出現する NPCs の生存維持を介してニューロン新生を促進することが明らかとなった。

【結語】

以上の結果より、①トロンピンは常態時および海馬歯状回神経細胞障害後の NPCs の増殖能を PAR-1/Rho シグナルを介して抑制すること、②その負の制御は脳梗塞再発予防薬であるダビガトランによって改善し得ること、③脳梗塞再発予防薬であるシロスタゾールは神経細胞障害後に一過性に増加する NPCs の生存維持を介してニューロン新生を促進することが示唆される。このように、脳梗塞再発予防薬は NPCs 増殖能改善作用およびニューロン新生促進作用を介

した脳血管障害後の機能再生治療に有効である可能性は高い。今後、臨床現場で適応されている脳梗塞予防薬・治療薬についての本研究と同様な解析を推し進めることが脳梗塞治療の予後の大きな改善につながると確信する。加えて、同薬物のニューロン新生促進メカニズムを更に詳細に解析することにより、脳梗塞再発予防薬・治療薬の脳血管障害後における神経細胞脱落後のニューロン新生促進作用を有する医薬品の開発が期待される。

【文献】

1. **Tanaka M**, Yoneyama M, Shiba T, Yamaguchi T, Ogita K., 2016. Protease-activated receptor-1 negatively regulates proliferation of neural stem/progenitor cells derived from the hippocampal dentate gyrus of the adult mouse. *J Pharmacol Sci* 131, 162-71.
2. Ogita K, Nishiyama N, Sugiyama C, Higuchi K, Yoneyama M, Yoneda Y., 2005. Regeneration of granule neurons after lesioning of hippocampal dentate gyrus: evaluation using adult mice treated with trimethyltin chloride as a model. *J Neurosci Res.* 82, 609–621.
3. Ogita K, Nitta Y, Watanabe Y, Nakatani Y, Nishiyama N, Sugiyama C, Yoneda Y., 2004. In vivo activation of c-Jun N-terminal kinase signaling cascade prior to granule cell death induced by trimethyltin in the dentate gyrus of mice. *Neuropharmacology* 47, 619–630.
4. Yoneyama M, **Tanaka M**, Hasebe S, Yamaguchi T, Shiba T, Ogita K., 2015. Beneficial effect of cilostazol-mediated neuronal repair following trimethyltin-induced neuronal loss in the dentate gyrus. *J Neurosci Res.* 93, 56-66.