

学位論文題名

Selective vulnerability of spinal motor neurons
to reactive dicarbonyl compounds, intermediate
products of glycation, in vitro: implication of inefficient
glutathione system in spinal motor neurons

(糖化反応中間産物である反応性ジカルボニル化合物に対する
脊髄運動ニューロンの選択的脆弱性：脊髄運動ニューロンにおける
非効率的なグルタチオン系の示唆)

学位論文内容の要旨

後期糖化最終生成物、Advanced glycation end products (AGEs) は老化や糖尿病の病態研究のみならず、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患でもその関与が示唆されている。筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は上位及び下位運動ニューロンの変性を特徴とする神経変性疾患であり、ALS患者とALSモデルマウスの運動ニューロンにはAGEsの蓄積が報告されている。二つの反応性ジカルボニル化合物である、メチルグリオキサール (MG) と3-デオキシグルコソ (3-DG)はAGEs生成を促進し、また種々の細胞でフリーラジカル産生と関連した毒性を示すことが知られている。一方、グルタチオンは細胞内でフリーラジカルから細胞を防御する最も豊富なチオールであり、特にカタラーゼ活性の低い神経細胞においては最も重要な抗酸化機構とされている。今回我々は、培養脊髄ニューロンにおける、MG、3-DGの神経毒性を確認し、この毒性がグルタチオン増強物質の前投与、アミノグアニジンの同時投与により軽減され、グルタチオン枯渇剤の前投与により増強されることを観察した。脊髄運動ニューロンは、非運動ニューロンに比較しジカルボニル化合物に選択的脆弱性を示し、この脆弱性は非効率的なグルタチオン系のためである可能性が示唆された。

胎生14日Sprague-Dawleyラット胎児の脳皮質及び脊髄より分散培養系を確立した。脳皮質あるいは脊髄より髄膜を剥離し、20分間トリプシン処理後、ピペッティングで分散神経細胞を調整した。脳皮質細胞はEagle's minimal essential medium (MEM)に10%胎児ウシ血清

(FBS)、グルタミン、グルコース添加した培養液に懸濁し、ポリ-L-リジンでコーティングした8穴チェンバースライドにプレーティングした。脊髄培養細胞は同じ培養液中に懸濁し、あらかじめ脳皮質アストログリアの単層をシート状に敷き詰めたの上にプレーティングした。培養は37°C、5% CO₂培養器で維持した。翌日、培養液をB27サプリメント添加 Neurobasal mediumに交換した。脊髄培養細胞は、アストログリアのないチェンバースライド

にもプレーティングし、翌日、グリア調整培養液に交換した。グリア調整培養液は、グリア培養継代後5-8日の培養液を新鮮な培養液に交換し、48時間後に採取した。採取した培養液は遠心後、滅菌フィルターにかけ、等量のB27サプリメント添加Neurobasal mediumと混合した。(50%グリア調整培養液)。実験は7-10日培養後に行った。MGあるいは3-DGを50, 100, 250, 500 μM となるように培養液に添加し、これに上記培養細胞を24時間暴露した。アミノグアニジンと、グルタチオン増強物質 (N-アセチルシステイン (NAC) 10 mM, グルタチオンエチルエステル (GEE) 1 mM, L-2-オキソ-4-チアゾリジン-カルボキシル酸 (LOTC) 10 mM) 及びグルタチオン枯渇剤 (エタクリン酸 (EA) 10 mM, プチオニンスルフォキシミン (BSO) 50 μM) は毒性実験の24時間前に添加した。大脳皮質及び脊髄培養細胞を4%パラホルムアルデヒドで30分固定し、0.2% Triton X-100で5分間処理した。30分間適当なブロッキング溶液で処理後、一次抗体 (抗MAP2抗体及び抗SMI 32抗体それぞれ1:1000希釈) 4°C、オーバーナイトインキュベートした。ビオチン化二次抗体、ABC液、ジアミノベンジジンを染色細胞を可視化するため使用した。細胞内グルタチオンレベルを観察するため、培養脊髄ニューロンを10 μM のモノクロロバイメインで37°C、10分間処理した。洗浄後、氷冷メタノール固定をした。蛍光顕微鏡下で紫外線領域フィルターを用いて観察した。ニューロンの生存率は免疫染色された細胞の数を直接数えた。MAP2陽性細胞では辺縁整の円形もしくは卵円形の胞体と比較的均一な直径で滑らかな外観の神経突起を持つものを生存ニューロンとして数えた。SMI 32陽性細胞は、20 μm 以上の大きな胞体を持ち、著明な樹状突起と単一の長い軸索様突起を有しているものを生存運動ニューロンとして数えた。少なくとも3回の異なる培養での結果を基に比較し、分散分析 (ANOVA) 及びScheff's post-hoc testで統計学的有意差を検討した。

大脳皮質由来の単層アストログリアをシート状に敷き詰めた上に、血清を含むMEM培養液を用いて脊髄ニューロンを培養したところ、SMI 32陽性の大きい運動ニューロンは全体の1-2%を占めていた。培養液がB27サプリメント添加Neurobasal mediumのみでは大きい運動ニューロンは1%以下であった。単層アストログリアシートの代わりにグリア調整培養液を使用すると、よく発達した運動ニューロンが1-2%に認められるようになった。この培養条件ではアストログリアが全体の約10%を占め、比較的ニューロン豊富な培養となっていた。MG及び3-DG24時間暴露は、培養大脳皮質ニューロン、脊髄ニューロンに、用量依存性の神経細胞毒性を示した。脊髄運動ニューロンは大脳皮質ニューロン及び脊髄非運動ニューロンより脆弱であった。

グルタチオンの影響を検討するため、培養脊髄ニューロンにグルタチオン増強物質である、NAC、GEE、LOTCを前処置し、MG、3-DGの毒性を観察した。上記物質24時間前投与によりニューロンの生存率はコントロールに比較して著明に改善した。グルタチオン枯渇剤の上記毒性の影響を検討するため、BSOとEAを用いた。50 μM BSO及び10 μM EAの24時間暴露では、培養脊髄ニューロンに形態的变化を認めなかった。これら物質の24時間前処置はMG、3-DGによる神経毒性を著明に増強した。この際運動ニューロンは非運動ニューロンに比較してより脆弱であった。神経細胞内グルタチオン量を半定量的に調べるため、蛍光指標としてモノクロロバイメインを使用した。グリア-ニューロン混合培養では、背景にグリアが存在しており、グリアのグルタチオン濃度がニューロンに比較して高いため、ニューロン

の細胞内グルタチオンを決定することが困難である。これに対処するためグリア調整培養液での比較的ニューロン豊富な培養系を用いた。結果は予想に反しコントロールでは運動ニューロンと非運動ニューロン間で明らかな差はなかった。NAC処置にて蛍光強度は増加し、BSO処置にて減少した。運動ニューロン、非運動ニューロン間で有意な差を認めなかった。アミノグアニジン1 mM、24時間前投与とコントロール間にMG、3-DGの毒性の変化を認めなかった。同時投与では保護作用を認めた。しかし、運動ニューロンと非運動ニューロン間に有意な差はなかった。

以上、培養脊髄運動ニューロンは反応性ジカルボニル化合物である、MG、3-DGの急性神経毒性に対して選択的脆弱性を示した。この選択性は脊髄運動ニューロンのグルタチオン系の非効率性にあると推察された。今後は、より長期の培養系を用いた、AGEs形成を促す慢性糖化毒性の検討と、細胞種間での酸化的ストレスに対する防御機構の違いを明らかにすることが必要である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 嶋 和 郎

副 査 教 授 吉 岡 充 弘

副 査 教 授 田 代 邦 雄

学 位 論 文 題 名

Selective vulnerability of spinal motor neurons to reactive dicarbonyl compounds, intermediate products of glycation, in vitro: implication of inefficient glutathione system in spinal motor neurons

(糖化反応中間産物である反応性ジカルボニル化合物に対する
脊髄運動ニューロンの選択的脆弱性：脊髄運動ニューロンにおける
非効率的なグルタチオン系の示唆)

胎生14日ラット胎児の脳皮質及び脊髄より分散培養系を確立し、脊髄運動ニューロンと非運動ニューロンを免疫組織学的に同定した。筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の病態への関与が示唆されている後期糖化最終生成物、advanced glycation endproducts (AGEs) 生成を促進する反応性ジカルボニル化合物、メチルグリオキサール (MG) と3-デオキシグルコソン (3-DG) の暴露は、脊髄ニューロンに、用量依存性の神経細胞毒性を示した。脊髄運動ニューロンは非運動ニューロンより脆弱であった。グルタチオン増強物質前投与は、培養脊髄ニューロンのMG、3-DGによる毒性を著明に減少させた。運動ニューロンは非運動ニューロンに比較して保護されていた。グルタチオン枯渇剤の前処置はMG、3-DGによる神経毒性を著明に増強した。運動ニューロンは非運動ニューロンに比較してより脆弱であった。神経細胞内グルタチオン量は、コントロールでは運動ニューロン、非運動ニューロン間で有意な差を認めなかった。AGEs阻害剤のアミノグアニジンも同時投与では保護作用を認めたが、運動ニューロンと非運動ニューロンの間に有意な差はなかった。以上、培養脊髄運動ニューロンは反応性ジカルボニル化合物の神経毒性に対して選択的脆弱性を示した。この選択性はグルタチオン系の非効率性にあると推察された。

公開発表にあたって、副査の吉岡教授から、3-DG、MGによる神経細胞死はアポトーシスによるものか、またそれは、活性酸素を介してのみ作用するのかとの質問があった。それに対して申請者は、培養脳皮質ニューロンを使った我々の先行実験で神経細胞核の断片化を観察し論文発表しており、今回の培養脊髄ニューロンにおける細胞死もアポトーシスによる可能性が類推され、活性酸素発生以外に、蛋白固有機能低下による可能性もあると回答し

た。次に、運動ニューロンと非運動ニューロンにおける差は、グルタチオン量の差によるものではなく、グルタチオン関連の酵素活性などの差にあるとの主張であるが、具体的なデータがあるか質問があった。これに対して、培養系で運動ニューロンと非運動ニューロンを分離して酵素活性を測定することは技術的に困難であるが、ALS運動野でグルタチオンペロキシダーゼの低下が報告されていると回答した。次に、3-DG、MGの代謝につき質問があった。申請者は、3-DGはアルデヒドリダクターゼにより分解され、これはNADPH依存酵素であり、酸化ストレスで不足する可能性があること、酵素自体糖化され活性低下を来すこと、MGはグルタチオン依存性酵素であるグリオキサレースにより不活性化されること、糖化反応はこれら解毒酵素系に影響し悪循環を形成することを説明した。次に、実験に使用されたMG、3-DGの濃度と生体内での濃度の関係が問われた。これに対して、健康成人血清中1 μ M、糖尿病患者血清5 μ M、腎不全を伴う糖尿病患者血清7-8 μ Mであり、実験上、数 μ Mでも毒性が観察されたと回答した。最後に、3-DG、MGとALSとの関連を示すデータはあるかとの質問があった。申請者は、患者髄液中の3-DG、MG測定を現在試みていること、3-DG、MGに特異的に由来するAGEsに対する抗体を入手したので、これら抗体による免疫組織学的研究が進行中であると回答した。次に、主査の長嶋教授より運動ニューロンと非運動ニューロンの分別同定において、そのマーカーの妥当性は細胞の大きさや形態だけでなく運動ニューロン特異的毒性物質での実験で確認されるのではないかと質問があった。申請者は今回の分散培養系では他物質での特異的毒性が確認できなかったと説明した。次に、ALSとグリアの関係につき質問があった。これに対しては、ALS病態における運動ニューロンとグリアの関係は前述したグルタミン酸トランスポーターの実験でも提唱されていると回答した。最後に、ALSでは保たれる脳幹運動ニューロンと脊髄運動ニューロンの違いについて実験で確認可能か質問があった。これに対して、脳幹運動核部分のみ取り出しての培養は困難であり、今後の検討課題としたいと回答した。最後に副査の田代教授から、今後の研究の展望と治療の可能性につき質問があった。これに対し申請者はスライドを用いて説明し、今後長期の培養系を用いたAGEs形成を促す糖化毒性の検討が重要と回答し、糖尿病合併症治療として各種AGE阻害薬が開発中で、これらによる治療可能性もあると回答した。本研究は、脊髄運動ニューロンのジカルボニル化合物に対する脆弱性とグルタチオンの関係を明らかにし、ALS病態との関連を示唆した研究発表であり、審査員一同これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位をうけるのに十分な資格を有するものと判定した。