

平成 10 年度厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）総括研究報告書

神経変性疾患におけるグルタミン酸トランスポーターの
関与機構の解明

主任研究者 田中 光一
東京医科歯科大学難治疾患研究所 分子神経科学 教授

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）

総括研究報告書

神経変性疾患におけるグルタミン酸トランスポーターの関与機構の解明

主任研究者 田中 光一 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子神経科学 教授

研究要旨

虚血・外傷などの急性神経疾患において、グリア型グルタミン酸トランスポーター (GLT1) は大脳において、GLAST は小脳・網膜において、興奮毒性から神経細胞を保護するのに重要な役割を果たしていることが明らかになった。また、シナプス伝達への影響の少ない、新しい神経細胞保護薬のプロトタイプになるグルタミン酸トランスポーター活性増強薬 amino acid alkaloids (ergotamine, bromocriptine, dihydroergotamine)を見つけた。

A. 研究目的

グルタミン酸作動性神経伝達系の異常はパーキンソン病・アルツハイマー病・ALS などの慢性的神経変性疾患の発症機構との関連から注目されている。グルタミン酸トランスポーターは脳内のグルタミン酸濃度調節に主要な役割を果たしている機能分子で、4つのサブタイプ (GLAST, GLT-1, EAAC1, EAAT4) が知られている。ALS・アルツハイマー病の死後脳を用いた研究で、GLT-1 タイプの量的低下が報告されており、神経変性の発生あるいは進行とグルタミン酸トランスポーターが密接に関連していることが示唆されている。本研究では申請者が作成したグルタミン酸トランスポーター欠損マウスを用い、神経変性疾患におけるグルタミン酸トランスポーターの役割を明らかにする。また、グルタミン酸トランスポーター分子の活性を制御する薬物を検索し、新しい作用機作の神経変性疾患治療薬を発見するための基礎研究を行う。

B. 研究方法

F. 急性神経疾患におけるグルタミン酸トランスポーターの役割

外傷のモデルとして cold-injury を用いる。この実験は、液体窒素で冷却した金属棒を大脳・小脳に 15 秒当て、その部位に生じる浮腫性変性領域の大きさを 2 種類のグリア型ノックアウトマウスと野生型マウスで比較する。また、虚血のモデルとして高眼圧負荷による網膜病変の程度を検討した。この実験は、前眼房に刺入した注射針を通し眼圧を 150cmH₂O に 60 分間保ち網膜の血流を遮断し、1 週間後に網膜の厚さを測定し虚血病変の程度を欠損マウスと野生型マウスで比較する。

(2) 慢性的な興奮毒性におけるグルタミン酸トランスポーターの役割

GLAST 欠損マウス、GLT1 欠損マウスともシナプス間隙におけるグルタミン酸の除去能が障害されており、慢性的な興奮毒性の影響を解析するのにいいモデルである。従って、長期生

存した（生後1年）欠損マウスを用いその表現型（運動麻痺・小脳症状など）及び中枢神経系の組織学的解析を行った。

GLT1 欠損マウスは、致死性のでんかん発作で4カ月以内に死亡してしまうので、抗てんかん薬により生後1年まで生存した GLT1 欠損マウスを研究に用いた。

（3）グルタミン酸トランスポーター活性化薬物の検索

すでに作成済みの GLAST を安定に発現している細胞株を用い、グルタミン酸の取り込み活性を増加させる薬物を検索した。グルタミン酸の取り込み活性は、³H ラベルしたグルタミン酸を細胞外液に加え、細胞に15分間取り込ませた後洗浄し、SDS で可溶化し、放射能活性を測定した。グルタミン酸の取り込み活性を増加させる薬物に関しては、容量—作用曲線を作成しその作用機序を解析した。

C. 研究結果

（1）急性神経疾患におけるグルタミン酸トランスポーターの役割

外傷のモデルとして cold injury に関しては、GLAST 欠損マウスでは大脳損傷は変化なかったが、小脳損傷が悪化していた。対照的に、GLT1 欠損マウスでは、小脳損傷は変化なかったが、大脳損傷が悪化していた。虚血のモデルとして高眼圧負荷による網膜病変に関しては、GLAST、GLT1 欠損マウスとも虚血負荷後の網膜の厚さは、野生型に比べ薄くなったが、その程度は GLAST 欠損マウスの方がより大きかった。

（2）慢性的な興奮毒性におけるグルタミン酸トランスポーターの役割

生後1年の GLAST 欠損マウスは、生後4週齢で見られる軽度の協調運動障害（1分間に10

回回転している棒の上にいる時間に差はないが、1分間に20回回転している棒の上にいる時間は、野生型に比べ短い）以外の明らかな小脳症状（失調歩行・企図振顫）は観察されなかった。また、組織学的解析でも小脳に神経変性像は観察されなかった。抗てんかん薬により生後1年まで生存した GLT1 欠損マウスの体重は野生型に比べ小さいが、運動麻痺・筋力低下などの症状は観察されなかった。また、大脳・脊髄において神経細胞変性像は観察されなかった。

（3）グルタミン酸トランスポーター活性化薬物の検索

GLAST のグルタミン酸の取り込み活性を増加させる薬物として、amino acid alkaloids (ergotamine, bromocriptine, dihydroergotamine) を見つけた。薬理的解析から、amino acid alkaloids は、GLAST のグルタミン酸に対する Michaelis constant を減少させることにより、取り込み活性を増強させることがわかった。

D. 考察

外傷・虚血モデルの実験から、GLAST は小脳・網膜において、GLT1 は大脳において、神経細胞を急性の興奮毒性から保護するのに重要な役割を果たしていることが明らかになった。最近、孤発性筋委縮性側索硬化症(ALS)患者の65%にドミナントネガティブ作用をもつ異常 GLT1 転写産物があることが報告され、ALS における運動ニューロンの変性に GLT1 機能低下によるグルタミン酸の興奮毒性が深く関与していることが示唆された。しかし、抗てんかん薬で長期生存した GLT1 欠損マウスは運動麻痺・筋力低下などの症状は示さず、大脳皮質運動野・脊髄の運動ニューロンの変性は観察されなかった。また、長期生存した GLAST 欠損マウ

スにも、明らかな小脳症状（失調歩行・企図振顫）は見られず、組織学的にもプルキンエ細胞の変性像は観察されなかった。これらのことは、グリア型グルタミン酸トランスポーターの機能異常だけでは、様々な慢性神経変性疾患における神経細胞死のメカニズムを説明できないことを示している。しかし、興奮毒性が慢性神経変性疾患における神経細胞死に関与していることを示唆するデータがあり、これら欠損マウスはそれを実験的に検証するよいモデル動物であり、今後の課題である。少なくとも虚血・外傷などの急性神経疾患における細胞死に興奮毒性が関与し、グルタミン酸トランスポーターは興奮毒性から神経細胞を保護するのに重要な役割を果たしている。従って、グルタミン酸トランスポーターの活性を促進させる薬物は急性神経疾患に対する新しい神経細胞保護薬になりえる。いままでの神経細胞保護薬はグルタミン酸受容体の阻害剤を中心に開発されていたが、シナプス伝達への影響による深刻な副作用により、臨床応用に耐えうる新薬はまだ開発されていない。しかし、グルタミン酸トランスポーターの活性を増強する薬物はシナプス伝達に影響を与えず、副作用の少ない新しい神経細胞保護薬としての可能性を秘めている。本研究により見つけたグルタミン酸トランスポーター活性促進薬 amino acid alkaloids (ergotamine, bromocriptine, dihydroergotamine) は新しい神経保護薬開発のプロトタイプになると考えられる。

E. 結論

虚血・外傷などの急性神経疾患において、グリア型グルタミン酸トランスポーターは興奮毒性から神経細胞を保護するのに重要な役割を果たしている。GLAST は小脳・網膜において、

GLT1 は大脳において、重要な役割を果たしている。また、シナプス伝達への影響の少ない、新しい神経細胞保護薬のプロトタイプになるグルタミン酸トランスポーター活性増強薬 amino acid alkaloids (ergotamine, bromocriptine, dihydroergotamine) を見つけた。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) 原著論文

1. Yamada, K., Watanabe, M., Shibata, T., Nagashima, M., Tanaka, K. & Inoue, Y. Glutamate transporter GLT-1 is transiently localized on growing axons of the mouse spinal cord, before establishing astrocytic expression. *J. Neurosci.* 18: 5714-5722 (1998).

2. Harada, T., Ohishi, C., Watanabe, M., Inoue, Y., Sakagawa, T., Nakayama, N., Sasaki, S., Okuyama, S., Watase, K., Wada, K. & Tanaka, K. Functions of the two glutamate transporter GLAST and GLT-1 in the retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 4663-4666 (1998).

3. Watase, K., Hashimoto, K., Kano, M., Yamada, K., Watanabe, M., Inoue, Y., Okuyama, S., Kawashima, N., Hori, S., Takimoto, M., Wada, K. & Tanaka, K. Motor discoordination and increased susceptibility to cerebellar injury in GLAST mutant mice. *Eur. J. Neurosci.* 10: 976-988 (1998).

4. Nonaka, M., Kohmura, E., Yamashita, T., Shimada, S., Tanaka, K., Yoshimine, T., Tohyama, M. & Hayakawa, T. Increased transcription of glutamate-aspartate transporter (GLAST/GluT-1) mRNA following kainic acid-induced limbic seizure. *Mol. Brain Res.* 55: 54-60 (1998).

5. Hirano, T., Morimoto, K., Yamamoto, Y., Sato,

H., Watanabe, T., Sato, K., Sato, S., Yamada, N., Tanaka, K. & Suwaki, H. Time-dependent and regional expression of GABA transporter mRNAs following amygdala-kindled seizures in rats. *Mol. Brain Res.* 54: 49-55 (1998).

6. Yamashita, H., Kawakami, H., Zhang, Y.-X., Tanaka, K. & Nakamura, S. Effects of amino acid ergot alkaloids on glutamate transport via human glutamate transporter hGluT-1. *J. Neurol. Sci.* 155: 31-36 (1998).

(2) 著書・総説

1. 田中光一：神経難病 ALS にはグルタミン酸トランスポーターの異常が関与する *細胞工学* vol.17, No.8 : 1267-1269, 1998.

2. 田中光一：グルタミン酸トランスポーターの機能 *神経研究の進歩* vol.42, No.6 : 896-902, 1998.

2. 学会発表

1. 田中光一：グルタミン酸トランスポーターの機能. 第 33 回脳のシンポジウム, 広島, 1998 年 3 月

2. 田中光一：グルタミン酸トランスポーターの生理学的・病態生理学的役割, 第 2 回神経伝達物質研究会, 東京, 1998 年 8 月

3. 田中光一：グリア型グルタミン酸トランスポーターの病態生理学的役割. 第 21 回神経科学会, 東京, 1998 年 9 月

4. 田中光一：GLT 欠損マウスで起こるてんかん発作について. 第 32 回日本てんかん学会, 横浜, 1998 年 10 月

5. 田中光一：グリア型グルタミン酸トランスポーターの中樞神経系における機能. 第 71 回日本生化学会, 名古屋, 1998 年 10 月

6. 田中光一：グルタミン酸トランスポータ

一の生理学的・病態生理学的役割. 第 3 回「神経科学領域における分子モニタリング」シンポジウム, 名古屋, 1998 年 10 月

7. 田中光一：グルタミン酸トランスポーターの生理学的・病態生理学的役割. 創価大学生命科学研究所, 1998 年 11 月

8. 田中光一：Functions of glial glutamate transporters in the brain. The 3rd Conference on ABC Proteins and Ion Channels - From Gene to Disease -, 京都, 1999 年 3 月

G. 知的所有権の取得状況：なし