

(Fig 5b)。カイニン酸投与 3 日後のマウス脳連続冠状切片を用いて、抗 ssDNA 抗体による免疫染色法と TUNEL 法を比較したところ、TUNEL 法 (右図) で陽性を示した CA3 の細胞がすべて ssDNA 陽性細胞 (左図) であることが確認された。

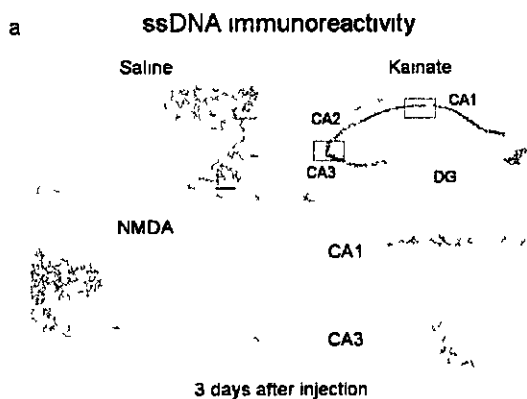


Figure 5 Expression of ssDNA-positive cells in the pyramidal cell layers of the hippocampal subfields. Animals were given saline, NMDA (100 mg/kg, i.p.), or kainate (30 mg/kg, i.p.), and perfused for preparation of coronal sections from paraffin-embedded brains 3 days after administration (a) Sections were subjected to immunohistochemical analysis of ssDNA by light microscopy as described in “Methods” session Typical light micrographs of brain coronal section were obtained 3 days after administration The boxed areas of CA1 and CA3 subfields on sections obtained from animal treated with kainate are shown with higher magnification in the right lower 2 panels Scale bar = 200 μ m Note that ssDNA-positive cells were markedly detected in the CA1 and CA3 pyramidal cell layers, but not in the granular cell layer of the dentate gyrus, of animal injected with kainate (b) Sections were subjected to the immunohistochemical analysis of ssDNA by light microscopy (the left panel) and TUNEL analysis by fluorescence microscopy (the right panel) as described in “Methods” session TUNEL-positive

cells and propidium iodide-stained cells are green and red, respectively Scale bar = 50 μ m These experiments were invariably repeated at least three times with similar results Note that all any ssDNA-positive cells were stained by TUNEL analysis under the same experimental conditions

5 DNA断片化に対するNMDAの効果
 カイニン酸によるDNA断片化に対するNMDA前投与の影響について、抗ssDNA抗体を用いた免疫染色法により解析した (Fig 6)。カイニン酸投与後6時間から3日の間でCA1およびCA3にssDNA陽性細胞が観察されたが、投与7日後ではいずれの領域でも陽性細胞は観察されなかった。このような実験条件下にNMDAを前投与すると、カイニン酸投与後のいずれの時間においても陽性細胞発現が完全に阻止されることか判明した。

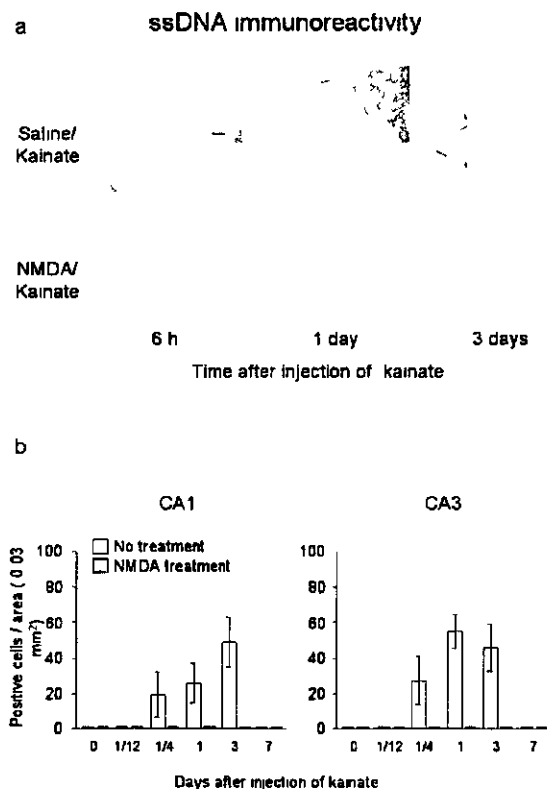


Figure 6 Effect of pretreatment with NMDA on expression of ssDNA-positive

cells induced by kainate in the pyramidal cell layers. Animals were given saline or kainate (30 mg/kg, i.p.) at 1 day after the administration of either saline or NMDA (100 mg/kg, i.p.). Brains were fixed at various times indicated after injection of kainate, followed by preparation of coronal sections from paraffin-embedded brains. Sections were subjected to immunohistochemical analysis of ssDNA by light microscopy as described in "Methods" session. Scale bar = 200 μ m. (a) The upper 2 panels of left and middle lanes show typical light micrographs obtained from different animals when prepared 6 h and 1 day after injection of kainate. Black arrowheads indicate ssDNA-positive cells. Note that kainate-induced expression of ssDNA-positive cells was drastically inhibited by pretreatment with NMDA irrespective of the time after the administration of kainate. (b) Number of ssDNA-positive cells in CA1 and CA3 subfields. Determination of the number of ssDNA-positive cells was performed in coronal sections obtained at various times indicated after the administration of kainate with (the left bars) or without (the right bars) pretreatment with NMDA. ssDNA-positive cells were counted in an area of 0.03 mm² within each subfield. Values are the mean \pm S.E. obtained from 4-6 separate animals. 0 = untreated animals.

カイニン酸による DNA 断片化に対する NMDA 前投与の影響についての TUNEL 法により解析した。対照群 (Saline/Saline) および NMDA 投与群 (NMDA/Saline) においては、いずれの領域でも陰性であったが、カイニン酸投与 3 日後には CA3 に TUNEL 陽性細胞が確認された (Saline/Kainate)。しかしながら、NMDA を前投与した場合に、TUNEL 陽性細胞の発現は観察されなかった (NMDA/Kainate)。

6 GFAP 陽性細胞の発現に対する NMDA の効果

NMDA およびカイニン酸によるアストロサイトの活性化を検討する目的で、NMDA あるいはカイニン酸投与後の GFAP 発現を免疫染色法により解析した。対照群では、血管および脳室の周囲に GFAP 陽性細胞が観察されたが、カイニン酸投与 3 日および 7 日後には分子層および上昇層で多くの GFAP 陽性細胞が観察された。しかしながら、NMDA 単独投与群では対照群と比べて有意な変化はみられなかった。また、NMDA 前投与を行った場合には、カイニン酸投与後のいずれの時間においても GFAP 陽性細胞の発現は観察されなかった。

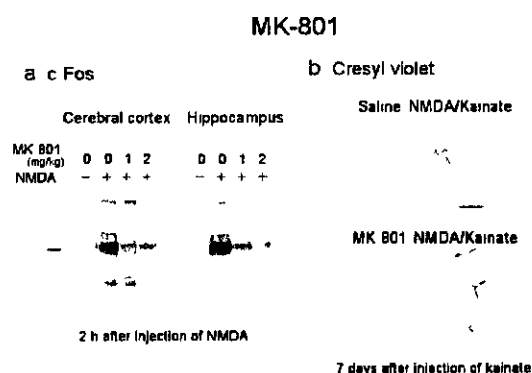


Figure 7 Effect of MK-801 on NMDA-mediated neuroprotection against kainate excitotoxicity in the hippocampus. (a) Immunoblot assay of c-Fos protein in nuclear extracts. Animals were given NMDA (100 mg/kg, i.p.) at 30 min after the administration of MK-801 at 2 different doses indicated and decapitated 2 h after injection of NMDA for preparation of nuclear extracts from the cerebral cortex and hippocampus. Nuclear extracts were subject to immunoblot assay for detection of c-Fos protein as described in "Methods" session. Note that NMDA-induced expression of c-Fos protein was blocked by prior treatment with MK-801 (1 and 2 mg/kg, i.p.) (b) Cresyl violet staining in the CA3

pyramidal cell layer. Animals were given NMDA 30 min after the administration of either saline or MK-801 (1 mg/kg, i.p.), followed by an injection of kainate 1 day afterward. Brains were fixed 7 days after injection of kainate and then coronal sections were prepared from paraffin-embedded brains for cresyl violet staining to determine viable cells in the CA3 neuronal layers. Scale bar = 50 μ m. These experiments were invariably repeated at least four times with similar results. Note that MK-801 prevented NMDA-mediated neuroprotection against kainate excitotoxicity in the CA3 pyramidal neurons.

7 MK-801 前投与の影響

NMDA の神経保護作用が NMDA 受容体を介した反応であるか否かを評価する目的で、NMDA の神経保護作用に対する非競合的 NMDA 受容体拮抗薬 5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine (MK-801) の影響を解析した (Fig 7)。NMDA 受容体の活性化を MK-801 が抑制しているのを確認するために、NMDA による c-Fos 蛋白の発現に対する MK-801 の影響をウエスタンブロット法により解析した (Fig 13a)。NMDA 投与 2 時間後において大脳皮質および海馬の細胞核抽出液中に c-Fos 蛋白の発現が認められた。しかしながら、MK-801 (1 および 2 mg/kg) の前投与は、c-Fos 蛋白の発現をほぼ完全に抑制した。MK-801 (1 mg/kg) を NMDA 投与 30 分前に投与すると、NMDA の神経保護作用は消失して、NMDA の前投与を行った場合でもカイニン酸による神経細胞死が観察された (Fig 13b)。

8 NMDA の神経保護作用メカニズム

カイニン酸シグナルに対する NMDA 前投与の影響を解析する目的で、カイニン酸投与による転写制御因子 AP-1 の発現に対する NMDA 前投与の影響を解析した (Fig

8)。NMDA または生理食塩水投与 1 日後にカイニン酸または生理食塩水を投与、2 時間後に海馬から細胞核抽出液を調製した。カイニン酸投与は AP-1 DNA 結合能を著しく増強したか、この増強は NMDA 前投与でも影響を受けなかった (Fig 8b)。また、カイニン酸による c-Fos 蛋白の発現も NMDA 前投与で影響を受けなかった (Fig 8c)。

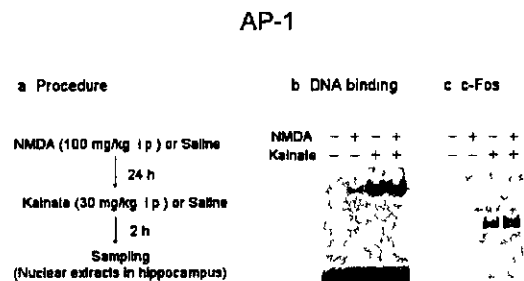


Figure 8 Effect of pretreatment with NMDA on kainate-induced expression of AP-1 in the hippocampus. Animals were given kainate (30 mg/kg, i.p.) 1 day after the administration of NMDA (100 mg/kg, i.p.) and decapitated 6 h later for preparation of nuclear extracts from the hippocampus. Nuclear extracts were subjected to electrophoresis mobility shift assay and immunoblot analysis for detection of AP-1 DNA binding and expression of c-Fos protein, respectively. Note that pretreatment with NMDA did not markedly affect kainate-induced expression of both AP-1 DNA binding and c-Fos protein in the hippocampus. These experiments were invariably repeated at least four times with similar results.

転写制御因子 AP-1 構成蛋白の中で、c-Fos、リン酸化 c-Jun および ATF-2 の NMDA およびカイニン酸による発現を免疫染色法により解析した。対照群および NMDA 投与群では c-Fos およびリン酸化 c-Jun の陽性細胞はほとんど認められなかったか、ATF-2 陽性細胞は海馬神経細胞層

の全域に観察された。カイニン酸投与群では c-Fos およびリン酸化 c-Jun の発現が著明に増加し、海馬全域の神経細胞層中に陽性細胞が観察された。しかしながら、ATF-2 は対象群と比べて著明な変化は認められなかった。このような実験条件下に NMDA を前投与したか、カイニン酸によるこれらの蛋白発現に影響を与えることはなかった。

poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) は DNA 傷害時に誘導され、傷害 DNA を修復することが知られる (Pieper et al, 1999)。NMDA の神経保護作用が PARP の誘導促進による可能性が考えられるので、NMDA の神経保護作用に対する PARP 阻害薬である 3-aminobenzamide (3-AB) の影響を解析した。生理食塩水または NMDA を投与後、生理食塩水またはカイニン酸を投与して 7 日後にニッスル染色を行った。3-AB は NMDA またはカイニン酸投与の 30 分前に投与した。その結果、3-AB はいずれの場合もカイニン酸誘発性神経細胞死および NMDA の神経保護作用に影響を与えないことが明らかとなった。

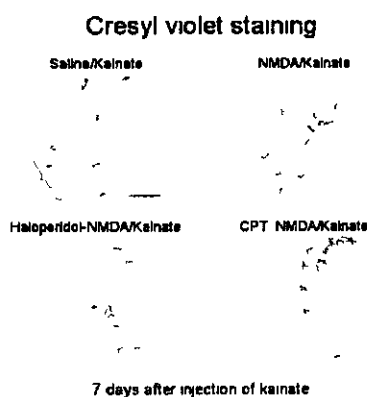


Figure 9 Effects of antagonist for dopamine and adenosine receptors on NMDA-mediated neuroprotection.

Animals were given kainate (30 mg/kg, 1 p) at 1 day after the administration of NMDA (100 mg/kg, 1 p). Either haloperidol (3 mg/kg, s.c., Haloperidol-NMDA/Kainate) or CPT (5 mg/kg, 1 p, CPT-NMDA/Kainate) was injected into animals 30 min before NMDA administration. Brains were fixed 7 days after injection of kainate and then

coronal sections were prepared from paraffin-embedded brains for cresyl violet staining to determine viable cells in the CA3 neuronal layers. Scale bar = 50 μ m. Note that CPT but not haloperidol was effective in preventing NMDA-mediated neuroprotection in the CA3 neuronal layers. These experiments were invariably repeated at least four times with similar results.

NMDA の神経保護作用におけるトパミン D₂ 受容体およびアデノシン A₁ 受容体の関与を評価するために、それぞれの拮抗薬であるハロペリドールおよび 8-cyclopenthylltheophylline (CPT) の影響を解析した (Fig 9)。ハロペリドール (3 mg/kg, s.c.) および CPT (5 mg/kg, 1 p) は NMDA 投与の 30 分前に投与した。CPT 処理は、NMDA の神経保護作用を消失させ、NMDA の前投与を行った場合でもカイニン酸による神経細胞死を誘発した (CPT-NMDA/Kainate)。一方、ハロペリドールは NMDA の神経保護作用に影響を与えなかった (Haloperidol-NMDA/Kainate)。

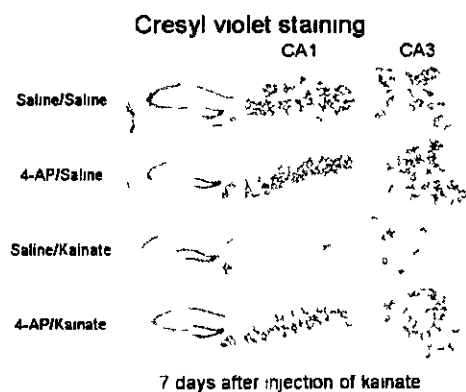


Figure 10 Effect of pretreatment with 4-AP on kainate-induced neuronal losses in the pyramidal cell layers of the hippocampal subfields. Animals were given saline or kainate (30 mg/kg, 1 p) at 1 day after the administration of either saline or 4-AP (5 mg/kg, 1 p). Brains were fixed 7 days after injection of kainate, followed by preparation of

coronal sections from paraffin-embedded brains and subsequent staining with cresyl violet to determine surviving cells in neuronal layers of the hippocampus. Typical light micrographs of the sections stained with cresyl violet. The areas of CA1 and CA3 subfields are shown with higher magnification in the middle and right panels, respectively. Scale bar = 200 μ m. Note that kainate-induced neuronal losses in those subfields were markedly blocked by pretreatment with 4-AP. These experiments were invariably repeated at least four times with similar results.

9 神経細胞死に対する 4-AP の効果

カイニン酸誘発性神経細胞死に対する 4-AP 前投与の影響を検討する目的で、海馬冠状切片のニッスル染色を行った (Fig 10)。生理食塩水または 4-AP の投与 1 日後に生理食塩水またはカイニン酸を投与した。ニッスル染色はカイニン酸投与後 7 日目に行った。4-AP 投与群では wet-dog shakes 様の痙れんが観察されたか、少なくとも 7 日後までは海馬のいずれの部位においても著明な変化は観察されなかった (4-AP/Saline)。カイニン酸投与群では、CA1 および CA3 に神経細胞死が観察されたか、歯状回顆粒細胞層には神経細胞死は観察されなかった (Saline/Kainate)。しかしながら、4-AP をカイニン酸投与 1 日前に前投与すると、カイニン酸による神経細胞死は完全に阻止された (NMDA/Kainate)。

4-AP の神経保護効果の経時変化を検討する目的で、4-AP の前処置時間を変化させてカイニン酸誘発性神経細胞死に対する効果を解析した。カイニン酸投与前 1 時間、2 時間、5 時間、1 日、2 日および 4 日の時点で 4-AP を投与した。カイニン酸投与後 7 日目にニッスル染色を行い、CA1 および CA3 におけるそれぞれの一定範囲内 (0.03 mm²) の染色細胞数を計測した。4-AP をカイニン酸投与 1 時間前に投与すると、カイニン酸による海馬内神経細胞死は著明に抑

制されることが明らかとなった。その保護効果は 1 日前投与まで持続したか、2 日前の投与では有意な保護効果は認められなかった。

10 ssDNA 断片化に対する 4-AP の効果

カイニン酸による DNA 断片化に対する 4-AP 前投与の影響について、抗 ssDNA 抗体を用いた免疫染色法により解析した。Figure 20 は、典型的な例を示したものである。カイニン酸投与 3 日後では、CA1 および CA3 に多数の ssDNA 陽性細胞が観察された。しかしながら、4-AP をカイニン酸投与 1 日前に処理すると陽性細胞の発現は観察されなかった。一方、7 日前の 4-AP 処理ではカイニン酸投与群と同様に陽性細胞の発現が観察された。カイニン酸単独投与では 10 例中 6 例 (60%) に ssDNA 陽性細胞が観察された。4-AP を 1 時間前および 1 日前に投与すると、カイニン酸による ssDNA 陽性細胞発現動物がそれぞれ 36% および 25% に減少した。しかしながら、2 日から 7 日の前処理では、カイニン酸単独投与の場合と著しい変化は認められなかった。

11 8-OHdG 陽性細胞発現に対する 4-AP の効果

ラットにおいて、カイニン酸処理は細胞核内 DNA を酸化して DNA 断片化を起こす可能性が示されている (Lan et al, 2000)。本研究では、DNA 酸化の指標として 8-OHdG の出現を抗 8-OHdG 抗体を用いた免疫染色法により解析した。対照群 (Saline) では 8-OHdG 陽性細胞および ssDNA 陽性細胞はともに検出されなかった。カイニン酸投与 1 日後では、CA1 および CA3 の神経細胞の細胞核内において 8-OHdG 陽性反応が認められたか、ssDNA 陽性細胞はきわめて少なかった。カイニン酸投与 3 日後では、CA1 と CA3 の神経細胞の多くが ssDNA 陽性を示し、8-OHdG 陽性は著しく減少していた。このように、8-OHdG 陽性細胞は ssDNA 陽性細胞に先立って出現することが明らかとなった。カ

イニン酸単独投与による 8-OHdG 陽性細胞の発現は、16 例中 9 例 (56%) 認められたが、4-AP をカイニン酸投与の 1 日前に処理すると、カイニン酸による 8-OHdG の発現例が 12% に減少した。

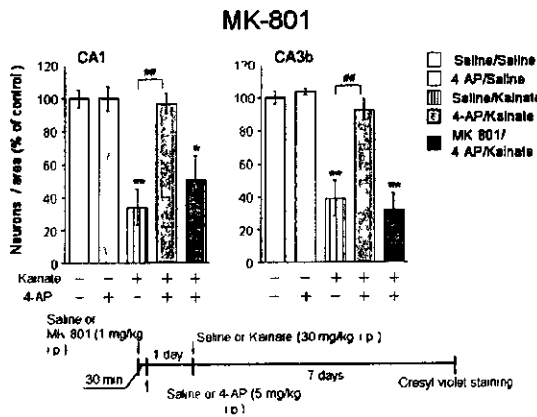


Figure 11 Effect of MK-801 on 4-AP-mediated neuroprotection against kainate excitotoxicity in the hippocampus Animals were given saline or 4-AP (5 mg/kg, 1 p) 30 min after the administration of either saline or MK-801 (1 mg/kg, 1 p), followed by an injection of saline or kainate (30 mg/kg, 1 p) 1 day afterward Brains were fixed 7 days after injection of kainate, followed by preparation of coronal sections from paraffin-embedded brains and subsequent staining with cresyl violet to determine surviving cells in neuronal layers of the hippocampus Surviving cells were counted in an area of 0.03 mm² within CA1 and CA3 subfields Values are the mean \pm S.E. from 4-6 separate animals *P<0.05, **P<0.01, significantly different from each control value obtained in animals injected with saline alone (the first left open column) #P<0.05, ##P<0.01, significantly different from the value obtained in each subfield of animals injected with kainate alone (the third left hatched column) Note that MK-801 prevented 4-AP-mediated neuroprotection against kainate excitotoxicity in the CA1 and CA3 subfields

1.2 MK-801 前投与の影響

4-AP の神経保護作用が NMDA 受容体を介した反応であるか否かを評価する目的で、NMDA の神経保護作用に対する MK-801 の影響を解析した (Fig 11)。生理食塩水または 4-AP の投与 1 日後に、生理食塩水またはカイニン酸を投与し、7 日後にニッスル染色を行った。4-AP 投与群 (4-AP/Saline) では対照群 (Saline/Saline) と有意な変化は認められなかった。カイニン酸単独投与群では、CA1 および CA3 において約 70% の神経細胞死が観察されたが、4-AP をカイニン酸投与 1 日前に処理することにより、神経細胞死が完全に阻止された (4-AP/Kainate)。4-AP 投与 30 分前に MK-801 (1 mg/kg, 1 p) を投与すると、4-AP の神経保護作用は消失して、カイニン酸投与群と同程度の神経細胞死が観察された (MK-801/4-AP/Kainate)。

1.3 CPT 前投与の影響

4-AP の神経保護作用におけるアデノシン A₁ 受容体の関与を評価するため、CPT の影響を解析した。CPT (5 mg/kg, 1 p) を 4-AP および NMDA 投与の 30 分前に投与した場合、カイニン酸による神経細胞死が観察された (CPT-4-AP/Kainate, CPT-NMDA/Kainate)。

1.4 c-Fos の発現

4-AP 投与により興奮した神経細胞を検出する目的で c-Fos 蛋白の発現を免疫染色法により解析した。対象群では、歯状回顆粒細胞層および視床室傍核に少数の陽性細胞が観察された。4-AP 投与 2 時間後では、両部位においても陽性細胞数の増加が認められた。その他の部位において、陽性細胞の発現は認められなかった。

1.5 トリメチルスス (TMT) 誘発性神経細胞死

TMT 神経毒性の部位特異性を解析した。ヘマトキシリン-エオシン染色は、TMT 投与 2 日後に行われた。明確な神経細胞死は海馬歯状回顆粒細胞にのみ観察されたが、

大脳新皮質浅層にも細胞核の萎縮が観察された。嗅球、小脳およびその他の部位には TMT 投与による著変は認められなかった。また、細胞死はネクロシスの特徴である核濃縮、細胞質の暗調、酸性化および空胞化が観察され、アポトーシス特異的であるアポトーシス小体は認められなかった。Figure 12 は、カイニン酸と TMT による神経障害の比較を示した結果である。カイニン酸 (30 mg/kg, 1p) あるいは TMT (3 mg/kg, 1p) を投与して、それぞれ 7 日後あるいは 2 日後にニッスル染色を行った。カイニン酸投与群では CA1 および CA3 に顕著な神経障害が観察されたが、歯状回顆粒細胞層には著明な変化は認められなかった。一方、TMT 投与群では、CA1 および CA3 に障害は見られず、歯状回顆粒細胞に選択的な神経細胞死が観察された。

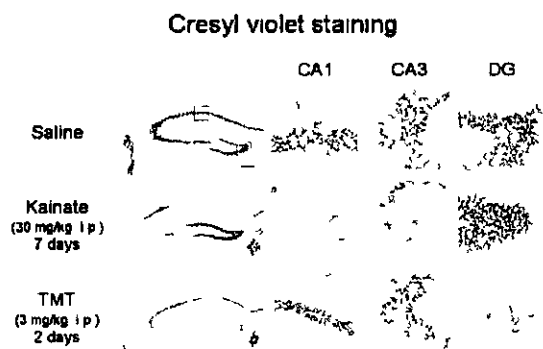


Figure 12 Neuronal damages induced by kainate and TMT in the hippocampus. Brains were fixed 2 and 7 days after an injection of TMT (3 mg/kg, 1p) and kainate (30 mg/kg, 1p), respectively, followed by preparation of coronal sections from paraffin-embedded brains and subsequent staining with cresyl violet to determine surviving cells in neuronal layers of the hippocampus. The areas of CA1 and CA3 subfields are shown with higher magnification in the middle and right panels. Scale bar = 200 μ m. Note that while kainate induced severe damage in pyramidal cells of the hippocampal CA1 and CA3 subfields (Kainate), TMT induced neuronal losses

in the dentate granular cell layer (TMT)

種々の濃度の TMT を投与して 3 日後にニッスル染色を行った。1 および 2 mg/kg の用量では、対照群と比べて著変は見られなかったが、3 mg/kg の用量では歯状回顆粒細胞層に約 60% の細胞数の減少が観察された。次に TMT による DNA 断片化を ssDNA の免疫染色法により解析したところ、対照群、1 および 2 mg/kg の用量では ssDNA 陽性細胞は観察されなかったが、3 mg/kg の用量では歯状回顆粒細胞層に選択的な ssDNA 陽性細胞の発現が観察された。また、CA1 および CA3 の神経細胞死および ssDNA 陽性細胞はいずれの用量でも観察されなかった (Fig 13)。

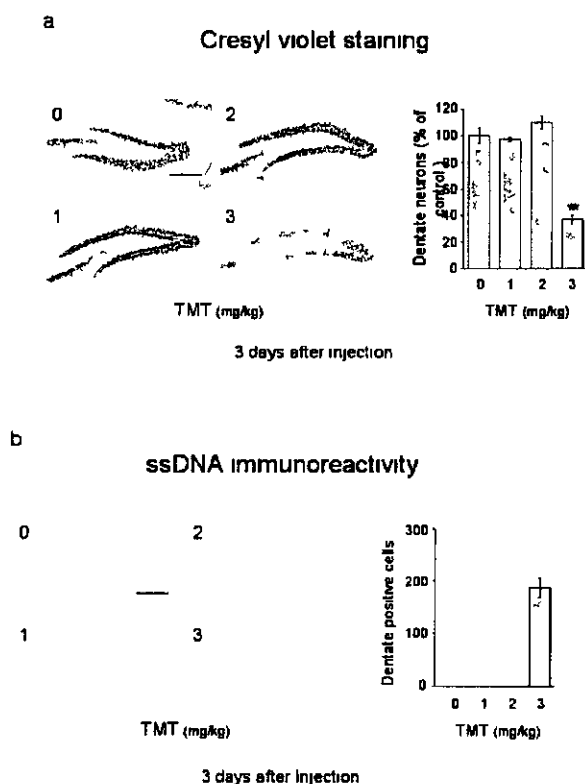


Figure 13 Neuronal damages induced by TMT at different doses in the dentate gyrus. Animals were intraperitoneally given saline or TMT at doses of 0, 1, 2, or 3 mg/kg, followed by fixation for preparation of coronal sections from paraffin-embedded brains 3 days after the administration (a) To determine neuronal losses in the hippocampus,

sections were stained with cresyl violet. The left panels show typical light micrographs of the dentate gyrus in coronal sections stained with cresyl violet. Scale bar = 200 μ m. Quantitative data for dentate cells stained represents in the right graph. Values are the mean \pm SE from 4-6 separate animals. ** $P < 0.01$, different from the control value obtained in untreated animals (dose = 0). Note that TMT at dose of 3 mg/kg induced the decrease of about 60% in dentate neurons. (b) TMT-induced DNA fragmentation was identified by the immunohistochemical analysis using an anti-ssDNA antibody as described in "Methods" session. The left panels show typical light micrographs of the dentate gyrus in coronal section stained by the anti-ssDNA antibody. While cells counterstained with methylgreen were shown as gray color, ssDNA-positive cells were indicated as black color. Scale bar = 200 μ m. Quantitative data for dentate ssDNA-positive cells represents in the right graph. Values are the mean \pm SE from 4-6 separate animals. Note that marked expression of ssDNA-positive cells were observed in the dentate gyrus of animals treated with TMT at the dose of 3 mg/kg.

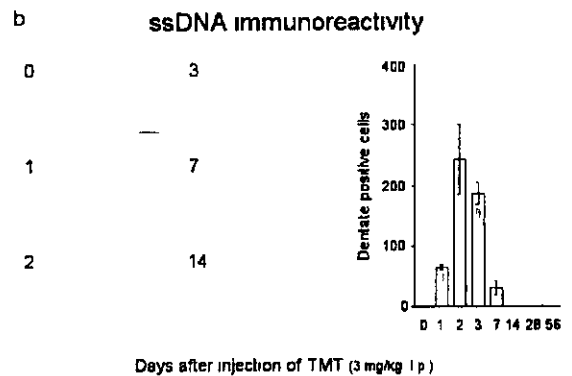
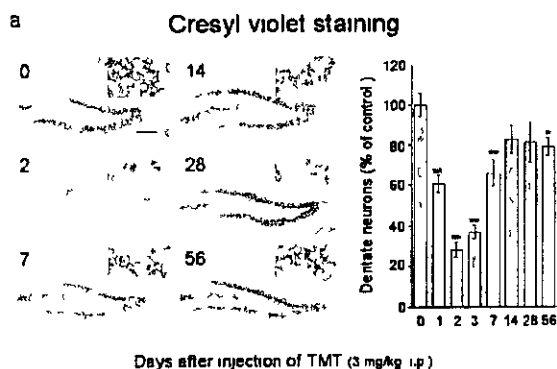


Figure 14 Time course of the neuronal damage induced by TMT in the dentate gyrus. Animals were given saline or TMT (3 mg/kg, i.p.), followed by fixation for preparation of coronal sections from paraffin-embedded brains at various times after the administration. (a) To determine neuronal losses in the hippocampus, sections were stained with cresyl violet. The left panels show typical light micrographs of the dentate gyrus in coronal sections stained with cresyl violet. Scale bar = 200 μ m. Quantitative data for dentate cells stained represents in the right graph. Values are the mean \pm SE from 4-6 separate animals. Note that TMT induced marked neuronal loss in the dentate gyrus 1 to 3 days later, with subsequent recovery of the neuronal loss 7 days afterward. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, different from the control value obtained in untreated animals (day = 0). (b) To determine TMT-induced DNA fragmentation, immunohistochemical analysis using an anti-ssDNA antibody was carried out as described in "Methods" session. The left panels show typical light micrographs of the dentate gyrus in coronal section stained for ssDNA immunohistochemistry. Scale bar = 200 μ m. Quantitative data for dentate ssDNA-positive cells represents in the right graph. Values are the mean \pm SE from 4-6 separate animals. Note that ssDNA-positive cells were markedly expressed in the dentate gyrus 2 days to 3 days after the administration of TMT.

TMT 投与後の各時間にニッスル染色を行った(Fig 14)。TMT 投与 2 日後では、顆粒細胞数が対照群 (*first left column*) の約 30%に減少した。しかしながら、投与 7 日後以後では見かけ上ほぼ対照群レベルまで回復した。TMT 投与後の ssDNA 陽性細胞を解析したところ、ssDNA 陽性細胞は TMT 投与 1 日後より観察され、投与 2 日後で最大となった。その後、陽性細胞数は減少して、投与 14 日後以降では全く観察されなかった。また、CA1 および CA3 の神経細胞死および ssDNA 陽性細胞はいずれの時間においても観察されなかった。

1 6 GFAP の発現

TMT 投与後のアストロサイト活性化の経時的変化を GFAP 免疫染色法により解析した。対照群では、血管および脳室周囲に GFAP 陽性細胞が観察されたが、TMT 投与後 3 日では歯状回周辺に多数の陽性細胞の発現が観察された。また、TMT 投与 7 日後より hilus、CA3b および CA3c の苔状線維周囲に陽性細胞の発現が見られ、少なくとも投与 28 日後まで陽性細胞は観察された。

1 7 神経障害後の神経再生の可能性

TMT 投与 3 日以降に歯状回顆粒細胞の増加が観察された。この事実は TMT 障害後に顆粒細胞の増殖が促進されている可能性を示唆するものである。したがって、TMT 投与後の神経細胞回復過程における新規 DNA 合成の経時的変化を抗 BrdU 抗体を用いた免疫染色法により解析した(Fig 15)。対照群では、歯状回顆粒細胞下層に少数の BrdU 陽性細胞が観察されたが、TMT 投与 4 日後に BrdU 陽性細胞が著しく増加した。TMT 投与後の各時間における歯状回の BrdU 陽性細胞数を測定したところ、TMT 投与 2 日後より陽性細胞数は有意に増加したが、その増加は投与 5 日後まで持続した。しかしながら、投与 7 日後には対照群レベルにまで減少した。

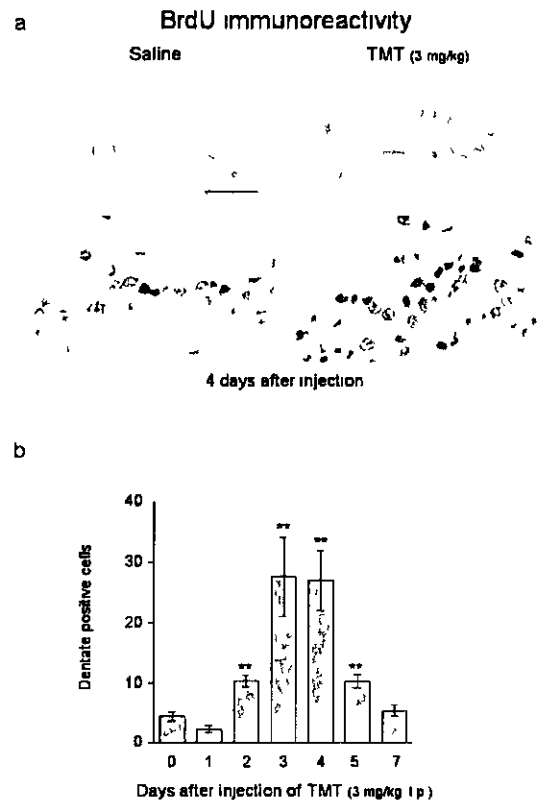


Figure 15 Increase of BrdU immunoreactivity in the dentate gyrus after TMT treatment Animals were given saline or TMT (3 mg/kg, 1 p), followed by fixation for preparation of coronal sections from paraffin-embedded brains at various times indicated after the administration. To label S-phase cells at multiple time points after TMT treatment, BrdU (50 mg/kg, 1 p) was given as two pulses, 12 and 24 h before fixation at each time indicated. Sections were subjected to immunohistochemical analysis of BrdU by light microscopy as described in "Methods" session. (a) Immunohistochemical analysis using an anti-BrdU antibody was carried out 4 days after an injection of saline and TMT. The upper 2 panels show typical light micrographs of the dentate gyrus in sections stained for BrdU immunohistochemistry. While cells counterstained with hematoxylin were shown as blue color, BrdU-positive cells were indicated as brown color. The boxed area of dentate gyrus on the section

obtained from each animal is shown with a higher magnification in the lower 2 panels Scale bar = 200 μ m Black arrowheads indicate BrdU-positive cells Note that TMT treatment led to marked increase of BrdU-positive cells in the subgranular zone of dentate gyrus 4 days later (b) Time course of expression of BrdU-positive cells in the dentate gyrus Values are the mean \pm S E from 5 separate animals **P<0.01, different from the control value obtained in untreated animals (day = 0) Note that TMT was effective in increasing BrdU-positive cells in dentate gyrus 2 to 5 days later

新規 DNA 合成細胞かアストロサイトである可能性もあるので、抗 BrdU 抗体および抗 GFAP 抗体を用いた二重免疫染色を行った。BrdU は DAB で茶色に、GFAP はニューフクシンで赤色に染色されている。TMT 投与 3 日後では歯状回に BrdU および GFAP 陽性を示す細胞数の増加が観察されたか、顆粒細胞下層では BrdU 陽性を示す細胞のほとんどが GFAP 陰性細胞であった。

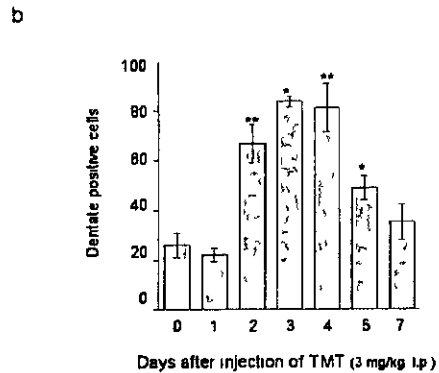
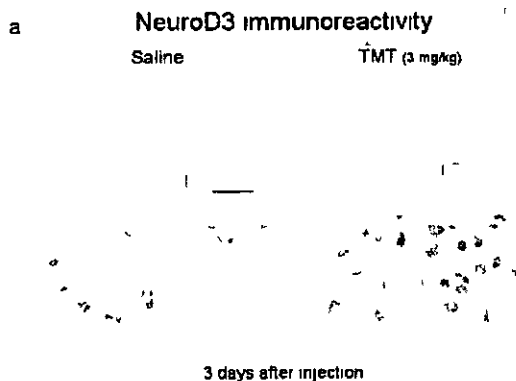


Figure 16 Expression of NeuroD3-positive cells in the dentate gyrus after TMT treatment. Animals were given saline or TMT (3 mg/kg, i.p.), followed by fixation for preparation of coronal sections from paraffin-embedded brains at various times indicated after the administration. Sections were subjected to immunohistochemical analysis of NeuroD3 by light microscopy as described in "Methods" session (a) To detect neuronal precursor cells in the dentate gyrus, immunohistochemical analysis using an anti-NeuroD3 antibody was carried out 3 days after injection of saline and TMT. The upper 2 panels show typical light micrographs of the dentate gyrus in sections stained by NeuroD3 immunohistochemistry. Scale bar = 200 μ m. The boxed area of dentate gyrus on sections obtained from each animal is shown with a higher magnification in the lower 2 panels. Black arrowheads indicate NeuroD3-positive cells. Note that TMT induced expression of NeuroD3-positive cells in the subgranular zone of the dentate gyrus 3 days later. (b) Time course of expression of NeuroD3-positive cells in the dentate gyrus. Values are the mean \pm S E from 5 separate animals. **P<0.01, different from the control value obtained in untreated animals (day = 0). Note that expression of NeuroD3-positive cells was significantly enhanced in the dentate gyrus 2 to 5 days after TMT treatment.

神経発生では神経幹細胞の増殖に次いで、神経幹細胞から神経前駆細胞あるいはクリア前駆細胞への分化過程がみられる。これらの過程はいずれも basic region-helix-loop-helix (bHLH) 構造をもつ種々の転写因子によって制御されている(影山, 2002)。この bHLH 因子のうち、神経前駆細胞に特異的な因子として NeuroD3/neurogenin1 が知られている(Ma et al, 1998)。したがって、TMT 投与後の神経細胞回復過程における NeuroD3 発現を免疫染色法により解析した(Fig 16)。対照群では、歯状回顆粒細胞下層に少数の NeuroD3 陽性細胞が観察された。TMT 投与 3 日後には、歯状回顆粒細胞下層に本陽性細胞数の有意な増加がみられた。Figure 33b は、TMT 投与後の各時間における歯状回の NeuroD3 陽性細胞数を示している。TMT 投与 2 日後より本陽性細胞数は有意に増加し、その増加が少なくとも投与 5 日後まで持続した。しかしながら、投与 7 日後では対照群レベル (*first left column*) にまで減少した。Figure 34 は、BrdU および NeuroD3 陽性細胞の TMT 投与後の変化を比較した結果である。両陽性細胞の発現時間は高い相同性が見られた。

1.8 NMDA 前投与の影響

NMDA の神経保護作用の選択性を検討する目的で、TMT 神経細胞死に対する NMDA 前投与の影響を解析した(Fig 17)。生理食塩水または NMDA (100 mg/kg, 1 p) を投与 1 日後に生理食塩水または TMT を投与した。TMT 投与 2 日後にニッスル染色を行った。NMDA の前投与は、TMT 神経毒性に対して有意な保護効果を示さなかった。

1.9 副腎に対する TMT の毒性

TMT はクルコルチコイトの分泌を促進することが知られる (Imai et al, 2001) ので、TMT 投与後の副腎の形態変化をヘマトキシリン-エオシン染色により観察した。TMT 投与 2 日後では、副腎皮質束状帯にお

いて細胞質の縮小がみられたが、副腎髄質には著変は認められなかった。また、副腎摘出 3 日後では歯状回顆粒細胞においてわずかに神経細胞の萎縮が観察された。

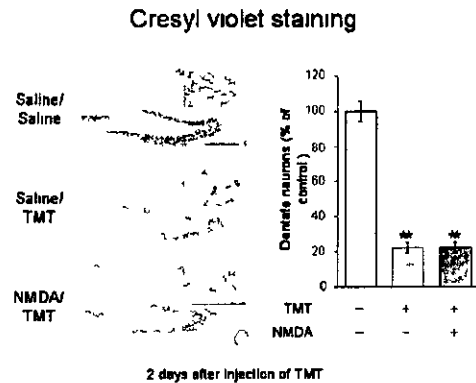


Figure 17 Effect of pretreatment with NMDA on TMT-induced neuronal losses in the dentate granule cells Animals were given saline (*Saline/Saline*) or TMT (3 mg/kg, 1 p) As needed, NMDA was injected to animals 1 day before the administration of TMT (*NMDA/TMT*) Brains were fixed 2 days after an injection of TMT and then coronal sections were prepared from paraffin-embedded brains for cresyl violet staining to determine the number of vital cells in the dentate granular neuronal layers of the hippocampus The boxed areas of the dentate gyrus are shown with higher magnification in *insets* ** $P < 0.01$, significantly different from each control value obtained in animals injected with saline Note that pretreatment with NMDA did not affect TMT-induced neuronal losses in the granule cells of the dentate gyrus

D 考察

本研究において、NMDA かカイニン酸による海馬の神経細胞死を完全に阻止することをインヒボ実験により明らかとした。非競合的 NMDA 受容体拮抗薬 MK-801 を用いた実験により、NMDA の神経保護作用か NMDA 受容体の活性化によるものであることは明らかである。また、NMDA の神経保護作用かカイニン酸投与後の処理では認

められない事実は、前処理か NMDA の神経保護効果に重要であると思われる。本研究は、海馬におけるカイニン酸誘発性興奮毒性に対する NMDA 受容体の神経保護効果を示した初めてのインビボ実験であり、生体内におけるグルタミン酸作動性神経の重要な新規生理的役割を提示するものである。

NMDA の神経保護作用は、ラット小脳顆粒細胞の初代培養系を用いて解析されてきた (Marini and Paul, 1992, Damschroder - Williams et al, 1995)。培養細胞における NMDA の保護効果のメカニズムに関しては、次のようなメカニズムが提唱されている。すなわち、NMDA 受容体の活性化は NF κ B を活性化して BDNF の発現を促進する。その BDNF が細胞外に分泌され、細胞膜上の TrkB 受容体を活性化して細胞の生存メカニズムが活性化することになる (Marini et al, 1998, Lipsky et al, 2001, 奥田・荻田, 2002)。しかしながら、本研究でのインビボ実験系と培養細胞実験系を比較してみると、NMDA の神経保護作用に次のような相違がみられる。インビボ実験では、NMDA がカイニン酸誘発性神経細胞死に対して神経保護効果をもつものに対して、培養細胞実験系ではカイニン酸による細胞死に対して NMDA は神経保護効果を示さない (Damschroder-Williams et al, 1995)。また、インビボ実験では NMDA 投与による NF κ B 活性化は観察されないことが確認されている。これらの相違は、両実験系における NMDA の作用メカニズムが異なることを示唆するものである。それらのメカニズムの相違は、障害を受ける細胞の相違に起因するかもしれない。事実、カイニン酸のマウスへの末梢投与は海馬の錐体細胞に障害をおこすものに対して、培養実験系では小脳顆粒細胞を用いており、障害を受ける細胞が両実験系間で異なっている。

アポトーシスは、細胞の形態学的変化と生化学的変化によって定義されている。形態学的変化としては、(1) 細胞表面の微絨毛の消失および平滑化、(2) 細胞の縮小、

(3) 細胞核内クロマチンの凝縮と断片化、(4) 細胞自体の断片化、(5) apoptosis body の形成、などが起こり、最後に食細胞などにより貪食除去される。一方、生化学的な特徴としては、(1) 細胞内 Ca²⁺の上昇、(2) 特定蛋白質のリン酸化、(3) caspase ファミリーの活性化と特定蛋白質の限定分解、(4) クロマチン DNA のヌクレオソーム単位での断片化と続く。この断片化はまず 50 - 200 kbp に断片化されたのち、endonuclease によりヌクレオソーム (約 180kbp) 単位の断片化へと進行する。カイニン酸による神経細胞障害は、アポトーシスおよび壊死によるものと理解されている (Pollard et al, 1994, Fujikawa et al, 2000)。したがって、本研究ではこれらの両者を検出する必要がある。本研究では、その方法として ssDNA の免疫染色法および TUNEL 法の両者を用いたところ、同様な結果を得ることができた。TUNEL 法は、壊死に陥った細胞や細胞内小器官にほとんど変化がみられない前アポトーシス細胞にも鋭敏に反応することから、TUNEL 陽性細胞はアポトーシス細胞だけでなく、壊死細胞や前アポトーシス細胞も含まれる可能性が示唆されている (安田 他, 1996, Yasuda et al, 2000)。したがって、本研究において主に用いた ssDNA 免疫染色法もアポトーシスと壊死の両者を標識するのに有用であると思われる。さらに、ssDNA 免疫染色か TUNEL 法よりもはるかに経済的であることも大きな有用性の一つである。

本研究では、カイニン酸投与により誘導される CA1/CA3 の DNA 断片化は NMDA の前投与により完全に阻止された。NMDA による DNA 断片化の阻止作用には以下のようなメカニズムが考えられるであろう。

(1) NMDA がカイニン酸による細胞内シグナルの活性化を抑制して DNA の断片化を阻止している。(2) NMDA が DNA 修復酵素である PRAP を活性化し、カイニン酸による DNA 障害の修復機能を増強する。事実、DNA 修復酵素である PRAP は nitric oxide により活性化されること知られて

いおり (Zhang et al, 1994)、NMDA 受容体の活性化による nitric oxide の産生が PRAP 発現を促進することも考えられる (Pieper et al, 1999)。しかしながら、PRAP 阻害薬の 3-AB が海馬におけるカイニン酸誘発性神経細胞死に対する NMDA の神経保護作用に影響を与えなかった。したがって、NMDA の神経保護作用には、PRAP 活性化が関与する可能性は少ないと考えられる。その他の可能性として、次のようなものが考えられる。(1) NMDA によるグリア細胞の活性化、(2) NMDA によるカイニン酸受容体抑制、(3) 他の受容体 (D₂受容体や A₁受容体など) の活性化、などである。以下、それらの可能性について考察する。

アストロサイトは、脳実質損傷時に活性化アストロサイトへの細胞形質の転換を起こすことが知られる。活性化したアストロサイトは細胞体の肥大、特異的遺伝子群の発現および増殖性を獲得して障害された神経系の再生過程に重要な作用を持つことが知られる (小山, 2002)。これらの事実は、NMDA 受容体の活性化がアストロサイト活性化を誘発し、カイニン酸誘発性神経細胞死に対する神経保護作用を示すという仮説を提唱させる。しかしながら、NMDA 投与によるアストロサイトの活性化が認められなかった事実は、NMDA 前投与による神経保護効果はアストロサイトの活性化によるものではないことを示唆するものである。

ラット海馬神経細胞の培養系において、カイニン酸受容体の発現は NMDA 受容体の活性化による細胞内 Ca²⁺濃度の増加による calcineurin の活性化により抑制されている (Ghetti and Heinemann, 2000)。これらの事実は、NMDA 受容体の活性化がカイニン酸受容体を直接的に抑制する可能性を示すものである。この可能性を解析する目的で、カイニン酸による細胞内シグナル変化に対する NMDA の影響を検討した。本研究ではカイニン酸投与による細胞核内転写因子 AP-1 および構成蛋白発現に対する効果を解析した。しかしながら、NMDA

の前投与はカイニン酸による AP-1/DNA 結合能および構成蛋白質 (c-Fos および ATF-2) の発現に影響を与えなかった。これらの事実は、NMDA の前投与がカイニン酸受容体の活性化を抑制するという仮説を否定するものである。

カイニン酸は、c-Jun N-terminal kinase の活性化により c-Jun をリン酸化して興奮毒性障害後の神経細胞死シグナルを活性化すると考えられる (Ferrer et al, 2002)。本研究では、カイニン酸投与による海馬神経細胞でのリン酸化 c-Jun 蛋白の発現が再確認された。NMDA 前投与が、カイニン酸によるリン酸化 c-Jun 蛋白の発現に影響を与えなかった事実から、NMDA の神経保護効果は Jun/Fos シグナル変化に起因するものではないと考えられる。

カイニン酸により神経細胞死を起こさないマウスにおいて、トパミン D₂受容体をノックアウトすると、その抵抗性が失われることが知られている (Bozzi et al, 2000)。このことは、トパミン D₂受容体の活性化がカイニン酸誘発性神経細胞死を抑制することを示唆するものである。したがって、NMDA がトパミン D₂受容体を活性化させることにより神経保護作用を示している可能性が考えられる。しかしながら、トパミン D₂受容体拮抗薬ハロペリドールは NMDA の神経保護作用に対して影響を与えなかったため、NMDA の神経保護作用はトパミン受容体の活性化とは関与しないと考えられる。一方、アデノシン A₁受容体拮抗薬 CPT が NMDA の神経保護作用を消失させたことから、アデノシン A₁受容体が NMDA の神経保護作用に関与する可能性が考えられる。事実、NMDA 受容体の活性化は内在性アデノシンの放出を促進する

(Hoehn and White, 1990, Chen et al, 1992, Pazzagli et al, 1994)。また、海馬におけるカイニン酸誘発性神経細胞死は、アデノシン A₁受容体の活性化により抑制されることも知られている (Matsuoka et al, 1999, Von Lubitz et al, 1999)。したがって、NMDA 前投与はアデノシン A₁受容体

の活性化を引き起こし、カイニン酸誘発性神経細胞死に対して保護効果を示す可能性が考えられるであろう。アデノシン A₁ 受容体を含めた NMDA の神経保護作用の機能的役割および詳細なメカニズム解明には、今後のさらなる解析が必要であろう。

4-AP 前投与は、カイニン酸誘発性神経細胞死に対して著明な神経細胞保護効果を示した。Fragoso-Veloz (1992) らは 4-AP の投与が神経終末よりグルタミン酸の放出を誘発し、放出された過剰のグルタミン酸が NMDA 受容体を活性化していることを示唆している。本研究において、4-AP の神経保護作用が NMDA 受容体非競合的拮抗薬 MK-801 により完全に消失した事実は、4-AP により放出された内在性グルタミン酸が NMDA 受容体の活性化を介して神経保護効果を示している可能性を示唆するものである。

本研究において、NMDA および 4-AP の神経保護効果はアデノシン A₁ 受容体拮抗薬 CPT により消失した事実は、NMDA および 4-AP の神経保護作用の少なくとも一部は A₁ 受容体活性化を介すること考えられる。A₁ 受容体を介する細胞障害防御作用は、心筋細胞や神経細胞のプレコンディショニングでも示されている。すなわち、心臓における長時間虚血前に短時間虚血を先行させるようなプレコンディショニングが長時間虚血後の壊死形成を減少させる (Thornton et al, 1990)。プレコンディショニングの壊死縮小効果は A₁ 受容体拮抗薬 CPT により消失する (Liu et al, 1991) ことから、プレコンディショニングにアデノシン受容体の関与が示されている。ATP の代謝産物であるアデノシンは心筋虚血時に細胞外で増加し、A₁ 受容体を介して ATP 感受性 K (K_{ATP}) チャネルを活性化する可能性が示唆されている (小畑, 2002)。この K_{ATP} チャネルの活性化が膜を過分極させ心筋保護作用をもたらすと考えられている。さらに、脳虚血においてもプレコンディショニングが神経保護効果を示すことか知ら

れている。また、脳虚血時にグルタミン酸などの興奮性アミノ酸伝達物質とともに ATP が放出され、細胞外に ATP 代謝産物であるアデノシン濃度の増加が観察されている (Gloubus et al, 1988)。A₁ 受容体選択的作用薬 adenosine amine congener が脳虚血後の海馬神経細胞死に対して保護効果を示すと同時に (Von Lubitz et al, 1999)、ラットにおいてカイニン酸誘発性神経細胞死が減弱されるという (Matsuoka et al, 1999)。このように、アデノシン受容体は中枢神経系においても神経細胞保護的に働いていると思われる。さらに、中枢神経系においてアデノシンは ATP が ectonucleotidase により分解されることにより生成され、グルタミン酸やアセチルコリンなどの興奮性神経伝達物質の放出を抑制してシナプス伝達や神経活動を抑制している (Chen et al, 1992)。これらのアデノシンの機能も神経保護作用に関与するのかもしれない。

本実験系において疑問となるのは、「アデノシン受容体かどのように活性化されるのか？」ということである。次のような実験事実がその疑問を解決するかもしれない。すなわち、ラット海馬において NMDA が内在性アデノシンの放出を促進させ、その放出は NMDA 受容体拮抗薬で抑制されることをマイクロダイアリス法により示されている (Chen et al, 1992)。また、同様の実験系において、高 KCl 刺激が内在性アデノシンを放出させ、その放出は NMDA 受容体拮抗薬で減弱されることも示されている。したがって、海馬の NMDA 受容体活性化はアデノシンを放出させる可能性が考えられる。また、以前我々の研究室において、神経細胞活性化の指標として初期発現遺伝子の一種である c-Fos 蛋白の発現を検討したところ、NMDA 投与は海馬歯状回顆粒細胞核内に強く発現することか明らかとなった (データは示していない)。本研究において 4-AP 投与は NMDA 投与の場合に比へ程度は弱いのか、NMDA の場合と同様な c-Fos 陽性細胞の局在が示された。これらの

事実は、NMDA および 4-AP 投与が歯状回顆粒細胞を活性化する可能性を示すものであるかもしれない。また、海馬の主要な神経回路として嗅内野浅層 2 層-貫通枝-歯状回顆粒細胞-苔状線維-CA3 錐体細胞-Schaffer 側枝-CA1 錐体細胞-海馬台-嗅内野深層および嗅内野浅層 3 層-貫通枝-CA1 錐体細胞の 2 経路が知られる。それらの経路の中で、歯状回顆粒細胞から CA3 錐体細胞へ投射される苔状線維の神経終末には ATP 含有シナプス小胞体が存在し、苔状線維の神経終末標本より高 K^+ 誘導性脱分極の応答として Ca^{2+} 依存性に ATP が放出されることが示されている (Ternan et al, 1989)。以上の事実は、NMDA や 4-AP の投与が海馬歯状回顆粒細胞を活性化して、苔状線維終末からの ATP 放出を促進することが考えられる。放出された ATP はアデノシンに代謝され、CA3 錐体細胞上の A_1 受容体を活性化すると推察される。事実、ラットにおいてアデノシン A_1 受容体が海馬錐体細胞 CA2/CA3a 領域および歯状回顆粒細胞層に存在することか *in situ hybridization* 法により示されている (Ochushi et al, 1999)。

A_1 受容体活性化による神経細胞死シグナルの抑制メカニズムを考える上で、次のような実験結果がヒントとなるかもしれない。すなわち、中枢神経系ではアデノシン受容体のうち A_1 および A_2 のサブタイプが分布し、海馬においては A_1 受容体が神経活動を抑制することか知られている (Dunwidde and Fredholm, 1989)。また、アデノシン A_1 受容体活性化による興奮性神経伝達物質放出の抑制メカニズムとしては K_{ATP} チャネルの活性化と N 型 Ca^{2+} チャネルの抑制が知られる。すなわち、アデノシン A_1 受容体の活性化はシナプス前 K_{ATP} チャネルを活性化して、過分極による神経伝達物質の放出抑制をおこす (Amoroso et al, 1990, Fredholm et al, 1988)。また、 K_{ATP} チャネルの活性化は脳虚血による神経細胞死および転写因子の発現を抑制する (Heurteaux et al, 1993)。さらに、脳虚血におけるプレ

コンディショニングの神経保護効果は、アデノシン A_1 受容体拮抗薬 CPT および K_{ATP} チャネル阻害薬 glibenclamide により消失する (Heurteaux et al, 1995)。アデノシン A_1 受容体は G_{i2} 、 G_{oA} および G_{oB} 蛋白と共役して N 型 Ca^{2+} チャネルを抑制する。この $G_{i/o}$ 蛋白を pertussis toxin を用いて抑制すると、アデノシン A_1 受容体の N 型 Ca^{2+} チャネル抑制効果は消失する (Wu and Saggau, 1994, McCool et al, 2001, Park et al, 2001)。これらの事実から、アデノシンは A_1 受容体活性化を介して、 K_{ATP} チャネルの活性化および N 型 Ca^{2+} チャネルの抑制により興奮性神経伝達物質の放出を抑制すると考えられる。これらの実験事実はすべて、シナプス前部における A_1 受容体に関するものであるが、シナプス後部でも A_1 受容体活性化を介した K_{ATP} チャネルの活性化および Ca^{2+} チャネルの抑制がみられるかもしれない。

以上のように、NMDA 受容体を介する神経保護メカニズムには、以下のような作業仮説が考えられるであろう。NMDA 受容体の活性化は、歯状回顆粒細胞の活性化とそれを介した苔状線維終末からの ATP 放出を引き起こす。CA3 の錐体細胞外に放出された ATP はアデノシンに代謝され、錐体細胞上の A_1 受容体を活性化する。 A_1 受容体の活性化は、カイニン酸の神経細胞死シグナルを抑制するのであろう。そのメカニズムとしては、 A_1 受容体活性化を介した K_{ATP} チャネルの活性化および Ca^{2+} チャネルの抑制が関与するかもしれない。

ラットにおいて ATP の受容体の一種である $P2X_7$ 受容体か、海馬苔状線維のシナプス前終末に存在して苔状線維終末からの伝達物質の放出を抑制していることも知られる (Armstrong et al, 2002)。苔状線維終末からはグルタミン酸が放出されることが知られておりグルタミン酸の過剰放出がカイニン酸による CA3 錐体細胞死と関与するかもしれない。したがって、ATP 分解産物のアデノシンだけでなく、苔状線維終末からのグルタミン酸放出を抑制する ATP

自体も NMDA 受容体活性化による神経保護効果に關与する可能性も考えられる。さらに、NMDA 受容体の活性化が直接的にカイニン酸による神経障害シグナルを抑制する可能性も残っている。今後、これらの可能性を含めて NMDA 受容体を介する神経保護作用について解析する必要がある。

TMT 神経障害の解析にはラットが広く用いられる。ラットにおける TMT 神経障害の誘発部位としては、海馬錐体細胞 CA3c、CA4 領域、梨状葉および嗅内皮質などが知られる (Bouldin et al, 1981)。しかしながら、マウスの TMT 神経障害部位は、明らかにラットとは異なって海馬歯状回顆粒細胞に主な障害部位がある。一方、TMT によるマウスの行動変化はラットと同様であり、振戦、尾の自傷および攻撃性の亢進などが観察された (Brown et al, 1979)。また、カイニン酸誘発性神経細胞死はアポトーシスおよびネクローシス併在型であるのに対して、ラットにおける TMT 神経細胞毒性はネクローシスであるという (Bouldin et al, 1981)。事実、TMT による神経細胞死はネクローシスの特徴を示し、アポトーシス特異的であるアポトーシス小体は認められなかった。

TMT の神経細胞障害のメカニズムは未だに不明な部分が多い。近年、副腎機能障害やコルチゾールの濃度低下により歯状回顆粒細胞が障害を受けること (小澤 他, 2002) および副腎摘出ラットで歯状回顆粒細胞死が見られる (Joels et al, 2001) ことなどが知られており、クルココルチコイドと歯状回顆粒細胞障害の関連性が示唆されている。本研究でも、TMT 処理は副腎皮質束状帯において細胞の縮小が観察され、クルココルチコイドの枯渇が推察される。したがって、TMT による神経細胞障害がクルココルチコイド枯渇により引き起こされる可能性も考えられる。しかしながら、副腎摘出マウスでは、海馬歯状回顆粒細胞にわずかに細胞障害が観察されたものの、TMT による細胞死とは明らかに異なっていた。したがって、TMT による神経障害は

クルココルチコイド枯渇とは別のメカニズムであると考えざるべきであろう。他の TMT 神経障害メカニズムとして、以下の報告がある。海馬スライスにおいて TMT が内在性グルタミン酸の誘導を引き起こす (Patel et al, 1990) とともに、グルタミン酸の再取り込みを減少させる (Naalsund et al, 1985)。また、培養細胞系において TMT が活性酸素ラシカルを産生し (Gunasekar et al, 2001)、その酸化ストレスはグルタミン酸受容体を活性化して細胞死を誘発する (Gunasekar et al, 1995, Martin et al, 1998)。さらに、グルタチオンが TMT による神経細胞死を減弱する (Gunasekar et al, 2001)。これらの事実は、グルタミン酸の放出およびそれに続く活性酸素ラシカルの産生が TMT 神経細胞障害メカニズムの一つである可能性を示唆している。しかしながら、TMT によるグルタミン酸の放出は、TMT により破壊された細胞からのグルタミン酸の流出に起因する可能性も考えられる。また、マウスにおいて TMT 神経障害が脳虚血やカイニン酸など様々な障害に対し脆弱性を持つ海馬錐体細胞 CA1 および CA3 領域ではなく、脳障害に対し抵抗性を持つと言われる歯状回顆粒細胞特異的に観察される。これらのことを考え合わせると、TMT 神経障害がグルタミン酸毒性に起因する可能性は低いと考えられる。次に、TMT の神経細胞障害に stannin が關与する可能性が示唆されている。すなわち、TMT 神経毒性感受性の細胞において stannin が陽性を呈し、antisense oligonucleotides を用いて stannin の発現を抑制すると、TMT 神経毒性が抑制されることか示されている (Toggas et al, 1992)。さらに、Northern blot 法によりラットにおける stannin の局在を見たところ、海馬、新皮質、小脳などの TMT 神経毒性に脆弱な部位に局在することが明らかとなっている (Dejneka et al, 1997)。したがって、この stannin の局在が TMT 神経毒性の選択性に關与している可能性が考えられる。しかしながら、マウスおよびラットにおけ

る神経細胞死の局在部位は異なり、我々の知る限りマウスにおける *stannin* の解析は行われていないので、今後さらなる検討が必要であると思われる。

TMT によりアストロサイトの長期的な活性化が観察された。培養顆粒細胞において、TMT が種々の活性酸素ラシカルを産生するが、アストロサイトの共存は活性酸素種の産生を低下させるということか知られる (Gunasekar et al, 2001)。したかつて、TMT によるアストロサイトの活性化は酸化ストレスに対応していると思われる。TMT 投与により発現した活性化アストロサイトに *nerve growth factor* や *TrkA* の発現が観察されるという報告も見られる (Koczyk and Oderfeld-Nowak, 2000)。このように、アストロサイトの活性化は、酸化ストレスに対応しているだけではなく、顆粒細胞の再生に関与しているかもしれない。

カイニン酸誘発性神経細胞死では、海馬錐体細胞層 CA1 および CA3 領域において神経細胞が脱落したのち、少なくとも投与 42 日後までは神経再生は観察されていない (Kitayama et al, 1999)。しかしながら、TMT 神経障害の経時的变化を検討したところ、TMT 神経細胞障害は一過性であり、TMT 投与 3 日以降で神経細胞の有意な増加が観察された。この TMT 一過性障害後の歯状回における細胞数の増加は大変興味深く、この事実は神経細胞の再生が促進されている可能性を示すものである。事実近年、成熟動物脳において神経幹細胞および神経前駆細胞が側脳室下層および海馬歯状回顆粒細胞下層などの特定の領域に存在し、それぞれ嗅球および海馬歯状回での神経細胞新生に寄与していることが明らかとなっている (Gage, 2000)。また、これらの部位における細胞増殖は脳虚血などの障害後に活性化するという (Liu et al, 1998, Arvidsson et al, 2002)。本研究において、細胞増殖マーカーで S 期特異的である BrdU の取り込みが TMT 障害後に海馬歯状回で増加していた。さらに、TMT 障害後

で増加した歯状回顆粒細胞下層の BrdU 陽性細胞が活性化アストロサイトではないことも示された。これらの事実は、神経幹細胞の分裂および増殖が TMT による障害後に起こっている可能性を示しており、TMT 一過性障害後の神経細胞の再生を支持するものである。

神経発生では、神経幹細胞の増殖に続いて、神経幹細胞から神経細胞およびクリア細胞への分化過程がみられる。これらの分化過程の調節に *basic region-helix-loop-helix* (bHLH) 構造をもつ種々の転写因子が関与することが示唆されている。(影山, 2002)。すなわち、bHLH 因子は *Shox2* の *daughterless* のホモログである転写因子 E2A とヘテロ二量体を形成して Ebox (CANNTG) に結合し、神経幹細胞から神経細胞に分化する種々の遺伝子の転写を活性化する。このように bHLH 因子は、神経幹細胞から神経細胞への分化を促進するのに対して、クリア細胞への分化を抑制する。NeuroD3/*neurogenin1* は、bHLH 因子の中でも神経前駆細胞に特異的な因子として知られている (Ma et al, 1998)。本研究において、TMT 障害後の NeuroD3 の増加は、神経幹細胞から神経前駆細胞への分化の活性化を示唆している。したかつて、TMT 神経障害後には歯状回において神経幹細胞の増殖および神経前駆細胞への分化が活性化されて神経再生が起る可能性が示唆される。

近年、増殖クリア細胞が神経細胞に分化する可能性が示されている。たとえば、*radial glia* は分裂能をもった *nestin* および GFAP を含んでいる細胞である。この細胞は長い突起を伸ばして神経細胞の遊走に関与する特殊なクリア細胞と考えられていた。しかしながら、最近 *radial glia* が神経幹細胞として神経細胞に分化する可能性が示されている (Noctor et al, 2001, Noctor et al, 2002)。また、増殖したアストロサイトの一部が神経細胞に分化するという報告もみられる (Sen et al, 2001)。これらのことから、TMT 神経障害後の神経再生に、増

殖したクリア細胞の一部が神経細胞に分化する可能性も考慮しなければいけないと思われる。

本研究では、神経細胞の障害と再生についてのみ検討しており、実際に TMT により神経回路網に障害が誘発され、その後再構築されているのかは不明である。近年、一度障害を受けた神経回路網が再構築される可能性が示唆されている。歯状回において、新しく産生された顆粒細胞は成熟顆粒細胞と電気生理学的に同様のパターンを示し (Praag et al, 2002)、脳虚血により脱落した神経細胞を再生させたラットにおいても正常ラットと電気生理学的および記憶学習能において同様のパターンを示している (Nakatomi et al, 2002)。したがって、再生した神経細胞による神経回路の再構築が行われるか否かの検討は今後の重要な課題であろう。

NMDA 受容体活性化がカイン酸誘発性神経細胞死に対して防御効果を示すのに対して、TMT 神経障害には著変を示さなかった事実は、NMDA 受容体活性化による神経細胞保護効果の高い選択性を示すものである。

E 結語

本研究において NMDA 受容体の活性化は、マウス海馬のカイン酸誘発性神経細胞死を抑制することか明らかとなった。また、この NMDA 神経保護作用は、マウスにおける TMT 障害に対しては無効であった。したがって、NMDA 受容体活性化による神経細胞保護効果は、カイン酸あるいは興奮毒性に選択的であると考えられる。このように、本研究では「NMDA 受容体の神経防御への関与」という NMDA 受容体の新しい生理的機能を見出した。今後、本機能に関する詳細なる解析の中から新しい神経保護メカニズムの確立と神経障害疾患の治療薬の開発が生まれることを期待したい。また、本研究では、マウスにおける TMT 神経障害が歯状回顆粒細胞層に選択的であることを明らかにするとともに、障害後に

神経再生が起こる可能性を示した。したがって、本 TMT 神経障害モデルは神経再生のインビボ実験系モデルとして有用であると思われる。今後、本モデルが神経再生メカニズムの解明および神経再生治療に役立つことを期待したい。

F. 研究発表

1 論文発表

- 1 Ken Shizuki, Kaoru Ogawa, Takeshi Matsunobu, Jin Kanzaki and Kiyokazu Ogita (2002) Expression of cFos after noise induced temporary threshold shift in the guinea pig cochlea *Neurosci Lett* Mar 1,320(1-2) 73-76
- 2 Kiyokazu Ogita, Hiroaki Okuda, Masahiro Kitano, Yoshiaki Fujinami, Kiyokazu Ozaki and Yukio Yoneda (2002) Localization of activator protein 1 complex with DNA binding activity in mitochondria of murine brain following *in vivo* treatment with kainate *J Neurosci* 22(7) 2561-2570
- 3 Eunchi Hinoi, Sayumi Fujimori, Yoichi Nakamura, Vladimir J Balcar, Keita Kubo, Kiyokazu Ogita and Yukio Yoneda (2002) Constitutive expression of heterologous N methyl D aspartate receptor subunits in rat adrenal medulla *J Neurosci Res* 68(1) 36-45
- 4 Nobuyuki Kuramoto, Keiji Inoue, Keiko Gion, Katsura Takano, Katsumi Sakata, Kiyokazu Ogita and Yukio Yoneda (2003) Modulation of DNA binding of nuclear transcription factors with leucine zipper motifs by particular endogenous polyamines in murine central and peripheral tissues *Brain Res* in press
- 5 Kiyokazu Ogita, Hiroaki Okuda, Yasuhiro Yamamoto, Norito Nishiyama and Yukio Yoneda (2003) *In Vivo* Neuroprotective Role of NMDA Receptors against Kainate-Induced Excitotoxicity in Murine Hippocampal Pyramidal Neurons *J Neurochem* In press

2 学会発表

- 1 Kiyokazu Ogita, Yoshiaki Fujinami, Masao Koida, Fumiaki Ito and Yukio Yoneda (2002) Kainate signals modulate expression of high molecular weight heat shock proteins in murine brain XIV World Congress of Pharmacology San Francisco

- USA, July 9
- 2 Hiroaki Okuda, Motoko Sato, Masao Koda, Yukio Yoneda, and Kiyokazu Ogita (2002) Neuroprotection of hippocampal cells against kainate induced excitotoxicity by in vivo treatment with NMDA XIV World Congress of Pharmacology, San Francisco, USA, July 9
 - 3 Yoshiaki Fujinami, Masahiro Kitano, Hiroaki Okuda, Masao Koda, Yukio Yoneda and Kiyokazu Ogita (2002) Localization of transcription factor AP 1 in mitochondria of hippocampal neurons through activation of kainate signals XIV World Congress of Pharmacology, San Francisco USA, July 9
 - 4 藤波義明、北野雅大、小井田雅夫、米田幸雄、荻田喜代一 (2002) グルタメイトシグナルを介する転写因子 AP-1 のミトコントリア遺伝子への結合。第101回日本薬理学会近畿部会、堺、6月21日。
 - 5 奥田洋明、西山徳人、米田幸雄、荻田喜代一 (2002) トリメチルススによるマウス歯状回顆粒細胞の一過性障害。第45回神経化学学会大会、札幌、7月17日。
 - 6 藤波義明、北野雅大、米田幸雄、荻田喜代一 (2002) 転写因子 AP-1 のミトコントリア遺伝子非翻訳領域への結合。第45回神経化学学会大会、札幌、7月17日。
 - 7 奥田洋明、西山徳人、小井田雅夫、米田幸雄、荻田喜代一 (2002) トリメチルスス誘発性海馬歯状回障害の神経再生による修復。第75回日本生化学会大会、京都、10月15日。
 - 8 久保雅喜、小井田雅夫、米田幸雄、荻田喜代一 (2002) グルタメイトシグナルを介する海馬内 antioxidant response element 結合の増強。第75回日本生化学会大会、京都、10月15日。
 - 9 藤波義明、北野雅大、小井田雅夫、米田幸雄、荻田喜代一 (2002) 転写因子 AP 1 のミトコントリア遺伝子への結合。第75回日本生化学会大会、京都、10月15日。
 - 10 西山徳人、佐藤素子、奥田洋明、小井田雅夫、米田幸雄、荻田喜代一 (2002) トリメチルスス誘発性神経細胞障害に伴う転写因子 AP 1 の発現。第75回日本生化学会大会、京都、10月15日。
 - 11 奥田洋明、佐藤素子、小井田雅夫、米田幸雄、荻田喜代一 (2002) NMDA レセプターを介する神経保護作用。第52回日本薬学会近畿支部大会、大阪、10月19日。
神経保護作用における NMDA レセプターの役割。奥田洋明、佐藤素子、小井田雅夫、米田幸雄、荻田喜代一 (2002) 第102回日本薬理学会近畿部会、岡山、11月15日。
 - 12 荻田喜代一、米田幸雄 (2002) 転写因子 activator protein-1 のカイニン酸によるミトコントリア移行。第2回ミトコントリア研究会年会、東京、12月19日。
 - 13 藤波義明、荻田喜代一、米田幸雄 (2002) 転写因子 activator protein 1 のミトコントリア遺伝子への結合。第2回ミトコントリア研究会年会、東京、12月20日。
 - 14 奥田洋明、西山徳人、小井田雅夫、米田幸雄、荻田喜代一 (2003) マウス海馬歯状回におけるトリメチルスス誘発性神経細胞障害後の神経再生の増強。第76回日本薬理学会総会、福岡、3月25日。
 - 15 藤波義明、久保雅喜、小井田雅夫、米田幸雄、荻田喜代一 (2003) マウス海馬におけるグルタメイトシグナルによる antioxidant-response element の活性化。第76回日本薬理学会総会、福岡、3月25日。
 - 16 山室晶子、吉岡靖啓、森田恵子、竹島直子、荻田喜代一、前田定秋 (2003) 6-Hydroxydopamine のヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y における小胞体ストレス誘導。第76回日本薬理学会総会、福岡、3月25日。
 - 17 奥田洋明、小井田雅夫、米田幸雄、荻田喜代一 (2003) NMDA受容体活性化に伴うカイニン酸誘発性神経細胞死の抑制。日本薬学会第123年会、長崎、3月27日。
 - 18 藤波義明、小井田雅夫、米田幸雄、荻田喜代一 (2003) マウス脳内 Fos/Jun ファミリー蛋白質のミトコントリア結合。日本薬学会第123年会、長崎、3月27日。

厚生労働科学研究費補助金(効果的医療技術の確立推進臨床研究事業)
分担研究報告書

研究課題「骨細胞再生を基礎とする骨及び関節治療薬の開発研究」
(主任研究者 米田幸雄)

分担研究課題「骨細胞増殖制御遺伝子の機能解析に関する研究」
分担研究者 山下 克美(金沢大学大学院自然科学研究科・助教授)

研究要旨 骨細胞の再生誘導・異常増殖の抑制を効果的に制御するうえで基礎的な情報をもたらすことが期待される細胞周期制御遺伝子の機能を明らかにし、これらを標的とする遺伝子、抗体、ペプチドを含む医薬品の開発を目指した研究を展開した。本年度は、MPF の活性促進に働く CDC25B とその制御因子とされる 14-3-3 の関係を明らかにするために、両者の相互作用と生物機能の関係を解析した。その結果、14-3-3 は CDC25B の特定の部位に結合し細胞内局在を制御することが明らかになった。また、CDC25B と相互作用はするが細胞内局在を制御しない 14-3-3 分子種も存在し、新しい制御機構が示唆され、今後の研究の展開によりこれらの分子を標的化する医薬品の開発の可能性が開かれた。

A 研究目的

単クローン抗体やペプチド、さらには遺伝子の導入による疾患治療においては、標的とする遺伝子または遺伝子産物により治療効果が大きく変わってくる。個々の疾患においては、異常となっている遺伝子そのものや発現調節機構は千差万別であるが、一般的に細胞増殖能(増殖の亢進または低下)とかかわりのある疾患においては、細胞周期進行にかかわる遺伝子の機能解析が治療に有用な情報をもたらす。さらに、その結果を基にこれらの遺伝子を標的とする抗体・ペプチ

ド・遺伝子を含む医薬品を開発する研究への展開が可能となる。本研究では、骨細胞再生を伴う細胞増殖や異常増殖の制御を可能にする医薬品の開発を目指して細胞周期制御の中心因子である CDK1/cyclin B (=MPF) の活性化制御にかかわる CDC25B の機能制御機構の解析を展開した。

CDC25B は細胞周期の G2/M 期において MPF の活性化を促進する遺伝子であり、細胞増殖と深くかかわる。また、老化細胞においては CDC25B の発現が他の遺伝子と比較し有意に低下して