グルタミン酸誘発性神経細胞障害における新規シグナルとしてのRNA分解系に関する薬理学的研究

メタデータ	言語: jpn
	出版者:
	公開日: 2017-10-05
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者:
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/26919

氏　　名	杉山　千絵
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	博甲第1064号
学位授与の日付	平成２０年９月２６日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第４条第１項)
学位授与の題目	グルタミン酸誘発性神経細胞障害における新規シグナルとしての RNA 分解系に関する薬理学的研究
論文審査委員（主査）	米田　幸雄（医薬保健研究域・教授）
論文審査委員（副査）	横井　毅（医薬保健研究域・教授），荒井　國三（医薬保健研究域・教授），中村　暢宏（医薬保健研究域・准教授），谷浦　秀夫（医薬保健研究域・准教授）

Several neurodegenerative diseases are associated with mitochondrial dysfunction. A decline in the mitochondrial RNA transcripts and protein synthesis, as well as mitochondrial DNA damage, is considered to induce mitochondrial injury to cause neuronal death. The regulation of mRNA decay by ribonuclease (RNase) is an important means to control expression of genes and proteins in eukaryotic cells. To evaluate involvement of mitochondrial dysfunction and RNase in neuronal death, in this study, I examined the effects of glutamate exposure on mitochondrial RNA level and RNase activity in primary cultured cortical neurons of mice. Cultured cortical neurons obtained were exposed to glutamate for 15 min at 100 μM. Glutamate treatment led to a significant decrease in mRNA of NADH-ubiquinone oxidoreductase subunits mRNA (nd1 and nd6) before cell death. As mitochondrial RNAs level is regulated at least in part by RNA degradation by RNase-L, I next examined the effect of glutamate exposure on expression of RNase-L. Glutamate exposure led to enhanced expression of RNase L at least 2 to 12 h later, with being absolutely abolished by MK-801. In addition to *in vitro* experiments using the cultures, I examined the expression of RNase L after neurotoxicant trimethyltin treatment *in vivo*. An intraperitoneal injection of trimethyltin into mice produced the enhancement of RNase L expression prior to neuronal death in the dentate gyrus. The enhancement of RNase L expression was abolished by MK-801. These results suggest that the activation of RNases, particularly RNase L, is at least in part involved in neuronal damage induced by NMDA receptor activation. The activation of RNA degradation system would be a novel signal for neuronal excitotoxicity.

今日の医学の進歩や科学技術の向上により様々な疾患に対する治療法が確立されてきた。中枢神経系領域においても治療のターゲットを発見するため遺伝子・分子レベルでの解析が盛んに行われているが、神経変性疾患の治療法ならびに治療薬の開発は未だ発展途上であると言えよう。神経変性疾患には、それぞれの特有障害部位と神経症状を示すが、これらの障害部位あるいは発症原因因子の相違にもかかわらず神経細胞の変性および脱落（神経細胞死)がいくつか

の共通のメカニズムによって起こることは周知の事実である。したがって、神経細胞死に共通するメカニズムの解明は、様々な神経変性疾患の予防や治療に対する創薬戦略上極めて重要と考えられる。現在、神経細胞死メカニズムの研究は様々な観点から進められており、神経細胞の過剰興奮、不良タンパク質の過剰蓄積、酸化ストレス、アポトーシスシグナルの過剰活性などが単独あるいは複合的に作用して神経細胞死を誘発すると考えられる。さらに、これらの反応において、そのほとんどがミトコンドリア機能異常を引き起こすことも報告されており、ミトコンドリア機能障害が神経細胞死に共通の過程である可能性が推察される。ミトコンドリアはミトコンドリア内遺伝子（mtDNA）に由来したタンパク質および細胞核内 DNA 由来のタンパク質が複合体を形成して機能することから、mtDNA 由来タンパク質発現異常がミトコンドリア機能変化を介して神経細胞死を惹起することは十分に推察できることである。しかしながら、神経細胞障害とミトコンドリア遺伝子発現異常の直接的関連性については十分な解析は行われていないのが現状である。したがって、本研究では神経細胞障害における新規共通メカニズムの解明する一環として、ミトコンドリア遺伝子の発現変化について解析した。

胎児マウス大脳皮質由来初代培養神経細胞にグルタミン酸（100 μM）を 15 分間曝露し、一定時間後に神経細胞障害および mtRNA レベルを解析した。その結果、曝露後 12 時間からの核凝集および 24 時間後での MTT 還元能の有意な低下がみられ、曝露後少なくとも 12 時間後から神経細胞障害が観察されることが判明した。このようなグルタミン酸曝露条件下において、mtDNA 上にコードされる mtRNA（nd1 および nd6）発現を解析した結果、曝露後 6 時間で有意な減少が認められた。これらの mtRNA レベルの低下が神経細胞死に先立ち確認されたことから、ミトコンドリア遺伝子の発現低下が神経細胞死の原因となる可能性が考えられる。mtDNA は環状 2 本鎖の DNA で比重の違いにより H 鎖と L 鎖に分けられ、細胞核とは異なった複製および転写機構を持つ。細胞核内 DNA は基本的にその DNA ごとに特有のプロモーター領域を持ち、それぞれの転写因子により転写調節が行われているのに対して、mtDNA では H 鎖および L 鎖がそれぞれ共通の複製開始点（O_H、O_L）および転写開始点（HSP、LSP）を持つ。H 鎖および L 鎖からはそれぞれ一本の RNA が合成され、ミトコンドリア機能タンパク質に相当するそれぞれの RNA へと切断・修飾をうける。本研究において、グルタミン酸曝露により減少が認められた nd1 および nd6 はそれぞれ H 鎖および L 鎖にコードされていることから、グルタミン酸による両 mtRNA レベルの減少は L 鎖および H 鎖の両者に由来した mtRNA レベルの変化と考えられる。これら mtRNA レベル低下の理由としては、①ミトコンドリア自体の減少、②mtDNA の転写抑制、③mtRNA の分解促進の 3 つが考えられる。しかしながら、グルタミン酸曝露後 12 時間までの mtDNA 量および処置後

6 時間までのβ-actin あるいは GAPDH の mRNA レベルに変化が認められなかったことから、少なくともグルタミン酸曝露後 12 時間までのミトコンドリア数、6 時間までの細胞数およびハウスキーピング遺伝子群の転写活性には変化がみられないことが示された。したがって、グルタミン酸による mtRNA レベルの減少はミトコンドリア数の減少によるものではないことが明らかとなった。最近、細胞死と RNA 分解の関連性が推察されていることから、グルタミン酸誘発性神経細胞死に mtRNA 分解機構の関与が推察される。したがって、RNA 分解および RNase 発現の神経細胞死機構への関与について解析を進めた。

細胞内 RNase の種類・特異性および機能は多岐にわたる。ミトコンドリア内には、RNase L および RNase H が確認されており、mtDNA の複製や mtRNA 前駆体のプロセシングに重要な役割を演じていることが知られる。それらの機能に加えて、RNase L はインターフェロンの抗ウイルス作用（ウイルス死）に関与することも報告されている。したがって、グルタミン酸誘発性神経細胞死における RNase L 発現および RNA 分解を解析した。胎児マウス大脳皮質由来初代培養神経細胞にグルタミン酸 100 μM を 15 分間曝露すると、曝露後 12 時間から核凝集が認められ、24 時間後では MTT 還元能の有意な低下がみられた。曝露後の RNA 分解を解析したところ、曝露 4 時間後から RNA 分解産物が増加するとともに、RNase 活性の増強が認められた。また、曝露後 2 時間から RNase LmRNA レベルの増加および曝露後 6 時間には RNase L タンパク質レベルが有意に増加することが明らかとなった。これらの増加は、神経細胞障害（暴露後 12 時間）に先だって惹起されることから、細胞障害の結果として RNA が分解されているのではなく、RNase 活性化による RNA 分解が神経細胞障害を誘引するシグナルの一つであることが示唆される。次いで、グルタミン酸誘発性神経細胞死は NMDA 受容体チャネル遮断薬 MK-801 および NR2B 含有 NMDA 受容体遮断薬 ifenprodil により完全に抑制されることから、本神経細胞死に先立つ RNase L 発現および RNase 活性に対する MK-801 および ifenprodil の影響について解析を進めた。いずれの遮断薬もグルタミン酸による RNase L 発現および RNA 分解の増強を完全に阻止した。したがって、これらの一連の反応は NMDA 受容体を介したものと考えられる。また、神経細胞障害を生じない低濃度のグルタミン酸（10 μM）曝露において RNase L の発現変動が認められなかったことからも、RNase L の発現増加が RNA 分解を介して神経細胞障害を誘発する可能性が示唆される。

次いで、インビボ実験系を用いて神経細胞死における RNase の関与について解析を進めた。有機化合物の一種であるトリメチルスズ（TMT）は、ヒトやげっ歯類において脳の特異的な領域に神経変性を引き起こし、多動、振戦、尾の自傷、攻撃性の亢進および永続的な空間的学習障害を引き起こすことが知られる。TMT による神経細胞死メカニズムには不明な点が残されているが、障害部

位でのグルタミン酸の放出が報告されている。したがって、まずはTMT誘発性海馬歯状回神経細胞死における NMDA 受容体の関与を解析した。TMT（2.8 mg/kg）をマウス腹腔内に投与すると、投与後2日で海馬歯状回顆粒細胞層に著明な神経細胞脱落が観察される。このような実験条件下でMK-801（0.5 mg/kg）をTMT投与後から2日間投与したところ、TMT誘発性神経細胞死は部分的に抑制された。このように、TMTによる海馬歯状回神経細胞死の一部にはNMDA受容体の活性化が関与することが示されたので、TMT投与に伴う海馬歯状回のRNA分解およびRNase L発現を解析した。TMT投与は、1日後から海馬歯状回のRNase L mRNAレベルに有意な増加を引き起こしたが、神経細胞死がみられない大脳皮質ではRNase L発現に変化は認められなかった。また、TMT投与後1日で海馬歯状回においてRNA分解産物の増加が観察された。さらに、免疫組織化学的解析では、TMT 投与後 1 日の海馬歯状回顆粒細胞層においてRNase L発現増強が確認された。また、このRNase L発現は、MK-801処置により抑制されることが判明した。以上の結果から、マウスのTMT誘発性海馬歯状回神経細胞死の少なくとも一部にNMDA受容体活性化に伴うRNase Lの発現増強および活性化が関与する可能性が示唆される。

本研究では、培養神経細胞を用いたインビトロ実験系およびマウスを用いたインビボ実験系より、NMDA受容体を介する神経細胞死の新規シグナルとして、①mtRNA減少、②RNase L発現増強、③細胞内RNA分解促進などのRNA分解系が機能することが示された。RNase Lの活性化は、細胞質でのタンパク質合成抑制のみならず、mtRNA分解を介してミトコンドリア機能も抑制する可能性が考えられる。このように、本研究の成果は「グルタミン酸誘発性神経細胞死にRNA分解系が関与する」という新規メカニズムを提案したところにあり、今後の神経変性疾患の臨床的治療法の確立のために基礎的知見として役立つことを期待したい。

学位論文審査結果の要旨

本研究では、グルタミン酸による神経細胞障害に関する新規出現メカニズムを解明する目的で、ミトコンドリア遺伝子発現について解析した。

胎児マウス大脳皮質由来神経細胞を、グルタミン酸 100 μM に 15 分間曝露すると、12 時間後から細胞核凝集や細胞生存率低下等が誘発されたが、この細胞死出現に先行して曝露 6 時間後にはミトコンドリア DNA にコードされるミトコンドリア RNA(nd1 および nd6)レベルの低下が観察された。事実、曝露後 4 時間目には RNA 分解産物の増加と RNAase 活性上昇が見られたのに対して、曝露終了後 2 時間目には RNAase L の mRNA 発現上昇が、および 6 時間目には RNAase L タンパク質発現上昇がそれぞれ確認された。NMDA 受容体アンタゴニストである MK-801 および ifenprodil は、グルタミン酸曝露に伴う神経細胞死だけでなく、RNAase L 発現上昇と RNA 分解増強をいずれも有意に抑制した。一方、マウスにトリメチルスズ TMT)を単回投与すると、2 日目には NMDA 受容体を介する神経細胞脱落が、海馬歯状回顆粒細胞層に選択的に誘発されたが、TMT 投与後 1 日目にはこの海馬歯状回の RNAase L mRNA レベルは有意に上昇したのに対して、大脳皮質ではこのような有意な変化を確認できなかった。さらに、免疫組織化学的検討の結果、TMT 投与後 1 日目には海馬歯状回顆粒細胞層に RNAase L 発現上昇が観察された。これら TMT 投与に伴う変化はいずれも MK-801 投与によって有意に回復した。したがって、グルタミン酸による神経細胞死の出現メカニズムに、RNAase L 発現上昇を介する RNA 分解亢進が関与する可能性が考えられる。

以上の研究成績は、NMDA 受容体を介するグルタミン酸神経毒性出現に RNA 分解系が関与する可能性を初めて提唱しただけでなく、今後の脳機能保護を指向する創薬戦略展開への貢献が期待される点で高く評価されるので、審査委員会は本論文が博士（薬学）に値すると判断する。