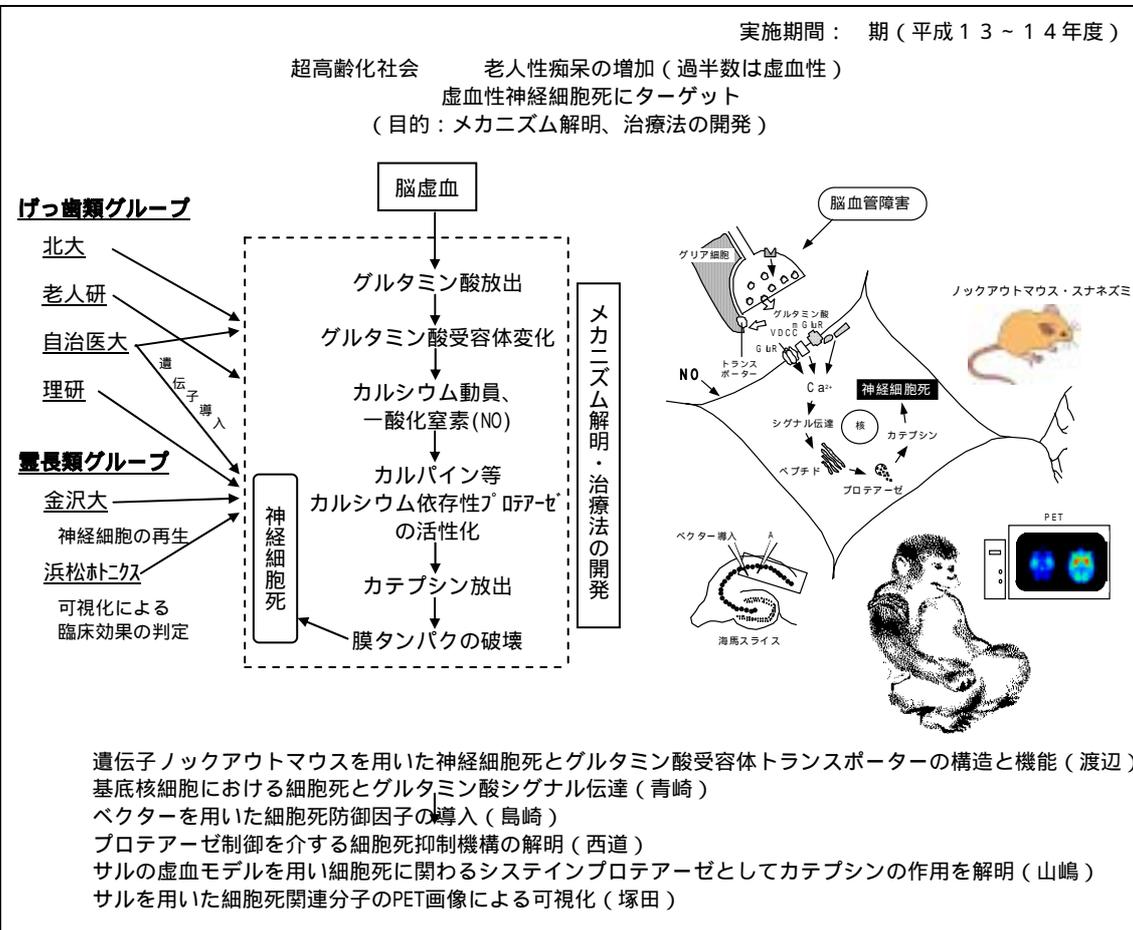


脳血管障害による「神経細胞死」の予防と治療についての研究

< 研究の概要・目標 >	< 諸外国の現状 >	< 研究進展によるメリット >
<p>1 何を目標しているのか 老人性痴呆症の原因の約半数を占める虚血性神経細胞死のメカニズムの解明と治療法の確立。</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 5px 0;"> <p>(第I期の目標) 海馬、小脳における神経細胞死に関わる分子群の同定 (第II期の目標) 神経細胞死及びその防御に関わる遺伝子の探索、細胞死のカスケードの解明</p> </div> <p>2 何を研究しているのか ・神経細胞死のメカニズムの解明のための基礎的研究 ・薬物を用いてそのメカニズムを阻害することによる治療法の開発のための研究を行う。</p> <p>3 何が新しいのか 本研究グループ独自の神経細胞死のメカニズム(仮説)に基づいて、治療法の開発を行おうとするアイデアが新しい。</p>	<p>1 現状および我が国の水準 ・マウスを用いた基礎的研究は諸外国でも盛んに行われており、我が国もしのぎを削っている状況。 ・プロテアーゼ(タンパク質分解酵素)による神経細胞死仮説は本研究グループ独自の着想であり、さらに、本研究グループは、この仮説を裏付けるサルを用いた虚血実験に関する研究成果を報告している。</p>	<p>1 世界の水準との関係 本研究グループが提唱している仮説が実証されれば、虚血性神経細胞死に対する治療法を世界に先駆け確立することができる。</p> <p>2 波及効果 ・虚血性神経細胞死の病態が解明され治療法が確立する。 ・細胞死に至る過程で共通するものがあると考えられるアルツハイマー病による障害の特定に手がかりを与える等、医学、薬学分野への波及効果が期待される。</p>



年次計画および所用経費

(単位：千円)

研究項目	担当機関	担当者	所要経費					合計
			10年度	11年度	12年度	13年度	14年度	
1. げっ歯類の「神経細胞死」に関する研究								
(1)神経細胞死の基礎に関する研究								
遺伝子ノックアウトマウスを用いた神経細胞死とグルタミン酸受容体構成蛋白の構造と機能の特性に関する研究	北海道大学医学部	渡辺 雅彦	20,346	21,817	23,478	24,427	21,900	111,968
海馬および小脳の神経細胞障害に対する防御と治療に関わるグルタミン酸シグナル伝達に関する研究	金沢大学医学部	狩野 方伸	21,967	25,540				47,507
海馬および基底核の神経細胞障害に対する防御と治療に関わるグルタミン酸シグナル伝達に関する研究	東京都老人総合研究所	青崎 敏彦			25,538	27,390	27,200	80,128
(2)神経細胞死の治療法開発に関する研究								
スライスパッチ記録および光イメージング法による虚血後細胞における病態とその保護に関する研究	自治医科大学	坪川 宏	28,492	25,872	23,581			77,945
ベクター利用による細胞死防御法の開発に関する研究	自治医科大学	島崎 久仁子				23,581	22,100	45,681
プロテアーゼ制御を介した神経細胞死制御機構に関する研究	理化学研究所	西道 隆臣	24,182	25,183	26,186			75,551
カルバスタチン遺伝子改変動物の作成によるカルパイン依存的神経細胞死機構の解明	理化学研究所	西道 隆臣				26,186	24,900	51,086
2. 霊長類の「神経細胞死」に関する研究								
(1)神経細胞死の治療法開発に関する研究								
霊長類に特異的な虚血性神経細胞死の予防と治療	金沢大学医学部	山嶋 哲盛	46,306	54,587	54,481	50,748	48,600	254,722
(2)神経細胞死の診断法開発に関する研究								
霊長類におけるPET画像による細胞死関連分子の可視化技術と臨床治療薬の開発	浜松ホトニクス㈱	塚田 秀夫	25,707	26,000	25,410	25,410	24,900	127,427
3. 研究管理	自治医科大学	川合 述史	9,307	9,975	9,917	11,255	10,351	50,805
所要経費 (合計)			176,307	188,974	188,591	188,997	179,951	922,820

研究成果の概要

本研究チームは虚血性神経細胞死の病因に関して細胞レベルにおける変化の解析を行い、細胞死の防御機構の解明から治療法の開発にいたる研究目標を掲げた。実験動物として遺伝子操作も可能であるげっ歯類脳を用いたものから人の臨床面にもつながる霊長類の脳虚血モデルを用い多面的な研究を遂行した。まずげっ歯類の経細胞死に関する基礎的な研究として、マウスの海馬を用い遺伝子ノックアウトマウスによる神経細胞死とグルタミン酸受容体構成蛋白の構造と機能の特性に関する研究を行った。グルタミン酸受容体の分子検出には蛋白分解処理などの抗原露出法を可視するためのツールと技法を開発し、これを野生型マウスと遺伝子ノックアウトマウスの比較解析に応用することにより正常なシナプス発現機構と虚血に伴う分子発現局在変化を解明した。海馬のほか、これまで報告の少なかった小脳や基底核における細胞死機構を調べた。小脳皮質へのグルタミン酸性入力である登上線維とプルキンエ細胞間の興奮性シナプスにおいて、シナプス前終末に存在する代謝型グルタミン酸受容体サブタイプ 2/3(mGluR2/3)を活性化すると、グルタミン酸の終末からの放出が減少するが、脳虚血状態で細胞外のグルタミン酸濃度が上昇した際に、mGluR2/3 を介するネガティブフィードバック機能によって、グルタミン酸放出を減少させ、興奮毒性からプルキンエ細胞を保護することを明らかにした。興奮性細胞死を来たしやすきことで知られる大脳基底核の線条体におけるグルタミン酸シグナル伝達の様式について調べた結果、線条体は数種類の主要な神経細胞によって構成されているが、そのうち虚血に弱い2種類の細胞は線条体の機能単位を形成しており、これが虚血に比較的抵抗性をもつ2種類の細胞がその機能単位を連絡する働きを持っていることが分かった。神経細胞死の治療法開発に関する研究としてまず細胞死の引き金となる細胞内カルシウム流入の機構はスライパッチクランプ法および蛍光イメージング法を組み合わせ詳細に検討された。正常の海馬錐体細胞活動電位の発生に伴う細胞内カルシウム濃度上昇率は、樹状突起の方が細胞体より高い。ところが虚血後の海馬CA1 錐体細胞では、活動電位発生の引き金となる刺激によってカルシウム濃度上昇のパターンが異なり、シナプス入力による活動電位の発生時には、樹状突起の上昇率のほうが大きく、細胞体への脱分極電流の注入により活動電位を発生させた場合は、細胞体の方が上昇率が大きいという結果を得た。虚血性神経細胞死の抑制に重点を置き、遺伝子治療面からの脳血管障害の予防およびその治療法開発を目指した研究においてはアポトーシス抑制遺伝子(bcl-2)導入による神経細胞死防御を目指し bcl-2 を組み込んだアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの海馬への直接投与を行い、虚血後の細胞死に対する保護作用を認めた。この場合、虚血1時間後のベクター投与においても細胞死の減少が認められ、脳卒中発作後の治療という意味で、臨床面への応用も期待できる結果が得られた。また新しい脳虚血モデルとして幼若ラットの脳を成体ラット血管に移植する手法を開発し、90分から120分という長時間にわたる虚血後でも低温下で手術操作を行った場合は、移植後数週間にわたり脳組織が正常ラットと同様に発達機能することを明らかにした。脳内に存在する多種類のペプチドは一方では神経保護的に作用した神経毒性を発揮するが、これらのペプチドの寿命は、蛋白質分解システムによって決定される。この機構についてアルツハイマー病に蓄積して、細胞死を起し発症の引き金となる A を標的ペプチドとし、その脳内での寿命決定機構を明らかにする研究を行った。その結果、中性エンドペプチダーゼの中で特にネプリライシンが主要な役割を担うことを見いだした。ネプリライシン遺伝子ノックアウトマウスの脳において、標識 A ペプチドの分解が顕著に抑制され、内在性 A 量も増加することを明らかにした。また動物脳内のプロテアーゼ阻害タンパク質の発現を遺伝子工学的手法により操作することで、成熟脳内でおきる神経細胞死に直接関与するプロテアーゼを同定した。カスパーゼ活性を阻害する p35 タンパク質、カルパイン活性を阻害するカルバスタチンタンパク質を過剰発現または欠損した遺伝子改変マウスを作製し、細胞死に伴う海馬内の神経マーカータンパク質の変化を指標に各種疾患に関わる神経細胞消失のメカニズムを検討した。一方霊長類に特異的な虚血性神経細胞死の予防と治療に関する研究面では、遺伝子構造がヒトと95%もの相同性を示すニホンザルを用いて両側頸動脈結紮による短時間虚血後の海馬 CA1 領域の神経細胞死の動態を研究し、霊長類に特異的に生じる虚血性神経細胞死においてカルパイン、カテプシン等のシステインプロテアーゼの果たす役割が詳細に調べられた。また霊長類を用いた神経細胞死の診断法開発に関する研究としてサル PET 画像による細胞死関連分子の可視化技術と臨床治療薬の開発を行った。永久梗塞・虚血再灌流の2種類の脳虚血動物モデルを開発して、高分解能動物用 PET スキャナーと脳循環代謝計測用標識化合物を用いてその病態を明らかにすると共に、作用機序が異なる様々なタイプの脳梗塞治療薬の候補化合物の有効性を評価した。さらに、中枢神経伝達系に特異的な標識化合物とマイクロダイアリス法を組み合わせ、中枢神経伝達系の異常と虚血性神経細胞死におけるグルタミン酸・ドパミン・セロトニンの関与について検討し、サル脳虚血モデルの前臨床評価系としての有用性を示した。

