

称号及び氏名 博士（獣医学） 山城 晃子

学位授与の日付 平成26年3月31日

論文名 **Amphotericin B** によるグリア細胞機能変化

論文審査委員 主査 中村 洋一

副査 竹内 正吉

副査 松尾 三郎

論文要旨

中枢神経系はニューロン以外にミクログリア、アストロサイト、およびオリゴデンドロサイトの3種類のグリア細胞によって構成されており、これらの細胞が密接に相互作用し合うことにより、複雑な中枢機能が発揮されている。グリア細胞のうち、ミクログリアとアストロサイトはアルツハイマー病やパーキンソン病などの各種神経変性疾患において活性化していることが知られており、異常活性化したグリア細胞から産生される炎症性サイトカインや一酸化窒素（NO）は、ニューロンの生存に対して悪影響を及ぼす可能性が高いと考えられている。一方で、グリア細胞は **brain-derived neurotrophic factor (BDNF)** や **glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)** などの各種神経栄養因子の産生を介してニューロンの生存維持に貢献していることもよく知られている。

プリオン病は、ウシ海綿状脳症やクロイツフェルト・ヤコブ病に代表される致死的な中枢神経変性疾患であり、細胞膜表面に存在する正常プリオン蛋白質が構造変換を起こし、 β シート構造の多い異常プリオン蛋白質に変化することが神経変性の原因と伝染性の理由であるとされている。この疾患に特徴的な主要病変は、脳内における異常プリオン蛋白質の蓄積、ニューロンの変性脱落とそれに続く空胞形成およびグリア細胞の異常活性化であり、アストロサイトにおいて神経栄養因子類の産生が増加するという報告もあることから、グリア細胞からの炎症性サイトカインやNOおよび神経栄養因子類の産生が

病態の進行を決定づける重要な要素であると考えられる。

プリオン病に対して治療効果があると報告されている数少ない薬品のひとつに **amphotericin B (AmB)**がある。ポリエン系抗生物質で強い抗真菌作用を持つ **AmB** はプリオン病の疾患モデル動物において、異常プリオン蛋白質の蓄積とグリオシスを抑制し、発症遅延や延命といった効果がある。しかしながら、その作用機序は不明な点が多く、**AmB** がグリア細胞に及ぼす影響についてはほとんど報告がない。本研究ではミクログリアおよびアストロサイトの各種細胞機能に対する **AmB** の作用について検討することを目的とした。

第一章 培養ミクログリア細胞機能に対する amphotericin B の効果

本章では、ラット新生仔全脳由来の培養ミクログリアを用いて、**NO** の産生およびサイトカインや神経栄養因子の発現に対する **AmB** の影響について検討した。**0.5 µg/ml** の **AmB** では生細胞数のわずかな増加が認められ、**2.5 µg/ml** 以上の **AmB** はミクログリアの生細胞数を減少させた。**AmB** は、細胞毒性をもたない濃度域で、ミクログリアの **NO** 産生を誘導することを見出した。この産生は、**lipopolysaccharide (LPS)**で刺激した場合と同様に、誘導型 **NO** 合成酵素 (**iNOS**) の発現によるものであることを、**RT-PCR** 法により **mRNA** レベルで確認し、さらにウエスタンブロッティング法で蛋白質レベルでも確認できた。また、**AmB** 刺激は炎症性サイトカインである **interleukin (IL)-1 β** , **tumor necrosis factor (TNF)- α** , **IL-6** の各 **mRNA** 発現を誘導することも見出した。

次に、神経栄養因子類の **mRNA** 発現については、**AmB** や **LPS** の刺激により、**ciliary neurotrophic factor** の発現量が有意に減少し、逆に **BDNF** の発現量には上昇傾向が認められた。一方、**GDNF** の発現量は **AmB** 刺激により有意に増加したが、**LPS** 刺激によっても増加しなかった。

これらの結果は、**AmB** がミクログリアを活性化すること、並びに **AmB** が神経栄養因子類の発現を制御していることを示しており、プリオン病治療薬としての **AmB** の作用機序に、ミクログリアが関与している可能性を示唆するものである。

第二章 培養アストロサイト細胞機能に対する amphotericin B の効果

本章では、ラット胎仔大脳皮質由来の培養アストロサイトを用いて、第一章と同様な細胞機能に対する **AmB** の影響について検討した。**10 µg/ml** までの **AmB** ではアストロサイトの生細胞数に有意な変化は認められなかった。**AmB** は細胞毒性をもたない濃度域で、アストロサイトを活性化し、**iNOS mRNA** 発現を誘導して **NO** を産生させた。また炎症性サイトカインについては、**IL-1 β** および **TNF- α** の **mRNA** 発現が **AmB** 刺激により誘導されることを見出した。また **ELISA** 法により測定した培養液中の **TNF- α** 蛋白質放出量も増加することも確認した。

次に、神経栄養因子類については、**neurotrophin-3** の mRNA および細胞内蛋白質発現量が **AmB** 刺激により有意に減少し、逆に、**BDNF** の蛋白質発現量および培養液中への産生量は **AmB** 刺激により増加することを見出した。さらに、**GDNF** の蛋白質発現量および培養液中への産生量も **AmB** 刺激により増加することを見出した。

これらの結果は、**AmB** がアストロサイトを活性化すること、並びに **AmB** が神経栄養因子類の発現と産生を制御していることを示しており、プリオン病治療薬としての **AmB** の作用機序に、ミクログリアだけでなくアストロサイトも関与している可能性を示唆するものである。

第三章 ラット脳における amphotericin B の影響

本章では、前2章の *in vitro* 実験の結果を *in vivo* で確かめるため、**AmB** を脳実質内へ直接投与し、生体内のグリア細胞に対する作用について、神経栄養因子 **BDNF** および **GDNF** の発現を免疫染色法により検討した。ラットを麻酔下で脳定位固定装置を用いて、右線条体に **5 μg** の **AmB** を投与し、**72** 時間後経心灌流により脳を取出して作成した脳切片における各種抗体に対して陽性の蛋白質発現量を、**diaminobenzidine (DAB)** による染色程度を画像解析ソフトにより定量化し、反対側の染色程度との比として評価した。**BDNF** の発現量は、**AmB** 投与群で対照 (**vehicle** 投与) 群に比して高い傾向にあった。また、**GDNF** の発現量は **AmB** 投与群で有意に高いことを見出した。

アストロサイトおよびミクログリアの各々の特異的マーカーである **GFAP** および **CD11b** の免疫染色では、どちらも **AmB** 投与により発現程度が対照群に比して有意に増加しており、両細胞を活性化していることが示された。さらに蛍光二重染色法により、これら神経栄養因子を発現する細胞種について検討した。**BDNF** については、対照群で **GFAP** または **CD11b** を共発現している細胞がほとんど見られないのに対し、**AmB** 投与群では、**BDNF** と **GFAP** または **BDNF** と **CD11b** を共発現している細胞をそれぞれ確認することができた。一方、**GDNF** の場合は、対照群においても **GFAP** と **GDNF** を共発現している細胞を確認することができたが、**AmB** 投与群では、**GFAP** だけでなく、**CD11b** も **GDNF** と共発現している細胞を確認することができた。ニューロンの特異的マーカーである **MAP2** の免疫染色では、**AmB** 投与によるニューロンの脱落は認められなかった。

これらの結果は、ラット脳内でも両グリア細胞は **AmB** により活性化され、**BDNF** および **GDNF** の発現と産生が増強されることを示唆するものである。

本研究において、**AmB** はミクログリアおよびアストロサイトの両グリア細胞を活性化し、サイトカインや **NO** の産生を誘導するとともに、神経栄養因子類の発現・産生を制御し、それらの細胞機能を大きく変化させることが示された。特に、2種の神経栄養因子、**BDNF** および **GDNF** の産生を誘導・増強することは、**AmB** のプリオン病治療

薬としての作用機序を解明する上で重要である。また **AmB** 刺激により両グリア細胞から産生された炎症性サイトカインは、オートクラインまたはパラクライン的に作用し、さらに両グリア細胞における神経栄養因子類の産生を増強する可能性もある。また、これら **AmB** の作用はプリオン病以外の各種神経変性疾患にも有効であると考えられ、本研究成果がそれらの治療薬の開発基盤となることが期待される。

審査結果の要旨

中枢神経系の精妙な機能は、ミクログリアやアストロサイトなどのグリア細胞およびニューロンが密接に相互作用し合うことにより発揮される。ミクログリアとアストロサイトはアルツハイマー病やパーキンソン病などの各種神経変性疾患において活性化しており、異常活性化したグリア細胞から産生される炎症性サイトカインや **NO** は、ニューロンの生存に対して悪影響を及ぼす一方で、グリア細胞が産生する各種神経栄養因子はニューロンの生存維持に貢献している。ウシ海綿状脳症やクロイツフェルト・ヤコブ病に代表される致死的な中枢神経変性疾患であるプリオン病の特徴的な主要病変は、脳内における異常プリオンの蓄積、ニューロン変性脱落とそれに続く空胞形成およびグリア細胞の異常活性化であり、グリア細胞からの炎症性サイトカインや **NO** および神経栄養因子類の産生が病態の進行を決定づける重要な要素である。強い抗真菌作用を持つポリエン系抗生物質、**amphotericin B (AmB)** はプリオン病に対して治療効果があると報告されているが、その作用機序は不明で、特にグリア細胞に及ぼす **AmB** の作用については報告がない。

本研究は、ミクログリア(第一章)およびアストロサイト(第二章)の各種細胞機能に対する **AmB** の作用について **in vitro** で検討し、加えて **AmB** をラット脳内に投与したときの **in vivo** での作用(第三章)について明らかにしている。

第一章では、ラット新生仔全脳由来の培養ミクログリアを用いて、**AmB** の影響について検討し、**AmB** 刺激は、誘導型 **NO** 合成酵素(**iNOS**)の発現を介した **NO** 産生をもたらす、炎症性サイトカイン(**IL-1 β** , **TNF- α** , **IL-6**)の各 **mRNA** 発現を誘導することを見出した。また、神経栄養因子類の発現については、**AmB** の刺激により、**CNTF** の発現量が減少し、逆に **BDNF** と **GDNF** の発現量は増加することを明らかにした。これらの結果は、**AmB** がミクログリアを活性化するとともに、神経栄養因子類の発現を制御していることを示しており、プリオン病治療薬としての **AmB** の作用機序に、ミクログリアが関与している可能性を示唆するものである。

第二章では、ラット胎仔大脳皮質由来の培養アストロサイトを用いて、第一章と同様に

検討し、**AmB** 刺激は、**iNOS** 発現を介する **NO** 産生をもたらし、**IL-1 β** および **TNF- α** の発現が誘導されることを見出した。また **AmB** 刺激により、**NT-3** の発現量が減少し、逆に **BDNF** の発現・産生量は増加すること、**GDNF** の発現・産生量も増加することを見出した。これらの結果は、**AmB** がアストロサイトを活性化すること、並びに **AmB** が神経栄養因子類の発現と産生を制御していることを示しており、プリオン病治療薬としての **AmB** の作用機序に、ミクログリアだけでなくアストロサイトも関与している可能性を示唆するものである。

第三章では、前2章の **in vitro** 実験の結果を **in vivo** で確かめるため、**AmB** をラット脳実質内へ直接投与し、生体内のグリア細胞に対する作用について、免疫染色法により検討している。麻酔下のラット脳線条体に **AmB** を投与し、3日後に作成した脳切片における神経栄養因子の発現量を免疫定量し評価したところ、**BDNF** および **GDNF** の発現量は、**AmB** 投与群で対照群に比して高い傾向にあった。アストロサイトおよびミクログリアの各々の特異的活性化マーカーである **GFAP** および **CD11b** の免疫染色では、どちらも **AmB** 投与により発現程度が対照群に比して有意に増加しており、両細胞が活性化していることが示された。これらの結果は、ラット脳内でも両グリア細胞は **AmB** により活性化され、**BDNF** および **GDNF** の発現と産生を増強することを示唆するものである。

本研究により、**AmB** はミクログリアおよびアストロサイトの両グリア細胞を活性化し、サイトカインや **NO** の産生を誘導するとともに、神経栄養因子類の発現・産生を制御することが明確に示された。特に、2種の神経栄養因子、**BDNF** および **GDNF** の産生を誘導・増強することは、**AmB** のプリオン病治療薬としての作用機序を解明する上で重要である。また、これら **AmB** の作用はプリオン病以外の各種神経変性疾患にも有効と考えられ、本研究成果がそれらの治療薬の開発基盤となることが期待される。

以上の本研究の成果は、プリオン病治療薬の開発基盤となるだけでなく、各種神経変性疾患の病態解明に大きく寄与するとともに、中枢神経系の機能維持のためのグリア細胞の機能評価の重要性を見直すものであり、ひいては神経科学領域の発展にも寄与するものと考えられる。よって最終試験の結果とあわせて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。