

# 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

## I 試験研究の全体計画

### 1. 研究の趣旨

本研究は、超高齢化社会を迎えるわが国の医療の最重要課題の一つである老人性痴呆症について、その大きな原因とされる虚血性脳血管性障害に基づく神経細胞死の病態解明、さらに予防や治療法の開発を研究目標に掲げる。この目標達成のため、まず脳虚血後に起こる神経細胞死に関する基礎的なデータの解析を行う。

研究計画として、虚血動物モデルとして広く用いられている砂ネズミに加えて、遺伝子操作の可能なマウスを用い、ノックアウトマウスやトランスジェニックマウスを作成し、虚血後の海馬あるいは小脳細胞における変化を解析する。スライスパッチクランプ法などの電気生理学的手法、カルシウムイメージングなどの光学的手法、免疫電顕法や免疫組織化学法を駆使し、細胞死につながるグルタミン酸性神経伝達に関わる受容体分子、細胞内情報伝達分子、さらに蛋白分解酵素（プロテアーゼ）の動態を詳細に研究する。またこれらの情報をもとに、ベクター利用による細胞死の防御や治療法の開発を進める。

一方、げっ歯類で得られた基礎的な知識に基づき、よりヒトに近い霊長類について研究を拡げ、ニホンザルの虚血性神経細胞死モデルを開発し虚血後の細胞死に関わるカルシウムプロテアーゼであるカテプシン等の細胞内分子の役割を明らかにする。またPETによる脳画像撮影法により、虚血時の脳血流変化や代謝過程をアイソトープを用いた生化学的手法により解析し、神経細胞死に至る脳内機構の詳細を解明する。

このように、本研究はげっ歯類から霊長類にいたる実験動物を用い、虚血後神経細胞死に至る過程で細胞内に起こる病的変化を、単一細胞レベルから遺伝子レベルに至るまで多面的に解明する計画である。各リエゾンが相互に密接に情報交換を行いながら積極的に共同研究を押し進める計画である。

### 2. 研究内容及び目標

#### 1. げっ歯類の「神経細胞死」に関する研究

脳血管障害のモデル動物としてスナネズミ、ラットに加え、遺伝子操作の可能なマウスを用い、虚血後に起こる神経細胞死の病態を単一神経細胞レベルで解析する。虚血後の海馬・小脳細胞に起こる病変を遺伝子操作も加え、受容体、イオンチャンネル、細胞内プロテアーゼ等の面から多角的に捉え、また細胞死の防御・予防法を開発する。

#### (1) 神経細胞死の基礎に関する研究

① 遺伝子ノックアウトマウスを用いた神経細胞死に関連するグルタミン酸受容体構成蛋白の構造と機能に関する研究（北海道大学医学部解剖学講座）

ア. 神経細胞死関連分子の可視化に関する研究  
神経細胞死に関連する、グルタミン酸受容体及びトランスポーター遺伝子の単離、構造決定を行い特異的抗体作成により、分子の可視化を行う。

イ. ノックアウトマウスにおける形態学的解析

グルタミン酸受容体及び、トランスポーター遺伝子のノックアウトマウスを用い、電子顕微鏡により細胞死における形態学的な変化を解析する。

② 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（金沢大学医学部生理学講座）

ア. グルタミン酸性シナプス伝達の修飾機構の解析

小脳プルキンエ細胞における細胞死機構をしらべるためスライスや培養細胞において障害をうけた細胞のグルタミン酸性シナプス伝達の異常を明らかにする。

イ. ノックアウトマウスにおけるグルタミン酸シグナル伝達に関する研究

グルタミン酸シグナル伝達に関連する分子のノックアウトマウスを用い小脳及び海馬細胞における虚血後変化の比較解析を行う。

ウ. 虚血負荷時の小脳細胞の病的変化と修復機構の解析

小脳細胞の虚血性変化と興奮毒性を防御する神経栄養因子等の機構を明らかにする。

#### (2) 神経細胞死の治療法開発に関する基礎的研究

① 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 生理学講座）

ア. 虚血後の海馬細胞のイオンチャンネル電流の変化の解析

スナネズミ及びマウスの虚血後の海馬錐体細胞の細胞体、および樹状突起からパッチクランプ記録、および光イメージング法を用い、各種イオン動態の変化を詳細に解析する。

イ. ノックアウトマウス海馬細胞の虚血による変化の解析

グルタミン酸性シグナル伝達に関連する分子のノックアウトマウスにおける虚血後の変化を解析、比較する。

ウ. アデノ随伴ウイルス発現による細胞死保護の研究

非病原性であり、神経細胞に発現の容易なアデノ随伴ウイルスをベクターとしてアポトーシス抑制分子である Bcl-2

などの細胞死保護物質を組み込み、虚血後の細胞死抑制効果をしらべ治療法の開発を計る。

② プロテアーゼ制御を介した神経細胞死抑制機構に関する研究（理化学研究所神経蛋白質制御研究室）

ア. 放射性標識ペプチド投与による虚血動物における変化の解析細胞死防御法の開発を目指し、虚血動物に放射性標識を行った合成ペプチドの脳内注入を行い、その代謝過程を解析する。

イ. ペプチドの分解に関与するプロテアーゼの分子レベルの同定

細胞死に関連するペプチドを同定し、その分解に関わるプロテアーゼを分子レベルで同定し予防と治療法の開発に役立てる。

2. 霊長類の「神経細胞死」に関する研究

ヒトの脳血管性病変という臨床面ともつながる研究として、霊長類のサルを用い、虚血後の神経細胞死をもたらす因子のPETによる画像解析を行い、またカテプシン等の細胞死関連分子の役割とその阻害剤の探索により臨床治療薬の開発を行う。

(1) 神経細胞死の治療法開発に関する研究

① 霊長類の虚血性神経細胞死の予防と治療（金沢大学医学部 脳神経外科学講座）

ア. ニホンザルの虚血性細胞死に対する障害因子の探索とその保護

ニホンザルを用い霊長類虚血性細胞死のモデルを確立し、細胞傷害因子としてカルパイン、カテプシン、カスパーゼ等の役割を追求する。

イ. 脳梗塞および血管性痴呆治療薬の開発

脳梗塞や虚血後の記憶障害について治療薬の開発をめざし、システインプロテアーゼやその阻害剤の効果をしらべる。

ウ. 神経細胞死を診断するイメージング法の確立

サルを用いた虚血モデルにより血流変化などの測定により、細胞死の部位、症状などを定量的に計測し、診断の基準を確立する。

(2) 神経細胞死の診断法開発に関する研究

① 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(株)中央研究所）

ア. PETによるサル脳虚血時の血流計測

霊長類における脳虚血時の脳内各部位血流の継時的変化の詳細を、PETを用いて明らかにする。

イ. 画像解析法を用いた脳血管性痴呆の治療薬の開発  
脳虚血巣の病態を神経生理学的、及び生化学的に明らかにし、それに基づき、伝達物質受容体の標識化合物の画像処理によって各種治療薬の効果の判定を行う。

3. 年次計画

本プロジェクトでは、脳血管障害による神経細胞死の予防と治療を目標とする。

第I期では、海馬及び小脳におけるグルタミン酸性神経伝達に関連する分子のうち神経細胞死に関わる分子群を同定し、スナネズミ虚血モデルの他、ノックアウトマウスやトランスジェニックマウスの作成により、電気生理学的、形態学的に詳細に検討する。また細胞死に関わる細胞内情報伝達分子やプロテアーゼの作用を単一細胞レベルで研究する。さらに霊長類の虚血性神経細胞死の特性と、細胞死誘導因子やその阻害薬について研究を行い、大型の脳の特徴を生かしPETを用いサルの虚血モデルについて細胞死関連分子の動態をしらべる。

第II期では、神経細胞死およびその防御に関わる遺伝子を小脳および海馬の神経細胞およびグリア細胞において探索し細胞死に至るカスケードを明らかにする。プロテアーゼの阻害物質の脳内注入やアデノ随伴ウイルスなどのベクターに細胞死抑制遺伝子を組み込み、虚血脳に発現させ防御効果をしらべ治療薬開発に役立てる。サル脳虚血モデルにより、学習記憶障害と血流変化の関連をしらべ、PETなどによる画像診断法を確立し予防や治療に役立てる。

研究項目	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					
① 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					
ア. 神経細胞死関連分子の可視化					
イ. ノックアウトマウス分子の形態解析					
② 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					
ア. グルタミン酸性シナプス伝達の修飾機構の解析					
イ. ノックアウトマウスにおけるグルタミン酸シグナル伝達に関する研究					
ウ. 虚血負荷時の小脳細胞の変化と修復機構の解析					
(2) 神経細胞死の治療法開発に関する基礎的研究					
① 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保護に関する研究					
ア. 虚血後の海馬細胞のイオンチャンネル電流の変化の解析					
イ. ノックアウトマウスの虚血による変化の解析					
ウ. アデノ随伴ウイルス発現による細胞死保護の研究					
② プロテアーゼ制御を介した神経細胞死抑制機構に関する研究					
ア. 放射性標識ペプチド投与による虚血動物における変化の解析					
イ. ペプチドの分解に関与するプロテアーゼの分子レベルの同定					
	計測システムの開発		画像処理システム設置		
				データの評価	
	計測システムの設置		データ解析		
				データ解析と評価	
	計測システムの設置		データの解析と評価		
	遺伝子変異動物の導入		データ解析と評価		
		ベクター作成	データ解析と評価		
	計測器の設置		薬物注入装置の導入		
		ライブラリー合成器設置		データ解析と評価	

研究項目	10年度	11年度	12年度	13年度	14年度
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 ① 霊長類の虚血性神経細胞死の予防と治療 ア. ニホンザルの虚血性細胞死に対する障害因子の探索とその保護 イ. 脳梗塞および血管性痴呆治療薬の開発 ウ. 神経細胞死を診断するイメージング法の確立 (2) 神経細胞死の診断法開発に関する研究 ① 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 ア. PETによるサル脳虚血時の血流計測 イ. 画像解析法を用いた脳血管性痴呆の治療薬の開発	ケージ・計測器設置	顕微鏡設置	データ解析と評価	データ評価	
所要経費(合計)	176百万円	189百万円	189百万円		

#### 4. 平成12年度における実施内容と達成目標

##### 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

① 北海道大学大学院医学系研究科生体機能構造学講座  
渡辺 雅彦

神経細胞死に関わるグルタミン酸受容体の細胞内シグナル伝達機構を金コロイド作成と超高速免疫伝研究法により明らかにする。

② 金沢大学医学部生理学第2講座 狩野 方伸

小脳の培養細胞およびスライス系を用いプルキンエ細胞に対するグルタミン酸興奮毒性を超高速細胞電位解析システムを用い解明する。

##### (2) 神経細胞死の治療法開発に関する研究

① 自治医科大学生理学第1講座 島崎久仁子

虚血後の神経細胞死に対してアデノ随伴ウイルスをベクターとして、アポトーシス抑制作用をもつ Bcl-2 等を過剰発現させ細胞死防御法を開発する。ノックアウトマウスを用い、虚血とグリア細胞の関連をしらべる。

② 理化学研究所 神経蛋白制御研究室 西道 隆臣

虚血性細胞死とβアミロイド・ペプチドの分解システムの関連を検討し、プロテアーゼ活性を阻害したトランスジェニックマウスを用い病的状態におけるプロテアーゼの役割を明らかにする。

##### 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

① 金沢大学医学部脳神経外科学講座 山嶋 哲盛

虚血負荷後のサルからレーザーマイクロ装置で海馬単一ニューロンを分離し虚血性神経細胞死に関わる特異蛋白であるカルパイン、カテプシンやカスパーゼ等の遺伝子発現を探索する。

##### (2) 神経細胞死の診断法開発に関する研究

① 浜松ホトニクス(株)中央研究所 塚田 秀夫

サルの脳虚血モデルを用い、脳の神経症状と伝達物質受容体に対する標識化合物の変化の関連をPETを用い、詳細に解析し、また各種神経細胞死抑制薬の作用機序について検討する。

## II 平成12年度における実施体制

研究項目	担当機関	研究担当者
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 ① 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 ② 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 (2) 神経細胞死の治療法開発に関する研究 ① 虚血後細胞における病態解析とベクター導入によるその保護に関する研究 ② プロテアーゼ制御を介した神経細胞死抑制機構に関する研究	北海道大学大学院医学研究科  金沢大学医学部  自治医科大学  理化学研究所	渡辺 雅彦  狩野 方伸  島崎 久仁子  西道 隆臣
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 ① 霊長類の虚血性神経細胞死の予防と治療 (2) 神経細胞死の診断法開発に関する研究 ① 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	金沢大学医学部  浜松ホトニクス(株)	山嶋 哲盛  塚田 秀夫

## III リエゾン会議

委員	所 属
○川合 述史	自治医科大学 生理学第一講座教授
狩野 方伸	金沢大学 医学部生理学第二講座教授
島崎 久仁子	自治医科大学 生理学第一講座講師
塚田 秀夫	浜松ホトニクス(株) 中央研究所専任部員
西道 隆臣	理化学研究所 神経蛋白制御研究室チームリーダー
山嶋 哲盛	金沢大学 医学部脳神経外科学講座助教授
渡辺 雅彦	北海道大学 大学院医学研究科生体機能講座教授

(注：○は研究管理統括者)