

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

老人性痴呆症は超高齢化社会を真近に迎えるわが国の医療の最重要課題の一つである。本研究は痴呆症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、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い、さらにこれに基づいた細胞死保護薬の開発を目指した研究を推進する。

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、小脳あるいは基底核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。各研究担当者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、小脳あるいは基底核細胞に起こる病変を、遺伝子変異動物との比較も加え、受容体レベルや細胞内シグナル伝達経路さらに蛋白分解酵素の活性変化をしらべる。これ

によってから細胞死に向かう分子カスケードを多角的に捉え、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（北海道大学大学院医学系研究科）

ア. グルタミン酸受容体のサブユニット NR1 と NR2A, 2C のそれぞれのノックアウトマウスおよび強制発現系を作成しシナプス発現機構とその生理的意義をしらべる。

イ. グルタミン酸受容体変異マウスについて神経細胞損傷下の脆弱性について比較検討する。

ウ. グルタミン酸受容体チャンネル複合体と細胞死に関わる機能ドメインの決定。

② 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自律神経部門）

虚血モデルおよび病態モデルマウスを用い細胞死保護作用をもつ一酸化窒素 (NO) について

ア. NO を産生する線条体ニューロンの生理的機能をパッチクランプ法および蛍光検出試薬により解析する。

イ. caged 試薬を用い NO を受けるニューロンの受容機構の解析を行う。

ウ. 細胞死保護薬の開発。

(2) 神経細胞死の治療法開発に関する基礎的研究

① ベクター利用による細胞死防御法の開発に関する研究（自治医科大学生理学講座）

ア. アデノ随伴ウイルス (AAV) を用い、アポトーシス抑制遺伝子 Bcl-2 の過剰発現によるチトクローム C, カスパーゼの変化を解析し、虚血性神経細胞壊死の防御機構をしらべる。

イ. Bcl-XL 過剰発現により Bcl-2 との差をしらべ、より有効な細胞死防御機構を探る。

ウ. 幼若動物の虚血モデルによる細胞死保護薬の開発。

② カルパ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（理化学研究所神経蛋白制御研究室）

ア. カルパイン活性を制御するカルパスタチン遺伝子の改変動物、トランスジェニックマウス、およびノックアウトマウスを作成する。

イ. 上記改変動物について、神経細胞死におけるプロテアーゼの役割を解明する。

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密接につながる研究

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要因としてカルバイン・カテプシンなどの関連分子の役割を解析する。PET による画像解析を行い、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（金沢大学医学部脳神経外科学講座）

ア. 神経細胞死におけるカルバインーカテプシン経路と Dnase II, CAD の関連について細胞内動態解析を行う。

イ. 虚血サルにおける学習記憶能と神経再生能の解析。

ウ. 虚血後の脳グングリオシド抗体の解析と臨床診断への応用。

(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. 霊長類虚血モデルを用いた PET および病理標本の比較による細胞死保護薬の評価。

イ. 霊長類とげっ歯類における虚血および再灌流後のグルタミン酸の挙動と細胞死との関連をしらべる。

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期においては、神経細胞死に関わるグルタミン酸性神経伝達に関連する分子機構について電気生理学的、形態学的に詳細に検討した。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を行った。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、PET を用いた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た。

第Ⅱ期では、第Ⅰ期における成果をさらに発展させる。神経細胞死およびその防御に関わるグルタミン酸シグナル伝達に関わる分子、遺伝子を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制御遺伝子を組み込み、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。また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	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. グルタミン酸サブユニット変異マウスの作成	← 計測システムの開発	
イ. 変異マウスの細胞死との関連の検討		← データ解析と評価
ウ. 受容体機能ドメイン決定		← データ解析と評価
② 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		
ア. NO 産生細胞の生理的機能解析	← 計測システムの設置	
イ. NO の受容機構の解析		← データ解析と評価
ウ. 細胞死保護薬の開発		← データ解析と評価
(2) 神経細胞死の治療法開発に関する基礎的研究		
① ベクター利用による細胞死防御法の開発に関する研究		
ア. アデノ随伴ウイルス発現による Bcl-2 を用いた細胞死保護の研究	← データ解析と評価	
イ. Bcl-XL を用いた細胞死保護の研究		← データ解析と評価
ウ. 幼若動物の虚血モデルによる研究		← データ解析と評価
② カルバスタチン遺伝子改変動物の作成によるカルバイン依存的神経細胞死機構の解明		
ア. カルバスタチン遺伝子の改変動物の作成	← 遺伝子変異動物の導入	

研 究 項 目	13 年 度	14 年 度
イ. 遺伝子の改変動物におけるプロテアーゼの役割を決定		← データ解析と評価 →
ウ. 遺伝子の改変動物の細胞死の関連説明		← データ解析と評価 →
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. 神経細胞死におけるカルパイン-カテプシン経路の解明	← 計測器の設置 →	
イ. 虚血サルにおける学習記憶能と神経再生能の解析	← 学習機能解析装置設置 →	
ウ. 脳ガングリオン抗体の臨床診断への応用		← データ解析と評価 →
(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. サル脳におけるPETおよび病理標本の比較	← データ解析 →	
イ. および再灌流後のグルタミン酸の動態		← データ解析と評価 →
所 要 経 費 (合 計)	189 百万円	

4. 平成13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

グルタミン酸受容体のサブユニット NR1 と NR2A, 2C のそれぞれのノックアウトマウスや強制発現マウスを作成しシナプス発現機構とその生理的意義をしらべる。

② 東京都老人総合研究所自律神経部門 青崎 敏彦
一酸化窒素 (NO) の細胞死保護機構についての細胞レベルでの解明を行う。

(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一講座 島崎久仁子
アデノ随伴ウイルス (AAV) の生体注入法を用い、アポトーシス抑制遺伝子 Bcl-2 や Bcl-XL の過剰発現による、虚血性神経細胞壊死の防御機構と細胞死防御法を開発する。

② 理化学研究所脳科学総合研究センター神経蛋白質制御研究室 西道 隆臣

カルパイン活性を制御するカルパスタチン遺伝子の改変動物、トランスジェニックマウス、およびノックアウトマウスを作成し神経細胞死におけるプロテアーゼの役割を解明する。

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
神経細胞死におけるカルパイン-カテプシン経路と Dnase II, CAD の関連について細胞内動態解析を行う。

(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
サルの虚血モデルを用いた PET および病理標本の比較による細胞死保護薬の評価を行う。また霊長類とげっ歯類における虚血および再灌流後のグルタミン酸の挙動と細胞死との関連をしらべる。

II 平成13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	北海道大学大学院医学系研究科	渡辺雅彦
② 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
(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	自治医科大学	島崎久仁子
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	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	金沢大学医学部	山嶋哲盛
(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)	塚田秀夫
3. 研究管理	自治医科大学	川合述史

III リエゾン会議

委員	所 属
○川合述史	自治医科大学 名誉教授
青崎敏彦	(助)東京都老人総合研究所 自律神経部門研究室長
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 大学院医学系研究科生体機能構造学講座教授

(注：○は研究管理統括者)