

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

研究管理統括者：川合 述史（自治医科大学）

I 試験研究の全体計画

1. 研究の趣旨

わが国における痴呆症の過半数を占めるとされている脳血管性痴呆の病態解明とその治療は超高齢化社会を迎えるわが国医療の最重要課題の一つである。本研究は痴呆症の原因となる虚血性脳血管性障害による神経細胞死に焦点をあて、その病態解明、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スナネズミ、ラットに加えて、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、ベクターによる細胞死制御の遺伝子導入による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諸因子、とくに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について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や虚血サルを用いた学習障害に対する治療効果を検討する。

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、ラットやノッ

クアウトマウスを用い、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。虚血後の海馬あるいは基底核細胞に起こる病変について、受容体サブユニット遺伝子の変化や遺伝子変異動物との比較により詳細に解析する。細胞死に向かう分子カスケードを多角的に捉え、細胞死保護作用をもつ遺伝子のベクターによる導入やプロテアーゼ遺伝子改変動物を用い細胞死の防御・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）

以下の研究を島崎リエゾン（自治医科大学）と共同で行う。

ア. 虚血負荷を与えたスナネズミにおけるグルタミン酸受容体のサブユニット遺伝子発現に関する *in situ* ハイブリダイゼーション解析。

イ. 虚血負荷に伴うスナネズミ海馬シナプスの電顕形態解析。

ウ. 虚血負荷後のグルタミン酸受容体分子局在変化に関する超高感度免疫電顕解析。

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神経回路動態研究グループ）

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）について以下の研究を行う。

ア. 線条体のNO産生ニューロンのグルタミン酸による電流特性をパッチクランプ法および蛍光検出試薬により解析し、他の細胞と比較する。

イ. 虚血負荷後のNO産生ニューロンの機能変化を調べる。

ウ. 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。

エ. 病態モデルマウス(DRPLA)における形態学的、生理学的変化を調べる。

(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. 神経細胞およびグリア細胞選択的なベクターの開発により、細胞死防御のための遺伝子導入法の効率化を目指す。

イ. 虚血耐性関連分子のRT-PCRによる発現変化の解析を行う。

ウ. 虚血脳に抗アポトーシス遺伝子および神経栄養因子

の同時発現による細胞死抑制効果の検討を行う。

エ. 遅発性神経細胞死過程でのグルタミン酸受容体サブユニットの変化を解析する。

オ. 虚血耐性獲得海馬細胞の生理的变化を調べる。

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（理化学研究所脳科学総合研究センター）

ア. カルパスタチン遺伝子ノックアウトマウスについて、ノックアウト ES 細胞の胚への導入、キメラマウスの作成ノックアウトマウスの作成の手順により行う。

イ. ES 細胞をホモ化して細胞レベルでのカルパイン・カルパスタチンの機能を解析する。

ウ. 確立した遺伝子改変動物を用い、*in vivo* の神経細胞死モデルにおけるプロテアーゼの役割を検討する。

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パイン・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（金沢大学大学院医学系研究科）

ア. 脳虚血負荷後のサルの学習障害を数量化し、カテプシン阻害剤による治療効果について判定する。

イ. 虚血後サル海馬の歯状回における神経細胞の再生機構をセルライン化して生化学的に解析する。

ウ. 虚血動物を用いカスパーゼや CAD に対するカテプシンの役割を決定する。

(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. 光照射による血栓作成法（PIT）を用いた細胞死保護薬の評価。

イ. 霊長類における虚血後のアセチルコリン・ドパミン系の機能的変化を PET を用い測定し、治療薬の評価を行う。この研究は山嶋リエゾン（金沢大学）と共同で行う。

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。

プロジェクトの最終年度にあたる平成 14 年度においては従来の成果をさらに発展させたグループ間の共同研究を積極的に行う。虚血性神経細胞死についてグルタミン酸受容体サブユニット遺伝子の変化、細胞死保護に関わる一酸化窒素の役割、あるいは細胞死に至るカスケードを明らかにする。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、また細胞死に関わるプロテアーゼの遺伝子ノックアウトマウスを用い治療薬開発に役立てる。一方サル脳虚血モデルにより、学習記憶障害と細胞死保護薬の評価やシグナル伝達と血流変化の関連をしらべる。また虚血後の海馬における細胞再生機構をしらべ、血管性障害の予防や治療に役立てる。

研 究 項 目	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. 虚血スナネズミにおけるグルタミン酸受容体のサブユニット遺伝子発現に関する <i>in situ</i> ハイブリダイゼーション解析。 イ. 虚血負荷に伴うスナネズミ海馬シナプスの電顕解析。 ウ. 虚血負荷後のグルタミン酸受容体分子局在変化に関する超高感度免疫電顕解析。 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. 線条体の NO 産生ニューロンのグルタミン酸による電流特性をパッチクランプ法および蛍光検出試薬により解析し他の細胞と比較する。 イ. 虚血負荷後の NO 産生ニューロンの機能変化を調べる。 ウ. 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。 エ. 病態モデルマウス(DRPLA)における形態学的、生理学的変化を調べる。	データ解析と評価 データ解析と評価 データ解析と評価 データ解析と評価 データ解析と評価 データ解析と評価 データ解析と評価

研 究 項 目	14 年 度
<p>(2) 神経細胞死の治療法開発に関する基礎的研究</p> <p>① ベクター利用による細胞死防御法に関する研究</p> <p>ア. 神経細胞およびグリア細胞選択的なベクターの開発により、細胞死防御のための遺伝子導入法の効率化を目指す。</p> <p>イ. 虚血耐性関連分子の RT-PCR による発現変化の解析を行う。</p> <p>ウ. 抗アポトーシス遺伝子および神経栄養因子の同時発現による細胞死抑制効果の検討。</p> <p>エ. 遅発性神経細胞死過程でのグルタミン酸受容体サブユニットの変化の解析。</p> <p>オ. 虚血耐性獲得海馬細胞の生理的变化。</p> <p>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性神経細胞死機構の解明</p> <p>ア. カルパスタチン遺伝子ノックアウトマウスについて、ノックアウト ES 細胞の胚への導入、キメラマウスの作成、ノックアウトマウスの作成の手順により行う。</p> <p>イ. ES 細胞をホモ化して細胞レベルでのカルパイン・カルパスタチンの機能を解析する。</p> <p>ウ. 確立した遺伝子改変動物を用い、<i>in vivo</i> の神経細胞死モデルにおけるプロテアーゼの役割を検討する。</p> <p>2. 霊長類の「神経細胞死」に関する研究</p> <p>(1) 神経細胞死の治療法開発に関する研究</p> <p>① 霊長類に特異的な虚血性神経細胞死の予防と治療</p> <p>ア. 脳虚血負荷後のサル学習障害を数量化し、カテプシン阻害剤による治療効果について判定する。</p> <p>イ. 虚血後サル海馬の歯状回における神経細胞の再生機構をセルライン化して生化学的に解析する。</p> <p>ウ. 虚血動物を用いカスパーゼや CAD に対するカテプシンの役割を決定する。神経細胞死におけるカルパイン-カテプシン経路の解明</p> <p>(2) 神経細胞死の診断法開発に関する研究</p> <p>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</p> <p>ア. 光照射による血栓作成法 (PIT) を用いた細胞死保護薬の評価。</p> <p>イ. 霊長類における虚血後のアセチルコリン・ドパミン系の機能的変化を PET を用い測定し、治療薬の評価を行う。</p>	<p>ベクターの開発</p> <p>データ解析と評価</p> <p>データ解析と評価</p> <p>データ解析と評価</p> <p>データ解析と評価</p> <p>データ解析と評価</p> <p>データ解析と評価</p> <p>データ解析と評価</p> <p>データ解析と評価</p> <p>データ解析と評価</p> <p>データ解析と評価</p> <p>計測器の設置</p> <p>データ解析と評価</p> <p>データ解析と評価</p> <p>データ解析と評価</p> <p>データ解析と評価</p>
<p>所 要 経 費 (合 計)</p>	<p>179 百万円</p>

4. 平成14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

虚血後スナネズミにおけるグルタミン酸受容体遺伝子発現を免疫学的、形態学的にしらべ、細胞死との関連を明らかにする。

② 東京都老人総合研究所神経回路動態研究グループ 青崎 敏彦

虚血性神経細胞死における一酸化窒素（NO）の細胞死保護機構について電気生理学、光学的手法により細胞レベルにおける解明を行う。

(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

遺伝子導入による細胞死保護を目指し、有効なベクターの利用による虚血性神経細胞死の防御法を開発する。また

虚血耐性機構について関連遺伝子を検索する。

② 理化学研究所脳科学総合研究センター神経蛋白制御研究室 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ノックアウトマウスを作成し *in vivo* 動物の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 金沢大学大学院医学系研究科脳医科学専攻脳病態医学講座 山嶋 哲盛

虚血後サル海馬の歯状回における神経細胞の再生機構を解明し、治療法の開発に役立てる。またサルの学習障害に対するカテプシン阻害剤による治療効果を判定する。

(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

光照射による脳血栓モデルを用い、細胞死保護薬の評価を行う。

II 平成14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 ベクター利用による細胞死防御法の開発に関する研究	文部科学省研究振興局自治医科大学	島崎 久仁子
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	文部科学省研究振興局理化学研究所	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 霊長類に特異的な虚血性神経細胞死の予防と治療	金沢大学大学院医学系研究科	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 神経回路動態研究グループ グループリーダー
島 崎 久仁子	自治医科大学 生理学講座 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 大学院医学系研究科脳医科学専攻脳病態医学講座 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)