

氏名(本籍) 良田 雅紀 (和歌山県)  
学位の種類 博士(医学)  
学位記番号 博士第428号  
学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当  
学位授与年月日 平成15年3月27日  
学位論文題目 **Primate neurons show different vulnerability to transient ischemia and response to cathepsin inhibition**  
(カテプシン阻害剤による霊長類脳の保護効果)

審査委員 主査 教授 陣内 皓之祐  
副査 教授 鳥居 隆三  
副査 教授 村田 喜代史

## 論文内容要旨

### 【目的】

一過性脳虚血を負荷すると、海馬のCA1ニューロンが数日かかって死んでゆくことは、砂ネズミからヒトに至るまでよく知られている。この神経細胞死は虚血負荷後緩除におきるため、そのメカニズムを検索するのに十分な時間的余裕があり、格好の検索対象となる。したがって、この20年間に非常に多くの研究がなされてきたが、その分子メカニズムに関しては依然として不明な点が多い。

すなわち、同一の虚血刺激を受けているにもかかわらずなぜ特定部位のニューロンのみが脆弱性を示すのか、なぜすぐに死なずにゆっくりと死んでゆくのか、および、その死にはアポトーシス、ネクローシスのいずれかによるのか等の疑問に対する完璧な解答は誰もできないのが現状である。近年Yamashimaらは、虚血負荷中の細胞内Caイオンの上昇によってカルパインが活性化し、活性型のカルパインがリソソーム内のカテプシンを放出させ、これが細胞構成タンパクの異常分解を惹起し神経細胞死を惹起すると報告した。しかし、海馬以外の脳の各部位の神経細胞に関しては、詳細な研究はなされていない。

本研究では、サルの一過性脳虚血モデルを用いて、海馬の錐体細胞のみならず、小脳のプルキンエ細胞、尾状核、被殻外側、および皮質のⅢ層、V層の神経細胞に対して、虚血性神経細胞死の程度を比較検討し、同時にカテプシンB、Lの阻害剤であるCA-074やE64cを用いてそれぞれの神経保護効果を調べた。

### 【方法】

体重5 kg～9 kgのニホンザル (*Macaca fuscata*) 15頭を用い、ハロセンにより緩徐に麻酔導入し、全身麻酔(1%ハロセン、60%笑気、40%酸素)下に開胸術を行った。具体的には、縦隔内に進入し直視下に大動脈弓より分岐直後の左鎖骨下動脈と無名動脈を剥離後、血管クリップにより20分間血流を完全に遮断した。虚血実験後のサルは3群に分け、5頭は治療なしのコントロールとし、5頭はCA-074、5頭はE64c、それぞれ4 mg/kgのカテプシン阻害剤の静脈内注射を虚血解除後に行った。また、術中は直腸温をモニターし、体温を一定に保った。

虚血実験の5日後、再度全身麻酔下で開胸し脱血後、左心室より4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定を1時間かけて行った。その後、開頭により脳を摘出し全脳切片を作製した。標本はパラフィンに包埋した後4 μmの全脳薄切切片を作製し、H. E. 染色を施した。1頭につき海馬CA1～CA4の各領域、小脳、尾状核、被殻外側、および大脳皮質Ⅲ層、V層の計9ヶ所を写真撮影し、正常な神経細胞の数と異常な神経細胞の数を数えると共に、虚血による神経細胞の形態変化を観察した。

### 【結果】

完全な細胞死ではあるが細胞の残渣が残っている神経細胞はいうまでもなく、細胞の萎縮が著明で、エオジン好性でニッスル小体のみられない、濃縮した核を示す変性神経細胞は細胞死と判定した。エオジン好性の神経細胞はCA1に多数みられたが、皮質のⅢ層や被殻外側を含む全脳にも多少認められた。しかし、脳全体を通してクロマチンの点状の濃縮像は認められたが、いわゆるアポトーシス小体は全く認められなかった。一方、阻害剤を投与した場合、下記のように有為な神経細胞死の抑制効果がみられた。C

A-074はCA1神経細胞や小脳のプルキンエ細胞を有為に保護しており、E64cはこれらの神経細胞はもちろん脳全体の神経細胞を有為に保護していた。各群の残存神経細胞の計測結果は以下のとおりであった。

無治療コントロール群：

CA1 2.0%，CA2 16.2%，CA3 24.3%，CA4 35.3%，小脳28.3%，大脳皮質Ⅲ層37.8%，V層34.1%，尾状核55.8%，被殻外側44.1%

CA074投与群

CA1 47.4%，CA2 53.0%，CA3 60.3%，CA4 77.3%，小脳85.6%，大脳皮質Ⅲ層67.7%，V層65.9%，尾状核89.8%，被殻外側87.7%

E64c投与群

CA1 80.1%，CA2 83.6%，CA3 79.6%，CA4 88.6%，小脳91.6%，大脳皮質Ⅲ層75.5%，V層75.0%，尾状核86.1%，被殻外側81.3%

### 【考 察】

神経細胞はレセプターやチャンネル、細胞骨格等を構成する多種多様の蛋白からなり、神経伝達物質を産生している。これらのターンオーバーやリサイクルおよびプロセッシング等には、当然、リソソーム酵素の関与が不可欠である。リソソームにはシステインプロテアーゼであるカテプシンB、Lやアスパラギン酸プロテアーゼであるカテプシンDおよびDNAエンドヌクレアーゼであるDNase IIなど、多数のプロテアーゼが含まれているが、神経細胞死におけるこれらのプロテアーゼの関与に関してはごく最近まで全く不明であった。

霊長類の海馬CA1ニューロンの選択的脆弱性は、脳虚血によりカルシウムイオンが異常な上昇をきたすこと、これが2次的にカルパインを活性化すること、さらに、この活性型カルパインがカテプシンのリソソーム外への放出を惹起するために構成蛋白を破壊してしまうことの3段階で発生する。Yamashimaraが提唱したこの「カルパイン-カテプシン仮説」は、最近、線虫の神経細胞変性モデルにおいても確認され (Syntichiki et al., Nature 419: 939-944, '02)、カルパインとカテプシンが関与する種を越えたネクロシスのカスケードが存在するものと思われる。

CA-074やE64c等のエポキシコハク酸がカテプシンの酵素活性を阻害するのは、カテプシンの活性中心にあるシステイン残基のチオール基 (-SH) にエポキシ基が結合するためである。今回の実験ではカテプシンBの特異的阻害剤であるCA-074を投与した場合、形態学的に異常のない細胞の率が各部位で47.4%~89.8%にまで増加し、カテプシンB、Lおよびカルパインの阻害剤であるE64cを投与した場合は75.0%~91.6%にまで増加した。最近、カスベースのインヒビターが基質としているのは、カテプシンBであるという報告があり、カテプシンBが神経細胞死に重要な役割を果たしている可能性が高い。

### 【結 論】

霊長類の虚血性神経細胞死はカルパインとカテプシンという二つのシステインプロテアーゼが関与するネクロシスであるとされる。本研究においては、カテプシンB、Lないしカルパインの阻害剤であるCA-074とE64cには、海馬のみならず、虚血に脆弱といわれている脳の各部分の神経細胞を保護する作用があることが明かになった。今後、これらのカテプシン阻害剤は臨床的に脳硬塞の急性期治療に応用できる可能性がある。

## 学位論文審査の結果の要旨

本研究はCaイオン-カルパイン-カテプシンのカスケードが霊長類の虚血性神経細胞死の過程に深く関与するとの仮説に基づき、日本ザルの全脳虚血に対する海馬、小脳、皮質Ⅲ層、皮質V層、尾状核、被殻外側（日本ザル以外の脳で脆弱とされている）の脆弱性の違い、及びリソソームのプロテアーゼであるカテプシンのインヒビターCA074及びE64-cの脳各部に対する神経保護効果について検討したものである。結果は、

- 1) 霊長類においても海馬CA1が最も脆弱であった。その他の部位も脆弱性を示したが、その中では尾状核が最も抵抗性であった。
- 2) CA074とE64-cはともに、海馬CA1のみならず全ての検討部位において神経保護効果を示した。
- 3) CA074の神経保護効果はE64-cよりも弱いが顕著なものであった。

本研究は虚血性神経細胞死とリソソームの酵素の関連性を明らかにし、虚血性神経細胞死の治療において新たな薬品の開発の可能性を提供するものと云え博士（医学）の授与に値するものと判定された。

なお申請者は、平成15年2月4日の学位論文審査と試問を受け合格と認められたものである。