

平成15年度自治医科大学大学院 研究奨励賞研究成果報告

サル ES 細胞由来神経幹細胞を用いた疾患モデル動物への移植治療

地域医療学系 精神・神経・筋骨格疾患学
4 学年 永田三保子

黒質ドパミン細胞の変性によるパーキンソン病は慢性進行性疾患であり、L-ドーパなどの治療薬で改善が見られるが長期にわたると薬効の減弱や副作用が出現し未だ根治治療はない。マウス ES 細胞 (embryonic stem cell) からドパミン細胞を分化させ、パーキンソン病モデルラットの線条体に移植し症状が改善した例が報告されている。しかし今後目指すのはヒト ES 細胞を用いたヒトへの移植治療であるため、ヒト ES 細胞とほぼ同じ性質を示すカニクイザル ES 細胞を用いて、神経幹細胞への分化誘導およびパーキンソン病モデルサルへの移植治療を試みた。

今回 conditioned medium を工夫した培地条件により分化させ、神経幹細胞のマーカーである nestin 陽性細胞が 99.5% 出現した。また培養を継続すると分化が進み neurofilament 陽性細胞が多数見られ、うちドパミン細胞のマーカーである tyrosine hydroxylase (TH) 陽性細胞は 70% と高率であった。1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine を毎週静脈内投与したカニクイザルのパーキンソン症状が 2 ヶ月間安定したのち、サル ES 細胞由来神経幹細胞 (total 1×10^5 個) を定位脳手術により左被殻へ注入した。移植細胞にはマーカーとして green fluorescent protein (GFP) 遺伝子を導入した。

Positron emission tomography (PET) にて [^{11}C] L-Dopa および [^{11}C] β -CFT/DAT (dopamine transporter) の測定を 12 週間行ったところ、左線条体で両者の取り込みが増大していた。またドパミン受容体の antagonist である [^{11}C] raclopride は、ドパミン神経終末から

ドパミンを放出させる amphetamine を注入後、左線条体で binding potential が低下していた。組織染色では左線条体で TH 陽性細胞が見られこの細胞は GFP も陽性であった。行動解析では scale 上わずかではあるが改善が見られた。以上から神経幹細胞が脳内でドパミン細胞に分化し、ドパミンの放出が起きたと考えられる。ドナーソースとして多能性幹細胞である ES 細胞を用いた細胞移植治療は今後有用である。

静脈麻酔薬の作用メカニズムにおける NMDA 受容体の関与

地域医療学系 麻酔・救急・集中治療医学
佐藤 友紀

全身麻酔薬は、電気生理学的解析や身体反応から、興奮性全身麻酔薬 (ケタミン、亜酸化窒素、キセノンなど) と抑制性全身麻酔薬 (ペントバルビタール、ジアゼパム、プロポフォール、ハロタン、セボフルランなど) に分類されると考えられている。さらに最近、神経伝達物質の受容体レベルの研究が進み、全身麻酔薬の作動部位としては主に GABA_A 受容体や NMDA 受容体が想定されている。今回、興奮性全身麻酔薬は NMDA 受容体に、抑制性全身麻酔薬は GABA_A 受容体にそれぞれ関与しているとの仮説のもとに、NMDA 受容体の関与を時間薬理を含めて NMDA 受容体 $\epsilon 1$ サブユニットノックアウト (KO) マウスを用いて、*in vivo* レベルで解析を行った。

ケタミンの正常マウスにおける麻酔効果はサーカディアンリズムを示すが、NMDA 受容体 $\epsilon 1$ サブユニット KO マウスにおいては時間薬理学的効果が消失し、いずれの時間帯においても正常マウスに比べ麻酔効果は減弱していた^{1,2}。正常マウスではケタミンの投与時刻によって血中濃度の推移に相違が認められないことから、この結果は時間帯による NMDA 受容

体の感受性の相違によるものと考えられた¹。次に、亜酸化窒素とセボフルレンの麻酔効果を正常マウスと KO マウスで比較したところ、セボフルレンの作用には相違が認められなかったが、亜酸化窒素の作用は用量依存性に KO マウスで減弱し、亜酸化窒素の麻酔作用の一部が NMDA 受容体を介していることが示された³。さらに、GABA_A受容体作動薬と考えられている静脈麻酔薬（ペントバルビタール、ジアゼパム、プロポフォール）の麻酔効果を正常マウスと KO マウスで比較したところ、いずれも KO マウスで効果が減弱していることが判明し⁴、興奮性麻酔薬のみならず、これらの抑制性の静脈麻酔薬も NMDA 受容体が関与していると考えられた。

これまで麻酔薬と受容体との特異性は主に *in vitro* レベルで検証されてきたが、今後は個体レベルの評価や解析が必要である。本研究ではターゲットレセプターをピンポイントでノックアウトしたマウスを用いることで、興奮性麻酔薬であるケタミン、亜酸化窒素のみならず、従来抑制性麻酔薬として分類されている静脈麻酔薬の麻酔作用が一部 *in vivo* レベルで NMDA 受容体 $\epsilon 1$ サブユニットを介することが示唆された。

1. Sato Y, Kobayashi E, Hakamata Y, et al.: Chronopharmacological studies of ketamine in normal and NMDA epsilon1 receptor knockout mice. *Br J Anaesth* 2004; 92: 859-64
2. Sato Y, Kobayashi E, Hakamata Y, et al.: Dosing time-dependent effect of ketamine in mice and abrogation in NMDA receptor epsilon1 subunit knockout mice, American Society of Anesthesiologists 2003 Annual Meeting. San Francisco, California, 2003
3. Sato Y, Sato A, Murayama T, et al.: Effect of targeted NMDA receptor epsilon1 subunit gene disruption on nitrous oxide anesthesia in mice, American Society of Anesthesiologists 2004 Annual Meeting. Las Vegas, Nevada, 2004

4. Sato Y, Wainai T, Murayama T, et al.: Contribution of NMDA receptor epsilon1 subunit to anesthetic effect of GABAergic agents in mice, 27th Congress of the Scandinavian Society of Anaesthesiology and Intensive Care Medicine. Helsinki, Finland, 2003

霊長類の小脳による随意眼球運動制御の神経機構の解明

地域医療学系 精神・神経・筋骨格疾患学
4 学年 平松 敬人

I 目的

小脳と大脳の共同作用で制御される随意運動発現のメカニズムは現在の脳研究の主要なテーマの一つである。我々はカニクイザルを用いて随意眼球運動に関与する神経回路を同定するため、眼球運動反射に関与する小脳片葉に隣接する傍片葉岩様小葉 (LP) と眼球運動関連大脳領域との結合関係を調べたところ、LP は対側頭頂葉視覚連合野 (MT/MST 野) と橋核を經由した結合関係が存在し、かつ小脳中位核と歯状核の眼球運動関連領域に出力することが明らかとなり、LP が視覚性随意眼球運動に関与することが示唆された。本研究では、LP を損傷し随意眼球運動への影響を調べた。

II 方法

3 頭の日本猿 (C,N,E) を用いた。サッケード眼球運動と滑動性追跡眼球運動を同時測定するために、視標をステップランプ状に動かした。また滑動性追跡眼球運動の適応パラダイムを用いて運動学習を評価した。

損傷は一側 LP にイボテン酸溶液を注入し行った。損傷後は経時的に計測を行い、損傷前値と比較し影響を評価した。生理実験終了後、脳を灌流固定し組織学的に損傷部位を同定した。

III 結果

損傷側 LP は 3 例とも組織学的に損傷が確認された。

A 滑動性追跡眼球運動への影響