

氏 名 (本籍) 立 川 正 憲

学 位 の 種 類 博 士 (薬 学)

学 位 記 番 号 薬 博 第 3 6 1 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 1 7 年 3 月 2 5 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当

研 究 科 、 専 攻 東 北 大 学 大 学 院 薬 学 研 究 科
(博士課程) 医療薬科学専攻

学 位 論 文 題 目 クレアチン及び脂質の脳内動態における脳関門、
グリア、ニューロンの役割

論 文 審 査 委 員 (主 査) 教 授 寺 崎 哲 也

教 授 福 永 浩 司

教 授 中 畑 則 道

論文内容要旨

【目的】 脳内エネルギーや脂質環境の恒常性維持はニューロンの発達や機能発現に必須であり、脳関門やグリアが支援的役割を担っている。クレアチンはクレアチンキナーゼ (CK) を介して脳内エネルギーの貯蔵・再生に重要な役割を果たしている。脳内クレアチンが著しく低下する creatine deficiency syndrome (CDS) の患者ではミエリン形成遅延や精神運動発達障害、てんかん発作などの神経異常症状が認められ、その原因遺伝子としてクレアチン合成酵素 (GAMT) やクレアチントランスポーター (CRT) が同定されている。脳内ではGAMT mRNAが発現する一方、CRT mRNAは血液脳関門 (BBB) に発現しないとの報告から、脳内クレアチンは脳細胞自身での生合成によって維持されていると考えられてきた。しかし、GAMTを欠損したCDSではクレアチン経口投与で脳内クレアチンレベルが回復するが、CRTを欠損したCDSでは回復しないという臨床知見と矛盾するなどクレアチン供給経路を含む脳内エネルギー貯蔵系の分子機構には不明な点が多い。

ATP-binding cassette トランスポーター A 及び G サブファミリー (ABCA、ABCG) は、近年脂質代謝異常疾患との関連性が報告され体内の脂質動態を決定する鍵分子であると考えられている。従って、脳内脂質環境の維持機構を解明する上で ABCA 及び ABCG を介した脳内脂質輸送の分子機構を明らかにすることは重要である。そこで本研究では、脳関門を介した循環血中から脳へのクレアチン供給機構と脳からの代謝物クレアチニン排出機構及び GAMT と CK の脳内細胞発現を明らかにすると共に、ABCA、ABCG の網羅的な脳内発現分布解析によって、脳内クレアチン供給・利用、クレアチニン排出及び脂質輸送の細胞及び分子基盤を解明することを目的とした。

【方法】 BBB を介したクレアチン供給機構の解析には、*in vivo* integration plot 法及び *in vitro* BBB モデルとして条件的不死化マウス脳毛細血管内皮細胞株 (TM-BBB4) を用いた。BBB 及び血液脳脊髄液関門 (BCSFB) を介したクレアチニン排出輸送解析には、Brain Efflux Index (BEI) 法、脳室内投与法及び単離脈絡叢を用いた。脳内における遺伝子発現解析は、Northern blot 法及び *in situ* hybridization 法を用いた。タンパク質の脳内発現は、蛍光抗体法、酵素抗体法及び免疫電子顕微鏡法を用いて解析した。

【結果・考察】 BBB を介した循環血中から脳へのクレアチン輸送の分子機構 循環血中に投与した [¹⁴C] クレアチンは非常に遅い速度 (1.61 μ l / (min \cdot g brain)) で脳実質内に輸送された。また、 [¹⁴C] クレアチン投与 24 時間後の大脳対血漿中及び小脳対血漿中のクレアチン濃度比はそれぞれ 30.8、35.1 mL / g tissue であり、マウスにおける内因的な脳対血漿中クレアチン濃度比と近似した。TM-BBB4 細胞における [¹⁴C] クレアチンの取り込みは、Na⁺、Cl⁻ 及び濃度依存的 (K_m : 16.2 μ M、V_{max} : 1.05 nmol / (mg protein \cdot 10min)) であり、CRT の特異的阻害剤である β -guanidinopropionate 及び guanidinoacetate でそれぞれ 95.5%、69.8% 有意に阻害された。Northern blot 解析から、TM-BBB4 細胞及び単離脳毛細血管において、CRT mRNA を検出した。さらに、ウサギ抗 CRT 抗体を作製し免疫組織化学染色を行った結果、CRT タンパク質は脳毛細血管に高発現し、ニューロンの細胞体にも発現が認められた。免疫電子顕微鏡法を用いた解析から、脳毛細血管内皮細胞における CRT の局在は血液側及び脳側細胞膜の両方に認められた。以上の結果から、BBB は CRT

を発現し、脳内レベルを維持するのに十分なクレアチンを循環血中から脳へ供給する機能を有していることが示唆された。

脳関門を介した脳からのクレアチニン排出輸送機構 BBBを介した ^3H クレアチニンの脳内からの時間依存的な排出は少なくとも60分まで示されなかった。脳室内に投与した ^3H クレアチニンは半減期6.1分で脳脊髄液中から消失し、見かけの消失クリアランス ($86.1 \mu\text{l} / \text{min}$) は脳脊髄液のbulk flowを表す ^{14}C イヌリンと比較して59倍速かった。さらに単離脈絡叢における ^3H クレアチニンの取り込みは、少なくとも2分まで時間依存的に増加し見かけ上脈絡叢内容積の2.9倍濃縮的であった。以上の結果から、脳内で生成されるクレアチニンはBCSFBを介して脳から排出輸送されることが示唆された。

GAMTの脳内発現細胞と局在 GAMT mRNAは、灰白質及び白質両方に発現し、特に白質で高い発現が検出された。GAMTタンパク質は、オリゴデンドロサイト、嗅神経被覆グリア及びアストロサイトで豊富に発現する一方で、ニューロンでの発現は極めて微弱だった。小脳皮質では、GAMTはバグマングリア細胞に高発現する一方でプルキンエ細胞や介在性ニューロンでの発現は微弱であった。免疫電子顕微鏡を用いた解析から、GAMTの免疫反応はプルキンエ細胞の棘突起には検出されず、そのシナプスを被覆するバグマングリアの突起に局在していた。以上の結果から、グリア細胞は、脳内でクレアチン合成を担う中心的な細胞であり、ニューロンにおけるクレアチン合成能は低いことが示唆された。

CKの脳内発現細胞と局在 CKには4つのサブタイプが同定されているが、脳内にはubiquitous mitochondrial CK (uCK-Mi) mRNAが灰白質選択的に、cytoplasmic brain-type CK (CK-B) mRNAが灰白質と白質両方に発現していた。uCK-Miタンパク質の発現は、ニューロン選択的であった。免疫電子顕微鏡法を用いた解析の結果、uCK-Miは細胞体、樹状突起、棘突起、軸索、終末などニューロン構成要素のミトコンドリアに局在する一方で、グリア細胞のミトコンドリアには局在していなかった。CK-Bタンパク質は、急性のエネルギー損失に対し抵抗性を示すことが知られているアストロサイトと抑制性ニューロンに高発現していた。以上の結果から、CKシステムはニューロン及びアストロサイトで機能していることが示唆された。

ABCA及びABCGの脳内発現プロファイル *In situ hybridization*法を用いて、脂質輸送への関与が報告されているABCA1 - 4、7及びABCG1、2、4、5、8 mRNAのマウス発達脳及び成熟脳における発現プロファイルを解析した。その結果、ABCA及びABCGは多様な脳内発現パターンを示した。胎生期の脳では、ABCA1及びA7は主として脳室層に分布する一方、ABCA2、A3及びG4は外套層に分布していた。生後脳において、ABCA1は灰白質及び白質両方に分布するほか、脈絡叢にも高発現していた。ABCA2は、生後第1週まで主として灰白質に分布したのに加え、生後14日の白質に顕著な発現上昇が検出された。一方で、ABCA3は主に灰白質に分布していた。ABCA4は、発達段階を通して脈絡叢に選択的に発現していた。ABCG1は、灰白質及び白質両方に分布したのに対し、ABCG4は主に灰白質において発現分布していた。さらに、ABCG2は発達段階を通して脳全体に均一に分布していた。ABCG2に対する特異抗体を作製して免疫組織化学染色を行った結果、ABCG2タンパク質は脳毛細血管内皮細胞の血液側細胞膜に局在するほか、脈絡叢上皮細胞の脳脊髄液側細胞膜にも局在していた。ABCG5及びABCG8は、脳内において特異的

なシグナルは検出されなかった。以上の結果から下表に示すABCA及びABCGトランスポーターの細胞発現が推定された。

ニューロン	ABCA2、ABCA3、ABCG4
アストロサイト	ABCA1
オリゴデンドロサイト	ABCA2
脳毛細血管内皮細胞	ABCG2
脈絡叢	ABCA1、ABCA4、ABCG2

表 *In situ* hybridization 解析から推定されるABCA及びABCGトランスポーターの脳内細胞発現

【結論】 脳内クレアチンの供給・利用及び脳からのクレアチニン排出の細胞・分子機構を図に示した。本研究からBBBはCRTを発現し脳への主なクレアチン供給経路として機能するのに加え、BCSFBは脳からの代謝物クレアチニン排出経路として機能するという脳関門の生理機能が明らかになった。また、脳内ではグリア細胞が主にクレアチン合成能を有し、近傍ニューロンのCKシステムに局所でクレアチンを供給している可能性が示された。さらに、ABCA及びABCGは脳関門・グリア及びニューロンに発現を分担して脂質輸送に関与し、脳内脂質環境を維持していることが示唆された。今後、ABCA及びABCGの細胞発現に基づいた生理機能解明が期待される。

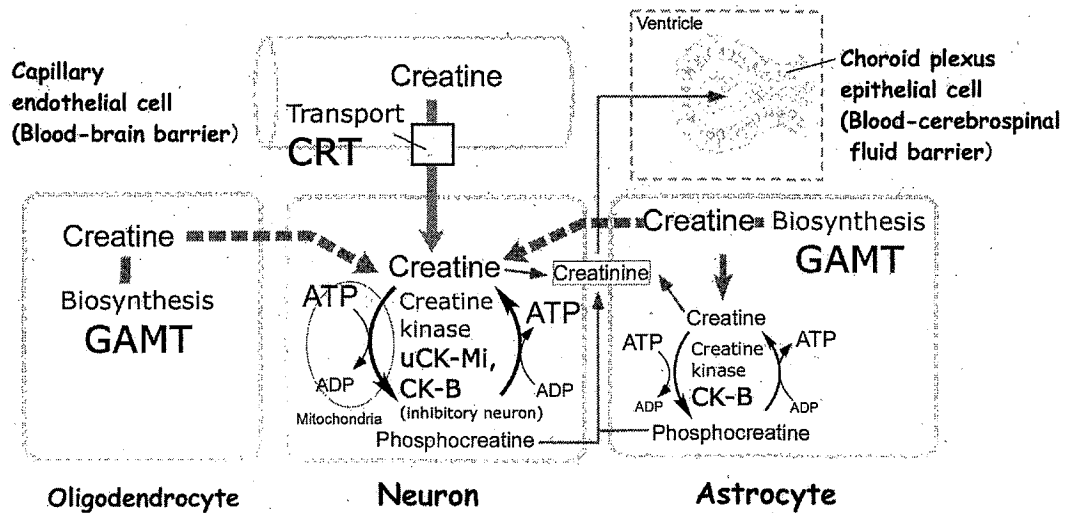


図 脳内エネルギー貯蔵系における脳関門、グリア、ニューロンの役割分担

審査結果の要旨

脳内エネルギーや脂質代謝機能の異常は脳の老化や神経変性疾患の原因の一つと考えられており、その維持機構の解明は重要である。本論文は、クレアチンキナーゼ (CK) を介して行われる脳内エネルギー貯蔵系及び体内脂質動態の支配要因である ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターA及びGサブファミリー (ABCA、ABCG) を介した脳内脂質輸送系について、免疫組織化学的・速度論的観点から脳内クレアチン供給・利用、代謝物クレアチニンの排出及び脂質輸送の分子機構と脳関門・グリアとニューロンの役割分担を解明することを目的とした。脳への主なクレアチン供給機構として血液脳関門はクレアチントランスポーター (CRT) を発現し、脳内レベルを維持するのに十分なクレアチンを循環血中から脳へ供給する機能を有していることが示された。一方、脳内で生成されるクレアチニンは主として血液脳脊髄液関門を介して脳から排出輸送されることが示唆された。クレアチン合成酵素である GAMT タンパク質は、オリゴデンドロサイト及びアストロサイトで豊富に発現する一方で、ニューロンの発現は極めて微弱であった。従って、グリア細胞が脳内クレアチン合成の中心的細胞で、ニューロンにおけるクレアチン合成能は低いことが示唆された。脳内に発現する CK のうち、ubiquitous mitochondrial CK (uCK-Mi) タンパク質はニューロン構成要素のミトコンドリアに選択的に局在する一方で、cytoplasmic brain-type CK (CK-B) タンパク質は急性のエネルギー損失に対し抵抗性を示すことが知られているアストロサイトと抑制性ニューロンに高発現していた。従って、脳内の CK システムはニューロン及びアストロサイトで機能していることが示唆された。さらに、*In situ* hybridization 法を用いて ABCA1-4、7 及び ABCG1、2、4、5、8 mRNA のマウス発達脳及び成熟脳における発現プロファイルを解析し、脳関門・グリア及びニューロンに発現するサブタイプを同定した。ABCA 及び ABCG は脳関門・グリア及びニューロン間で発現が分かれており、脳内脂質環境維持の役割分担の可能性が示唆された。

従来の説と異なり本研究は、「血液脳関門に CRT が発現し脳内クレアチンの主な供給経路として機能するという脳内クレアチンの維持機構」を提唱すると共に、脳内クレアチン生合成、利用及び代謝物クレアチニンの排出という多角的観点から脳内エネルギー貯蔵系の分子機構を解明した。さらに、ABCA 及び ABCG の発現細胞の同定は脂質の脳内動態に果たす輸送系の生理的役割解明に突破口を開くことが期待される。脳内エネルギー及び脂質代謝研究において有用な知見を見出したものとして高く評価できる。

よって、本論文は博士(薬学)の学位論文として合格と認める。