

氏名(本籍)	こまつけいじ 小松敬知
学位の種類	薬学博士
学位記番号	薬第268号
学位授与年月日	昭和62年3月11日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当

学位論文題目 遺伝性筋ジストロフィーマウスの成因と治療に関する薬理学的基礎研究

(主査)

論文審査委員 教授 佐藤 進 教授 曳野 宏
教授 鈴木 康 男

論 文 内 容 要 旨

筋ジストロフィー症は、主に骨格筋が選択的に、進行性に破壊される遺伝性筋疾患である。その成因はまだ十分に解明されておらず、また、有効な治療法も確立されていない。本疾患は、筋原性と考えられてきたが、近年、筋を支配する神経側に病因のある神経原性である可能性が示唆されている。筋の正常な成長や機能の維持に神経が重要な役割を担っていることが示唆されている。神経の興奮伝導以外のそのような筋の正常機能を維持する作用は、一般に「神経の筋に及ぼす栄養的支配」と呼ばれている。従って、筋ジストロフィー症の成因を知る上で、神経の栄養的支配を検討することは重要であると思われる。しかし、神経の栄養的支配の本態や機序についてはまだ十分に解明されていない。そこで、本研究の第1編及び第2編では、筋ジストロフィー症の成因解明のための基礎的研究として、神経の栄養的支配を薬理的に解析し、また、筋ジストロフィー症の成因と神経の栄養的支配の関係を検討した。

一方、本疾患の筋変性が、筋タンパクの分解亢進に起因するのか、タンパク合成低下に起因するのか未だ明らかではないが、ジストロフィー筋では、さまざまなプロテアーゼの活性が上昇しており、同症の筋変性に何らかのプロテアーゼ変調との因果関係が示唆される。そこで、本研究の第3編では、筋ジストロフィーマウス (C57BL/6J-dy) に及ぼすチオールプロテアーゼ阻害薬のエポキシド誘導体 (E-64とE-64-d) とセリンプロテアーゼ阻害薬のキモスタチンの効果を検討した。

第1編では、神経切断を行う際に、筋に残存する神経断端の長さの異なる神経-筋標本、及び神経支配筋標本におけるアセチルコリンに対する反応性及び静止膜電位等の筋機能を比較することにより、神経より筋の機能を正常化する、いわゆる、神経の栄養的支配の機序を解析するものである。

マウス (C57BL/6J) の長趾伸筋 (extensor digitorum longus, 以下EDLと称する) で、長い神経断端 (14-16mm) を有する筋 (以下、長神経断端筋と称する) と可及的に短い神経断端筋 (2mm以下) を有する筋 (以下、短神経断端筋と称する) を用いた。除神経後、一定の時間経過後、EDL筋を摘出し上記筋機能指標を測定した。

第1章においては、神経伝達物質アセチルコリンの栄養的支配因子としての可能性の有無について検討した。予備実験で、臭化エチジウムを除神経直後1回投与すると、神経断端終末部からの自発性アセチルコリン遊離の抑制が認められた。そこで、アセチルコリンが神経の栄養的支配因子としての機能を担うものであれば、臭化エチジウムの1回投与により神経断端の栄養的支配の減弱が期待される。次の結果が得られた。1) 除神経筋のアセチルコリンに対する拘縮反応性と静止膜電位低下は、短神経断端筋に比べ長神経断端筋の方が小さかった。即ち、神経断端に、

筋の正常機能を維持する作用、いわゆる栄養的効果が認められた。2) 臭化エチジウムを除神経直後1回投与すると、神経断端終末部からの自発性のアセチルコリン遊離が抑制された。しかし、短及び長神経断端筋の上記の機能指標に変化が認められなかった。即ち、神経断端の栄養的支配がアセチルコリン遊離抑制の影響を受けないことが示された。従って、アセチルコリンが神経の栄養的支配に関与していないことが示唆された。

アセチルコリン遊離停止後、1回投与と異なりさらに臭化エチジウムを連続的に投与すると、神経のタンパク合成阻害作用に起因すると思われる神経断端の栄養的支配の減弱効果を見出した。そこで第2章では、神経の栄養的支配と神経で合成されるタンパク質との関係を知るため、神経断端の栄養的支配に及ぼす臭化エチジウムの他に、タンパク合成阻害作用を有するクロラムフェニコール、アクチノマイシンD、及びシクロヘキシミドの影響を検討し、次の結果を得た。3) ミトコンドリアのタンパク合成を阻害する臭化エチジウム、アクチノマイシンDを除神経直後から連続投与すると、神経支配筋と短神経断端筋の静止膜電位とアセチルコリンに対する拘縮反応は変化しなかったが、長神経断端筋のこれらの筋機能の変化が増強された。即ち、上記薬物に神経断端の栄養的支配に対する減弱効果が認められた。一方、細胞質のタンパク合成を阻害するシクロヘキシミドについても上記薬物と同じ方法で検討したが、長神経断端筋の上記筋機能の変化は増強されず、栄養的支配の減弱効果はシクロヘキシミドには認められなかった。即ち、神経断端の栄養的支配にミトコンドリアで合成されるタンパク質の関与していることが示唆される。そこで、この点をさらに明らかにするために、第3章において、ミトコンドリアのタンパク合成を主に翻訳段階で阻害するクロラムフェニコールとエリスロマイシン、及び同じく転写段階で阻害する臭化エチジウムとアクリジンの神経断端の栄養的支配に及ぼす影響を、静止膜電位を指標として検討し、次の結果を得た。4) 除神経後2日間上記薬物を投与した場合、長神経断端筋の静止膜電位の低下は、臭化エチジウム及びアクリジン投与に比べてクロラムフェニコール及びエリスロマイシン投与の方が大きかった。この静止膜電位低下の違いは、除神経後3日間投与した場合には認められなかった。即ち、神経断端の栄養的支配の減弱効果は、臭化エチジウム及びアクリジンに比べてクロラムフェニコール及びエリスロマイシンで早期に出現した。また、5) 神経断端のカテプシンB、L(リソゾーム酵素)活性は、神経断端の変性に伴って上昇した。神経切断後、クロラムフェニコール、及び臭化エチジウムをそれぞれ連続投与したが、神経断端のカテプシンB、L活性は、変化しなかった。即ち、3)の結果で示したミトコンドリアタンパク合成阻害薬による神経断端の栄養的支配の減弱効果は、5)の結果から神経断端の変性を介した間接的効果でないことが示唆された。これらを4)の結果とあわせて考察すると、神経の栄養的支配に神経のミトコンドリアで合成されるタンパク質が関与していることが明らかとなった。

第II編では、ジストロフィー筋と除神経筋の静止膜電位に及ぼすフェニトインの影響とこれら

両筋のアセチルコリン感受性に及ぼすクロラムフェニコールの影響を検討し、筋ジストロフィー症における筋の神経支配について考察した。C57BL/6J-dyのジストロフィーマウス (dy/dy) と同系統の正常マウス (+/+, +/dy) のEDL筋を用いた。なお、本編で用いた正常マウスの除神経筋は長神経断端筋である。次の結果を得た。1) 神経支配筋では認められないアセチルコリンに対する拘縮反応がジストロフィー筋でも正常マウスの除神経筋と同様に認められた。クロラムフェニコールを3日間連続投与するとアセチルコリン拘縮反応が増強されたが、ジストロフィー筋では、同じく3日及び7日間連続投与したが、増強されなかった。2) ジストロフィー筋の静止膜電位の低下が、正常マウスの除神経筋と同様に認められた。フェニトインを9~11日間連続投与すると、除神経筋の静止膜電位には変化が認められなかったが、ジストロフィー筋の静止膜電位に回復が認められた。3) フェニトインは、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase活性を阻害するウアバイン処理で低下した正常マウスの神経支配筋の静止膜電位に回復効果を示さなかった。4) ジストロフィーマウスの前肢筋と後肢筋の両方で、カテプシンB, L活性はジストロフィー症の現われない幼若時において顕著に上昇していた。ジストロフィー症状は、成長に伴って後肢に現われたが、前肢には現われなかった。即ち、1), 2)の結果より、ジストロフィー筋のアセチルコリン拘縮反応性と静止膜電位低下の原因が、除神経筋と異なることは明らかである。また、フェニトインによるジストロフィー筋の静止膜電位の回復が、Naポンプ刺激作用に起因したものでないことが3)の結果より示唆される。クロラムフェニコールが、無傷の神経の栄養的支配に影響を及ぼさない(第I編)ことと考え合わせると、1)の結果は、ジストロフィー筋が神経支配筋であることを示唆しているものと理解できる。従って、神経の栄養的支配下にある静止膜電位とアセチルコリン感受性がジストロフィー筋で変化していることは、同症の神経の栄養的支配に異常のあることを示唆している。4)の結果は、筋ジストロフィー症と神経の栄養的支配の関係を直接示すものではないが、ジストロフィー症の発現に、神経の栄養的支配の異常に起因すると考えられる筋再生の欠陥が想定される。

第III編では、筋ジストロフィーマウス (C57BL/6J-dy) の自発運動量、生存期間、血清クレアチンホスホキナーゼ (CPK)、筋のカテプシンB, L活性及び筋タンパク含有に及ぼすE-64とE-64-d、及びキモスタチンの効果を検討し、次の結果を得た。ジストロフィーマウスの運動量は正常マウスに比べて著しく低下しており、症状の進行に伴ってその低下は更に著明となる。E-64、E-64-d、キモスタチンを6週令から投与すると、運動量の減少が緩やかとなった。また、ジストロフィーマウスの血清CPK活性は、正常マウスに比べて高かったが、上記薬物の投与によって減少し、生存期間も延長された。キモスタチンについては、筋タンパク含量に及ぼす影響も検討したが、ジストロフィー筋で投与後増加が認められた。また、E-64-dは、筋のカテプシンB, L活性に対して有意ではないが抑制傾向を示した。以上の結果より、これら上記プロ

テアーゼ阻害薬が筋ジストロフィー症の進行抑制に有効であることが示唆された。

以上の結果をまとめると、神経の栄養的支配にミトコンドリアで合成されるタンパク質の関与していること、及び筋ジストロフィー症の神経の栄養的支配に欠陥のあることが示唆された。栄養的支配を担うタンパク質に関する今後の研究は、ジストロフィー症の成因に関与する重要な知見を提供するものと思われる。一方、同症に著効のある治療薬は現時点において皆無である。それゆえ、上記のプロテアーゼ阻害薬に有効性が示唆されたことは、同症の成因究明とともに、今後の治療薬開発の面からも興味ある知見といえよう。

審査結果の要旨

筋ジストロフィー症は、主として骨格筋が選択的かつ進行性に障害される遺伝的筋疾患であり、有効な治療法も確立されていない難病の一つである。最近、筋の正常機能維持を司る支配神経の作用、すなわち興奮伝導以外の神経の筋肉に対する“栄養的支配”の変調としてその病態を理解する考え方が提唱されてきた。しかし、正常状態での栄養的支配の本体についてすら未詳の部分が多い。また、筋ジストロフィー症ではプロテアーゼ活性上昇に起因すると考えられる筋タンパク含量の減少が知られている。本研究では以上の背景を踏まえて、筋ジストロフィーマウスおよびその対照マウスを用いて栄養的支配について基礎的な検討を加え、更に栄養的支配と筋ジストロフィー症との因果関係およびタンパク分解酵素阻害薬による筋ジストロフィー症の改善効果の可能性について検討を行ったものである。

第1編では長趾伸筋に残存する神経断端の長さの異なる神経-筋標本を用い、アセチルコリン拘縮反応、および静止膜電位等の筋機能指標に対する各種タンパク合成阻害薬の影響を比較検討し、①栄養的支配には神経伝達物質アセチルコリンの関与は認められないこと、②栄養的支配には神経のミトコンドリアで合成されるタンパク質が関与していることを明らかにした。

第2編では筋ジストロフィーマウスと対照正常マウスの長趾伸筋の除神経筋を用い、アセチルコリン拘縮反応および静止膜電位に対するフェニトイン、ミトコンドリア蛋白分解酵素阻害薬クロラムフェニコールの影響を比較検討し、ジストロフィー筋は神経支配筋ではあるが栄養的支配の欠陥を示唆する知見を得た。

第3編では筋ジストロフィーマウスの自発運動量、生存期間、血清クレアチニンホスホキナーゼ、筋カタプシンB、L活性、筋タンパク含量を指標として、チオールプロテアーゼ阻害薬エポキシド誘導体とセリンプロテアーゼ阻害薬キモスタチンの効果を検討したもので、これらプロテアーゼ阻害薬は筋ジストロフィー症の進行抑制に有効であることを見出した。

本研究で得られた新知見は筋ジストロフィー症の成因究明の一助となり、更に今後の治療薬開発に有用な情報を提供したものと評価されよう。

以上、本研究内容は学位論文として価値あるものと判断する。