

氏名	十川 千春
授与した学位	博士
専攻分野の名称	学術
学位授与の番号	博 乙 第 3574号
学位授与の日付	平成13年3月25日
学位授与の要件	博士の学位論文提出者(学位規則第4条第2項該当)
学位論文題名	Antioxidants protect against dopamine-induced metallothionein-III(GIF)mRNA expression in mouse glial cell line(VR-2g) (マウスグリア細胞株(VR-2g)における, ドパミンによるメタロチオネイン-III(GIF)mRNA発現誘導に対する抗酸化物質の影響)
論文審査委員	教授 杉本 朋貞 教授 松村 智弘 教授 古田 裕昭

### 学位論文内容の要旨

#### 【緒言】

メタロチオネイン(MT)は、低分子量の金属結合蛋白質である。MT isoformsのうちMT-IおよびMT-IIは、生体内の多くの臓器において発現し、重金属をはじめグルココルチコイド、エンドトキシンなど多くの誘導因子によって誘導される。一方、MT-IIIは、神経栄養因子活性を抑制する神経成長抑制因子(GIF)として発見され、主に中枢神経系で特異的に発現し、MT-IやMT-IIの誘導物質によって発現誘導がみられないことから、MT-I、MT-IIとは異なる発現調節機構をもつと考えられる。またアルツハイマー病患者の脳をはじめ、種々の神経変性疾患の病変部において、著しくその発現が減少していたという報告より、それらの発症に関わっていると考えられている。しかし、MT-IIIの生理的役割については未だ定説はない。

本研究では、MT-IIIの発現調節機構の解明とその生理的役割の解明を目的とし、生体内においてMT-IIIの発現変動が報告されているグリア細胞におけるMT-III mRNAの発現誘導物質の探索を行った。その結果、グリア細胞株において、ドパミン(DA)によってMT-III mRNAの発現が誘導されることが明らかとなった。神経変性疾患であるパーキンソン病の発症に関与するといわれているDAによって、MT-IIIが誘導されることは興味深く、さらに、その発現機序について検討を行った。

#### 【材料および方法】

##### (細胞と薬物添加)

マウスグリア細胞株(VR-2g)は10%牛胎児血清添加ダルベッコ変法イーグルMEM培地にて、37°C、5%CO<sub>2</sub>下で培養した。また、実験では $2.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>で細胞を播き込み、各薬物は播き込みから24時間後に添加した。

### (MT-III mRNA発現量の定量)

薬物添加後に一定時間培養した細胞から全RNAを精製した。さらにDNaseで処理した後、マウスMT-IIIcDNAより設計したMT-III mRNA特異的プライマーを用いてreverse transcriptase (RT)- polymerase chain reaction (PCR)を行った。PCR反応の際 [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTPを取り込ませ、PCR産物をポリアクリルアミドゲル電気泳動後、バイオ・イメージングアナライザー(BAS2000, FUJIFILM)にて定量的に解析し、MT-III mRNA発現量を算出した。

## 【結果】

### 1. DA添加後のMT-III mRNA発現量の経時変化と濃度依存的増加

DA(100  $\mu$ M)添加後の各時間毎のMT-III mRNA発現量は、24時間後に無添加の場合との差が最も大きく、約2倍まで増加した。また、DA添加量の増加(50~200  $\mu$ M)に伴いMT-III mRNA発現量は増加したが、100  $\mu$ Mでプラトーに達した。

### 2. DAレセプターに対するアゴニストおよびDAアンタゴニストのMT-III mRNA発現への影響

SKF38393 (D1アゴニスト)およびbromocriptine (D2アゴニスト)を24時間作用させた場合、いずれもMT-III mRNA発現量の増加はみられなかった。また、SCH23390 (D1アンタゴニスト)およびsulpiride (D2アンタゴニスト)をDA (100  $\mu$ M)添加の30分前から作用させ、DA添加後24時間後のMT-III mRNA発現量を解析したところ、いずれのアンタゴニストもDAによるMT-III mRNA発現量の増加を抑制しなかった。

### 3. その他のDA系化合物 (6-hydroxydopamine (6-OHDA))によるMT-III mRNA発現量の変化

DAよりも細胞毒性が強く活性酸素種を産生する6-OHDAについて検討した結果、添加から24時間後のMT-III mRNA発現量はDAよりも低濃度でも2倍以上の増加がみられた。

### 4. DAによるMT-III mRNA発現量の増加に対する抗酸化物質の影響

抗酸化物質 (還元型グルタチオン(GSH), ビタミンE, ビタミンC)をそれぞれDA(100  $\mu$ M)と共存させ、DAによる活性酸素の産生を抑えた場合、いずれも、24時間後におけるMT-III mRNAの発現量はDA単独の場合と比較して有意に減少した。

## 【考察および結論】

DAはグリア細胞株においてMT-III mRNAの発現を誘導した。しかし、DAレセプターに対するアゴニストおよびアンタゴニストでは影響がみられなかったことより、DAによるMT-III mRNAの発現誘導はDAレセプターを介するものではないことが示された。また、抗酸化物質共存下ではDAによるMT-III mRNA発現誘導は有意に減少したことより、この発現誘導はDAにより産生される活性酸素種に起因するものであると考えられた。

MT-IIIが活性酸素消去作用を有するとの報告があることと併せて考えると、MT-IIIは活性酸素発生に伴いグリア細胞において発現誘導され、細胞障害に対する防御物質としての機能を果たしている可能性が示唆された。

## 論文審査結果の要旨

MT-IIIは、当初神経成長抑制因子として発見され、その後の研究から、脳内における活性酸素などの細胞障害に対する防御作用や、亜鉛の調節作用などが報告されている。また、アルツハイマー病患者の脳内をはじめ、種々の神経変性疾患の病変部において、著しくその発現が減少していたという報告より、それらの発症に関わっていると考えられている。

本研究では、MT-IIIの発現調節機構の解明を目的とし、生体内においてMT-IIIの発現変動が報告されているグリア細胞におけるMT-III mRNAの発現誘導物質の探索を行い、特にドパミン(DA)によってMT-III mRNAの発現が誘導されることを明らかにしている。さらに、DAによるMT-III mRNAの発現誘導は、DAレセプターを介するものではなく、DAにより産生される活性酸素種に起因するものである可能性を示唆している。

MT-IIIが活性酸素発生に伴いグリア細胞において発現誘導されることは、MT-IIIの細胞障害に対する防御作用を裏付けるものであり、本研究内容はMT-IIIの発現調節機構の解明および、MT-IIIの機能解明へと発展する可能性を含む価値のあるものである。

従って、本申請論文は博士（学術）の学位授与に値するものと判定した。