AMCoR
Asahikawa Medical University Repository http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/

旭川医科大学研究フォーラム (2015.2) 15,1:58-59.

# 平成24・25年度「独創性のある生命科学研究」個別研究課題 8)ミトコンドリア阻害による新規中枢性嗅覚障害モデルマウスとドパミン神経変性の評価

笹島 仁

８）ミトコンドリア阻害による新規中枢性嗅覚障害モデルマウスとドパミン神経変性の評価

研究代表者　笹島　　仁

【研究目的】

　鼻腔内に投与された化学物質は、鼻粘膜から血流を介して全身をめぐるとともに、嗅神経—嗅球間の接続を介して血液脳関門を経ることなく、直接、嗅球および脳脊髄液へ送達されることが知られている。そのため、環境化学物質への吸入暴露では、この嗅覚輸送経路を介して中枢神経に与える影響が懸念されている。ドパミン神経細胞は、農薬としても使用されるミトコンドリア阻害性の化学物質に対して感受性が高く、ミトコンドリア呼吸鎖阻害による活性酸素増加により細胞死が誘導される。この種の農薬を使用する農業従事

者では、黒質ドパミン神経細胞脱落によるパーキンソン病発病率が高いことが報告されており、環境化学物質と中枢神経変性との関連が疑われている (Tanner et al., *Environ. Health Perspect.*, 2011)。

我々はこれまでの研究から、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 -I を阻害するロテノンをマウスの鼻腔内に反復投与すると、酪酸臭に対する忌避行動の低下、嗅球ドパミン神経細胞の消失ならびに嗅球萎縮を呈することが明らかになった。また、片側鼻腔内投与にもかかわらず、嗅球での作用は両側性に現れることから、ロテノンの影響範囲は拡大することが示唆された。そこで本研究では、ロテノンの嗅覚輸送を介して表出する脳の脆弱性に関して検討した。

【研究方法】

マウス（雌、BALB/c、3-6 か月齢）の右側鼻腔内に、ロテノン（0.35 mg/kg）を一日一回、反復投与した。麻酔下にて PBS 潅流後、RNAlater (QIAGEN) あるいは４％パラホルムアルデヒドを潅流、抜脳し、RNA 抽出あるいは免疫染色に用いた。リアルタイム PCR による各種マーカー遺伝子発現動態の解析は、KAPA SYBR FAST qPCR Kit (KAPABIOSYSTEMS) ならびに LightCycler 480 (Roche) を用いて行った。脳内のドパミン神経細胞の分布は、抗 TH 抗体を用いた蛍光組織免疫染色あるいは ABC 増感 DAB 染色により観察した。

【結果および考察】

これまでの研究からマウス鼻腔内へのロテノン反復投与を 14 日間行うと、嗅球の有意な委縮、ドパミン神経細胞マーカーであるチロシンヒドロキシラーゼ (TH) の免疫染色像の消失が両側性に観察されている。また、Y 字迷路を用いた嗅覚機能評価では、ロテノン投与マウスは、7 日間投与群において 25％酪酸に対する忌避行動を、14 日間投与群においては 25％ならびに 100％酪酸に対する忌避行動を消失することを見出している。さらに、RT-PCR による遺伝子発現動態の解析では、投与３日目より、TH 発現の減少とミトコンドリアストレスマーカーである PARK2 の発現増強が認められた。

本研究では、リアルタイム PCR により遺伝子発現動態の定量的解析を行い、ロテノン鼻腔内投与群の嗅球における TH 発現減少ならびに PARK2 発現増加が、投与３日目以降に有意であることを確認した (n=6, p<0.005 by Welch's t test)。さらに、PARK2 同様のミトコンドリアストレスマーカーである PINK1 の有意な発現増強、アポトーシス因子である Bax の発現増強を投与３日目より認めた (n=6, p<0.001 by Welch's t test)。ミトコンドリア呼吸鎖複合体 -I の阻害は、不完全な呼吸鎖反応による活性酸素を増大し、活性酸素により傷害されたミトコンドリアはミトコンドリア特異的オートファジーにより分解されることが知られている。PARK2 および PINK1 はミトコンドリア特異的オートファジー誘導因子であることから、鼻腔内に投与されたロテノンは、嗅覚輸送を介して嗅球に到達し、過剰なミトコンドリアストレスを誘導することで、アポトーシスを引き起こすことが示唆された。

14 日間のロテノン投与によって、嗅球における TH 陽性細胞が消失した一方で、線条体においても抗 TH 抗体に対する免疫原性も低下していた。線条体における抗 TH 免疫原性は、黒質緻密部 (SNc) ドパミン神経細胞の axon に由来する。広範に及ぶ線条体におけるドパミン神経 axon の詳細観察は困難であることから、同じく黒質緻密部ドパミン神経細胞が dendrite を伸展する黒質網様部 (SNr) において、抗 TH 抗体染色を行った。その結果、対照群に比して、14 日間ロテノン投与群では、黒質緻密部より伸展する dendrite の退縮を認めた。従来報告では、マウスあるいはラットの鼻腔内へロテノンを投与しても、黒質ドパミン神経細胞への影響は無いとされている（Rojo et al., *Experimental Neurology*, 2007）。しかし本研究では、従来研究に比して投与量 1/7 かつ投与期間 1/2 の条件において、黒質ドパミン神経細胞における神経突起縮退という影響を見出しており、環境毒性物質への暴露に嗅覚輸送が介在した場合の、中枢神経変性の危険性を示すものと考えられる。