

称号及び氏名 博士（保健学） 橋本 遵一

学位授与の日付 令和6年3月31日

論文名 強心配糖体 Digoxin 投与による Na/K ATPase 活性化が樹状突起スパイン新生および運動学習に与える影響

論文審査委員 主査 宮井 和政
副査 平岡 浩一
副査 内藤 泰男

学位論文の要旨

【目的】

脳損傷後の機能回復には、脳の可塑的变化が重要な役割を果たしているが、これには遺伝的、時間的な制約が存在する。また、運動器の障害により新たな運動機能を再獲得する際にも脳の構造的・機能的な変化が生じるとされている。このような脳の可塑的变化は新たなシナプス形成によって生じ、その促進はリハビリテーションにおける失われた運動機能の再獲得や脳損傷後の機能回復にとって重要な要素となる。中枢神経系におけるシナプス後部構造体は樹状突起スパインと呼ばれ、その前駆体である樹状突起フィロポディアはシナプス新生の起点となる可能性が指摘されている。また、この樹状突起フィロポディアの新生は、ニューロトリプシン-アグリン経路によって生じることが知られている。タンパク質分解酵素ニューロトリプシンは神経活動依存的に放出され、細胞外基質であるアグリンを切断する。切断されたアグリンのC末端断片はアグリン-22と呼ばれ、中枢神経系においてNa/K ATPase 活性を修飾し樹状突起フィロポディア新生を引き起こすと考えられている。しかし、この樹状突起フィロポディアの新生がNa/K ATPase 活性化によるものか抑制によるものかは明らかとなっていない。本研究では、濃度依存的にNa/K ATPase 活性を修飾できる強心配糖体Digoxinを用い、各種濃度のDigoxin投与がNa/K ATPase 活性や樹状突起フィロポディア新生および運動学習に与える影響を解析した。

【方法】

動物は、成熟期にあたる10-12週齢のオスのマウスを使用した。使用する系統はニューロトリプシン野生型マウス (NT-WT マウス)、ニューロトリプシン遺伝子欠損マウス (NT-KO マウス)、C57BL/6N マウス、の3種とした。Digoxinは0 µg/kg (溶媒のみ) 1 µg/kg, 4 µg/kg, 65 µg/kg, 650 µg/kg の5条件で、総量100 µLを無麻酔で腹腔内に注射した。Na/K ATPase 活性は、ホモジナイズした脳組織において、ATPaseの作用によりATPから遊離するリン酸イオン量を指標として計測する手法を用いた。樹状突起スパイン解析にはGolgi-Cox染色を実施し、長さ2 µm以上の樹状突起フィロポディア/Thin型スパインを新生スパインとして計測した。さらに、2 µm未満のStubby/Mushroom型の成熟スパイン数も同時に計測した。運動学習試験にはロータロッドを使用し、直径3 cmの回転棒上を繰返し歩行させた際に認められる協調運動の上達度を運動学習として評価した。また、自発活動量試験にはオープンフィールドを使用し、30 cm四方の箱内で20分間自由に移動させた際の総移動距離を計測した。

【結果】

ATPase 活性解析では、65 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 濃度の Digoxin 投与にて有意にその活性が上昇したが、1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の投与濃度では Na/K ATPase 活性に影響を与えなかった。新生スパイン解析では、NT-KO マウスおよび C57BL/6N マウスの両系統で 65 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 濃度の Digoxin 投与により、大脳皮質および海馬における新生スパイン密度が有意に増加した。さらに、樹状突起スパイン新生に障害のある NT-KO マウスの新生スパイン密度は、C57BL/6N マウスと同等の水準まで回復した。また運動学習試験では、NT-WT および NT-KO マウスの両系統において、65 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 濃度の Digoxin 投与により運動学習成績が有意に向上した。加えて、NT-KO マウスにおいては、1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 濃度の Digoxin 投与でも運動学習成績が有意に向上し、NT-WT マウスと同等の水準まで成績が改善した。一方、自発活動量試験では、650 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群でのみ有意に自発活動量が減少した。

【考察】

Na/K ATPase 活性解析では 65 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 濃度の Digoxin 投与により有意に高い活性を示した。これは先行研究の結果を支持するものである。しかし、1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 濃度の Digoxin 投与は Na/K ATPase 活性に影響を与えなかった。Na/K ATPase は、脳における全 ATPase 活性の 50%以上を占めているとされるが、今回の手法では他の ATPase の活性もあわせて計測しているため、その効果がマスクされていたと考えられる。樹状突起スパイン新生と運動学習成績の向上は濃度依存的に生じ、NT-KO マウスでは 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の低濃度でも効果的に作用した。Na/K ATPase 活性化によるスパイン新生の促進は、NT-WT マウスにおいては樹状突起スパイン新生および運動学習成績を促進し、NT-KO マウスにおいては、ニューロトリプシン-アグリン経路を代償する可能性を示した。この Na/K ATPase 活性化による樹状突起スパイン形成は、新たなシナプス形成の選択肢を増加させ、最適な神経回路形成の確率を上昇させることで運動学習成績の向上を引き起こしたと考えられる。本研究における成果は、Digoxin による Na/K ATPase 活性化がリハビリテーション場面における脳損傷後の機能回復および失われた運動機能の再獲得に対し有効な治療選択肢となる可能性を示唆している。

論文審査結果の要旨

本論文では、動物実験を用いた基礎研究により、強心配糖体ジゴキシンがシナプス後部構造である樹状突起スパインの新生を促進するかどうか、また、運動学習能を向上させるかどうかを検討した成果を論じている。本研究で着目しているジゴキシンは、既に強心剤として認可されている薬剤であり、血液脳関門を通じて脳内に移行し、Na/K ATPase の活性化を通じて樹状突起スパインの新生シグナルを賦活する可能性が期待されるが、樹状突起スパインと運動学習能に対する作用は未解明である。そこで本研究では、Na/K ATPase を活性化する濃度や臨床的に使用されている濃度である低濃度のジゴキシンが樹状突起スパインと運動学習に与える影響を検討した。その結果、低濃度のジゴキシンは脳内の Na/K ATPase 活性を上昇させ、新生した樹状突起スパインに特徴的な形態である長いスパインの密度を有意に増加させることを示した。また、低濃度のジゴキシンは協調運動試験の成績も有意に向上させた。この効果は、神経活動依存的な樹状突起スパイン新生に障害のあるニューロトリプシン遺伝子欠損マウスでも認められ、特に臨床用量であるジゴキシンでも運動学習能を向上させることを明らかにした。この結果は、低濃度ジゴキシンがニューロトリプシンから始まる樹状突起スパイン新生シグナル経路の下流を賦活化することで障害を補償した可能性を強く示唆するものである。

本研究は、臨床用量のジゴキシンが障害のある脳においてもシナプス新生を促進し、脳疾患により障害された運動機能を改善する可能性を世界に先駆けて示したものであり、既存のリハビリテーションと組み合わせることで神経機能回復を促進させる可能性を見出した発展性の高い研究である。また、ジゴキシンの効用を神経機能回復にも広げる“ドラッグ・リポジショニング”の可能性も示唆するものである。本論文の研究内容は国際脳研究機構 (IBRO) の機関誌である Neuroscience 誌にも受理されていることから、神経機能リハビリテーション研究の発展に寄与できる質の高い論文であり、博士の学位授与に十分値するものと考えられる。