



# Pipecolic acid induces apoptosis in neuronal cells

松本, 伸治

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2003-09-30

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2907

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002907>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 80 】

氏 名・(本 籍) 松本 伸治 (兵庫県)  
博士の専攻分野の名称 博士(医学)  
学 位 記 番 号 博い第1540号  
学位授与の 要 件 学位規則第4条第1項該当  
学位授与の 日 付 平成15年9月30日

【 学位論文題目 】

Pipecolic acid induces apoptosis in neuronal cells  
(ピペコリン酸の神経細胞アポトーシス誘導作用)

審 査 委 員

主 査 教 授 甲村 英二  
教 授 寺島 俊雄  
教 授 尾原 秀史

環状イミノ酸であるピペコリン酸はリシンの代謝副産物であり、D 体と L 体がある。ピペコリン酸の脳内動態に関して、ピペコリン酸はシナプトソームに取り込まれ、抑制性神経伝達物質の一つであるガンマアミノ酪酸 (GABA) 放出を刺激したり、GABA 再吸収を抑制するとの報告がある。Zellweger 症候群、高リシン血症、hyperpipicolatemia、肝硬変等の慢性肝疾患、特に肝性脳症を合併する症例で、ピペコリン酸ならびに GABA 血中濃度の上昇が確認されている。肝性脳症発生機序の一つとして、グリア細胞の浮腫が指摘されており、これはアンモニア、炎症性サイトカイン、ベンゾジアゼピン (GABA<sub>A</sub> 受容体の活性化) によって誘導されることが分かっている。以上の事実を総合すると、ピペコリン酸が GABA 神経伝達系を刺激する事でグリア細胞の浮腫を誘導し、肝性脳症の一因となりうることを示唆している。しかし、未だこの説に対する直接的証拠はない。

本研究は肝性脳症発生機序におけるピペコリン酸の役割を明らかにすることを目的とした。

#### 【材料および方法】

##### 集合(PS)電位記録

ラット海馬切片を用いて、貫通路を刺激し細胞体層より集合電位を記録した。

##### 細胞培養

ラット大脳皮質神経細胞の初代培養ならびにマウス神経芽細胞種株 Neuro-2A 細胞の培養を行った。

##### パッチクランプ記録

Whole-cell voltage-clamp を施行し、電位依存性 Ca<sup>2+</sup>チャネル電流はラット培養大脳皮質神経細胞から、電位依存性 Na<sup>+</sup>チャネル電流と K<sup>+</sup>チャネル電流は Neuro-2A 細胞から記録された。

##### MTT アッセイ

Neuro-2A 細胞をピペコリン酸存在下・非存在下で 72 時間、培養し、MTT を負荷し吸光度計 (570 nm) で細胞生存率を測定した。

##### 蛍光組織染色

Neuro-2A 細胞を propidium iodide ならびに Hoechst 33342 で処理し、蛍光顕微鏡でそれぞれの色素を検出した。

#### 【結果】

##### 海馬神経伝達に対するピペコリン酸の効果

によるかを決定するために、アポトーシスマーカーである Hoechst 33342 を用いて蛍光染色を行った。その結果、DL-ピペコリン酸 (100 μM) を 72 時間処理した細胞は細胞死マーカーである propidium iodide に反応し、それと一致して Hoechst 33342 にも反応した。これに対して、D-, L-ピペコリン酸を処理した細胞ではいずれの反応も弱く、非処理細胞では全く反応なかった。この結果は、ピペコリン酸がアポトーシスを誘導し神経細胞生存率を低下させていることを示唆している。

#### 【考察】

肝性脳症は、急性または慢性肝臓疾患に合併する神経精神症候群である。アンモニア、GABA<sub>A</sub> 受容体を活性化するベンゾジアゼピン、炎症性のサイトカインはグリア細胞に浮腫を起こすことで肝性脳症を引き起こすと考えられている。興味深いことに、ピペコリン酸が肝硬変、特に肝性脳症を合併する患者において上昇することが分かっている。この事実は、ピペコリン酸が GABA 作動性システムを刺激することによりグリア細胞の浮腫を引き起こし、シナプス伝達を混乱させる要因となることを示唆している。ピペコリン酸が Ca<sup>2+</sup>チャネル電流を増大したという結果は、ピペコリン酸が神経伝達物質放出、例えば GABA 放出を刺激する可能性を示唆している。しかし、ピペコリン酸は海馬神経伝達、電位依存性 Na<sup>+</sup>チャネル電流、K<sup>+</sup>チャネル電流には影響を与えなかった。これらの結果は、たとえピペコリン酸が GABA 放出に関与しているとしても、神経伝達には影響を与えない程度であることを示唆している。換言すれば、ピペコリン酸が GABA 作動性システムを介して神経伝達阻害をしているのではないということの意味している。

本研究において最も注目すべき結果は、ピペコリン酸が神経細胞のアポトーシスを誘導し、細胞生存率を低下させるということである。このピペコリン酸の作用は肝性脳症の要因となりうると思われる。正常状態でのピペコリン酸血中濃度は 1 μM 以下であり、L-ピペコリン酸の方が D-ピペコリン酸より多く存在している。しかし、肝性脳症の患者では、D-, L-ピペコリン酸がそれぞれ約 1.5, と 2.5 μM まで増加することが分かっている。本実験において、ピペコリン酸によるアポトーシス誘導は 10 μM 以上の高濃度、72 時間処理で認められた。しかし、2~3 μM のピペコリン酸でも 72 時間以上の処理でアポトーシスを誘導できるかもしれない。

#### 【まとめ】

本研究は、ピペコリン酸の神経細胞アポトーシス誘導作用を初めて示したものであり、このピペコリン酸の効果は肝性脳症発生機序において一つの経路を説明しているかもしれない。

## 論文審査の結果の要旨

受付番号	甲第1541号	氏名	松本 伸治
論文題目	Pipecolic acid induces apoptosis in neuronal cells ピペコリン酸の神経細胞アポトーシス誘導作用		
審査委員	主 査 甲村 英二 副 査 寺島 俊雄 副 査 尾崎 秀史		
審査終了日	平成 15 年 8 月 5 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

## ピペコリン酸の神経細胞アポトーシス誘導作用

松本 伸治

環状イミノ酸であるピペコリン酸はリシンの代謝副産物であり、抑制性神経伝達物質の一つであるガンマアミノ酪酸(GABA)放出を刺激したり、GABA再吸収を抑制するとの報告がある。Zellweger 症候群、高リシン血症、hyperpipicolatemia、肝硬変等の慢性肝疾患、特に肝性脳症を合併する症例で、ピペコリン酸ならびに GABA 血中濃度の上昇が確認されている。肝性脳症発生機序の一つとして、GABA 受容体の活性化経路が示唆されてきた。本研究は肝性脳症発生機序におけるピペコリン酸の役割を明らかにすることを目的とした。

ラット海馬切片を用いて、貫通路を刺激し細胞体層より集合電位を記録し、ピペコリン酸添加によるシナプス後性活動電位の変化を電気生理学的に解析した。D-, L-, DL-ピペコリン酸(1、10、100  $\mu$ M)を20分間投与し、投与前後の集合電位の振幅変化を調べた。1  $\mu$ M L-ピペコリン酸で約90%の集合電位振幅抑制をうけた以外、いずれの濃度のピペコリン酸も有意な抑制効果は得られなかった。逆に10、100  $\mu$ M DL-ピペコリン酸ではそれぞれ106、110%の集合電位振幅増大が認められた。また、D-, L-, DL-ピペコリン酸(1、10、100  $\mu$ M)を60分間投与した場合でも集合電位のさらなる抑制は認められなかった。ピペコリン酸は海馬神経伝達に対して抑制効果をほとんど有さないことが明らかとなった。

次にパッチクランプ法を用いて電位依存性の  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ チャネルに対するピペコリン酸の効果を培養細胞で検討した。Neuro-2A細胞において10  $\mu$ MのDL-ピペコリン酸存在下で  $\text{Na}^+$ チャネル電流は非存在下の89%まで低下したが有意差はなく、100  $\mu$ M DL-ピペコリン酸では効果は無かった。電位依存性  $\text{K}^+$ チャネル電流は10、100  $\mu$ M DL-ピペコリン酸存在下で影響を受けなかった。培養ラット大脳皮質神経細胞において10、100  $\mu$ M DL-ピペコリン酸は  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル電流をそれぞれ108、114%まで増大した。この結果、ピペコリン酸はシナプス前終末から

の神経伝達物質放出を促進する可能性はあるが、軸索伝達には関与しないことが示唆された。

さらに、ピペコリン酸による神経細胞死の可能性を調べるために Neuro-2A 細胞を用いて MTT アッセイを行った。D-, L-, DL-ピペコリン酸はいずれも濃度依存性(1-100  $\mu$ M)に Neuro-2A 細胞生存率を下げた。最も顕著な効果は DL-ピペコリン酸で認められ、細胞生存率を 1、10、100  $\mu$ M でそれぞれ対象の 68、60、48% にまで下げた。ピペコリン酸代謝産物である DL-リシンや DL- $\alpha$ -aminoadipic acid は細胞生存率になんら影響を与えなかった。この細胞死機構におけるアポトーシスの関与を検討するために、アポトーシスマーカーである Hoechst 33342 を用いて蛍光染色を行った。DL-ピペコリン酸(100  $\mu$ M)で 72 時間処理した細胞は細胞死マーカーである propidium iodide に反応し、それと一致して Hoechst 33342 にも反応した。これに対して、D-, L-ピペコリン酸を処理した細胞ではいずれの反応も弱く、非処理細胞では全く反応しなかった。この結果、ピペコリン酸による神経細胞死にアポトーシス機構が関与していることが示唆された。

本研究は肝性脳症時に上昇するピペコリン酸についてその神経障害機序を研究したものであるが、従来考えられていたような GABA 作動性システムを介して神経伝達障害をするのではなく、アポトーシス機構を介した神経細胞死が関与している可能性を示し脳機能障害発生機序について重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認める。よって、本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。