

氏名	藤井健志
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	薬博第329号
学位授与の日付	平成5年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	薬学研究科薬学専攻
学位論文題目	脳機能改善薬の海馬における神経化学的作用機序に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 佐藤公道 教授 市川厚 教授 川寄敏祐

論文内容の要旨

大脳辺縁系にある海馬は、記憶や学習に関連した重要な脳部位であるとされている。この海馬内で観察されるシナプス伝達効率の長期増強(LTP)は記憶や学習の基本的過程を示すモデルと考えられ、脳機能改善薬として総称される薬物群の多くがLTPを増大することなどから、これらの薬物を開発するための有用なスクリーニング法として利用され始めている。これまでの本教室における研究により、bifemelaneは苔状線維-CA3のシナプスのLTPのみを選択的に増大することが示された。しかし、その作用メカニズムに関しては不明である。そこで、著者のモルモット海馬内におけるbifemelaneの薬理作用の神経化学的メカニズムに関する研究を行い、以下の新知見を得た。

I. モルモット海馬におけるbifemelaneの結合部位と薬理作用の領域差

1) Bifemelaneの結合部位の存在

BifemelaneのLTP増大作用に神経回路選択性が認められることから、海馬内にbifemelaneの結合部位が存在することが推察される。雄性Hartley系モルモットの海馬CA3領域より調製したシナプス膜標本において、 $[^3\text{H}]$ bifemelaneの可逆的かつ飽和性を有する結合部位が認められた。 $[^3\text{H}]$ bifemelane結合をモノアミン取り組み阻害薬であるimipramine($1\mu\text{M}$)は有意に抑制した。Imipramineの非存在下では $[^3\text{H}]$ bifemelane結合は高親和性と低親和性の2相性を示したが、imipramine($1\mu\text{M}$)存在下では低親和性結合のみ消失したことから、低親和性結合の少なくとも一部はモノアミン取り組み部位を標識していることが考えられた。Bifemelane以外の苔状線維-CA3のLTPを増大させる機能改善薬のうち、調べたindoloxazine, indebenone, vinctocetine, Ca-hopantenate, piracetamはいずれも $[^3\text{H}]$ bifemelane結合を抑制しなかつたことからbifemelaneはこれらの薬物と異なるメカニズムでLTPを増大するものと推論できる。 $[^3\text{H}]$ bifemelane結合部位の密度を、CA1, CA3およびdentate gyrus領域よりそれぞれ調製したシナプス膜標本を用いて比較すると、CA3, dentate gyrus, CA1領域の順で高かった。

2) Bifemelane の inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) と cAMP 含量に及ぼす影響

Bifemelane (10nM-100 μM) で海馬切片を処置すると CA3 および dentate gyrus 領域では用量依存的に IP₃ 含量の増加が認められたが、CA1 領域では IP₃ 含量に変化がなかった。つまり CA3 および dentate gyrus はイノシトールリン脂質代謝系に促進的作用を及ぼしている可能性が推察された。Bifemelane (10nM-100 μM) は CA1, CA3 および dentate gyrus 領域の cAMP 含量を変化させなかったため、テアデニレートシクラーゼ系にはあまり影響しないものと考えられた。

3) Bifemelane の protein kinase C (PKC) の細胞下分布に及ぼす影響

LTP の発現には PKC の細胞質から細胞膜脂質環境への移行 (活性化) の関与が明らかとなっているので、bifemelane による PKC の細胞下分布に及ぼす影響を PKC に結合する [³H]phorbol 12,13-dibutyrate (PDBu) を用いた結合実験により検討した。

Bifemelane (10nM-100 μM) は用量に依存して細胞膜画分では有意に [³H]PDBu 結合活性を増加させたが、細胞質画分では逆に減少させた。細胞膜画分の [³H]PDBu 結合活性の増加は bifemelane (1 μM) により 15 分以内に見られ bifemelane を灌流液中より除いても少なくとも 45 分間は持続した。CA3 領域での [³H]PDBu 結合活性 (細胞質画分+細胞膜画分) は bifemelane により影響を受けなかった。一方 CA1 領域では、CA3 領域で最大効果を示した濃度 (1 μM) でも総結合活性および細胞下分布はどちらも変化しなかった。以上のことは bifemelane により CA3 領域では PKC の活性化が起こるが、CA1 領域では PKC の活性化は起こらないことを示す。

以上の結果から、bifemelane の結合部位数が CA3 領域に多く、イノシトールリン脂質代謝回転促進および PKC 活性化作用も CA 領域に認められたことは、bifemelane の作用部位の 1 つが苔状線維終末部であることを示すものと考えられた。また、これらの作用と LTP の増大作用を示す部位の間に並行性が認められることは、bifemelane による PKC 活性化作用が LTP 増大作用に関連があることを示唆している。

II. Bifemelane のグルタミン酸遊離に及ぼす影響とその調節メカニズム

苔状線維終末部を豊富に含むと考えられるシナプトソームを調製して、bifemelane が苔状線維終末に直接作用しているのか否かを調べるとともに、苔状線維中の伝達物質として考えられているグルタミン酸遊離に対する bifemelane の影響を検討した。

1) モルモット海馬苔状線維シナプトソーム調製と諸性質

モルモット海馬ホモジネートより核画分と P2 画分を調製し、さらに核画分から密度勾配遠心法により P3 画分を調製した。この P3 画分シナプトソームは、大きく (長径 5 μm) かつ形状も不規則であった。さらに、このシナプトソームは密にシナプス小胞を含んでおり、active zone (シナプス間隙) も見られた。一方、P2 画分シナプトソームは小さく (直径 1 μm) でほぼ円形をしていた。P3 画分シナプトソームの亜鉛、免疫活性 dynorphin A (1-8) および dynorphin B の含量は P2 画分シナプトソームの約 2 倍と有意に高かったことから、P3 画分シナプトソームは苔状線維終末部の性質を良く保持していると考え

られる。

2) Bifemelane 結合部位と情報伝達系

P3およびP2画分シナプトソームより調製した膜画分に $[^3\text{H}]$ bifemelaneの結合部位が認められた。

Bifemelane (10nM-100 μM)により、P3画分シナプトソームにおいて IP_3 含量は濃度依存的に増加したが、P2画分シナプトソームでは変化しなかった。cAMP含量はP3およびP2画分シナプトソームにおいてもbifemelane (10nM-100 μM)によって影響を受けなかった。

Bifemelane (1 μM)は、P3画分シナプトソームの総 $[^3\text{H}]$ PDBu結合活性には影響せずに膜画分の $[^3\text{H}]$ PDBu結合活性の割合を有意に増加させた。一方、P2画分シナプトソームにおいて、bifemelane (1 μM)により $[^3\text{H}]$ PDBuの総結合活性および細胞下分布のどちらも変化しなかった。

P3およびP2画分シナプトソームのいずれにもbifemelaneの結合部位は存在することから、bifemelaneは苔状線維終末および苔状線維以外の神経終末の両方に作用すると考えられる。しかし、イノシトールリン脂質代謝の促進とPKCの活性化への関連はP3画分シナプトソームのみで認められるので、苔状線維終末がbifemelaneの作用部位として重要であることが示唆された。

3) 苔状線維終末からのグルタミン酸遊離に対するbifemelaneの促進作用

Bifemelane (0.01-1 μM)はP3画分シナプトソームからのグルタミン酸の基礎遊離量自体には影響しなかったが、高カリウム (30mM) 誘発遊離量を用量依存的に増大した。一方、P2画分シナプトソームからのグルタミン酸の基礎遊離量および高カリウム誘発遊離量のいずれに対してもbifemelane (1 μM)は有意な効果を示さなかった。Bifemelane (1 μM)によるグルタミン酸遊離量増大効果は、PKC阻害作用を有するH-7 (100 μM)により有意に抑制された。PKC活性化薬のPDBu (1 μM)によるグルタミン酸の高カリウム誘発遊離量の増大効果もH-7 (100 μM)により有意に抑制された。以上のことは、P3画分シナプトソームからのbifemelaneによるグルタミン酸遊離増大効果の少なくとも一部にPKCの活性化が関与していることを示唆する。

以上の結果から、モルモット海馬苔状線維終末部にbifemelaneが直接作用して、高カリウム刺激によるグルタミン酸遊離を促進していることが明らかとなった。この作用の少なくとも一部にイノシトールリン脂質代謝系からPKC活性化の経路が深く関わっていることが推察された。

以上の諸成績より、脳機能改善薬bifemelaneが海馬苔状線維終末部の特異的な結合部位に直接作用し、少なくとも一部PKCの活性化を介して、神経伝達物質の候補であるグルタミン酸の遊離を増加させることにより苔状線維-CA3のLTPをシナプス前性に増大させている可能性が強く示唆される。苔状線維終末部に対する薬物の作用を神経化学的に解析した本研究の成果は、新しい脳機能改善薬の開発に基礎的知見を提供するものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

学習・記憶に関連の深い脳部位として知られている海馬で発現し易いシナプス伝達の長期増強(LTP)

現象は記憶や学習の基礎的過程を示すモデルと考えられている。佐藤らの研究により、脳機能改善薬と総称される薬物の多くがLTPを増大することが明らかにされ、これらの薬物の開発に有用なスクリーニング法として利用され始めている。ところで脳機能改善薬の一つ bifemelane は、モルモット海馬切片標本において、苔状線維-CA3系のLTPのみを選択的に増大することが電気生理学的研究によって示されたが、その裏付けとなる神経化学的メカニズムは不明であった。この点を明らかにしたのが本論文の骨子である。

Bifemelane は神経回路選択的な作用を有するので、モルモット海馬CA3領域から調製したシナプス膜標本で $[^3\text{H}]$ bifemelane 結合部位の存在を調べたところ、高親和性と低親和性の2部位が認められ、そのうち低親和性結合は imipramine を共存させると消失したので、 $[^3\text{H}]$ bifemelane の結合部位の少なくとも一部はモノアミン取り込み部位であることが推測される。 $[^3\text{H}]$ bifemelane 結合は、他の諸種の脳機能改善薬によっては影響を受けず、また結合部位密度の高さはCA3、歯状回、CA1の順であった。これらの結果は、モルモット海馬には bifemelane に対する特異的結合部位が領域差を持って存在することを示唆している。

LTP発現におけるプロテインキナーゼC(PKC)の細胞質から細胞膜への移行(活性化)の関与が明らかにされているので、bifemelane によるPKCの細胞下分布への影響を $[^3\text{H}]$ phorbol 12, 13-dibutyrate を用いた結合実験により調べたところ、CA3領域では、LTP増大作用を起こしたのと同程度の濃度範囲で濃度依存的なPKC活性化作用が見られたが、CA1領域ではこのような作用は認められなかった。

更に、苔状線維終末部の形態学的特徴を利用して、この終末部を豊富に含む画分(P3画分)を密度勾配遠心法により他の神経終末部を含むP2画分と区別して調製した。Bifemelane は、P3画分においてのみ inositol-1,4,5-trisphosphate を増量させ、PKCを活性化する作用を濃度依存的に起こした。また、bifemelane は、P3画分においてのみ、グルタミン酸の基礎遊離量に影響することなく高カリウム誘発遊離量を濃度依存的に増大したが、この作用はPKC阻害作用を持つ試薬H-7により抑制された。

以上の諸成績は、脳機能改善薬である bifemelane が海馬苔状線維終末部の特異的な結合部位に直接作用し、少なくとも一部PKCの活性化を介して、神経伝達物質の有力候補であるグルタミン酸の遊離を増加させることにより苔状線維-CA3系のLTPをシナプス前性に増大させている可能性を強く示唆している。これらの神経化学的研究の成果は、新しい脳機能改善薬の開発に一つの基礎的知見を提供するものと考えられる。

よって、本論文は博士(薬学)の学位論文として価値あるものと認める。更に平成5年3月5日に論文内容とそれに関連した事項につき試問を行った結果、優秀と認定した。