

(論文内容の要旨)

神経変性疾患であるアルツハイマー病や脳虚血性疾患では脳神経細胞の脱落が認められ、認知機能をはじめとしたさまざまな機能障害を引き起こす。アルツハイマー病と脳血管性認知症は病態に共通する部分が多く、重篤なアルツハイマー病患者には脳虚血による梗塞層が認められ、症状の増悪化に脳虚血による神経細胞死の関与が示唆されている。中枢型アセチルコリンエステラーゼ阻害薬であるドネペジルはアルツハイマー病患者の認知機能障害を緩和する症状改善薬として広く用いられている。しかしながら、アルツハイマー病の増悪化や脳血管性認知症の原因でもある虚血性神経細胞死に対するドネペジルの作用は不明であった。そこで、虚血誘発神経細胞死に対するドネペジルの作用を解明する目的で薬理学的研究を行った。

第一章 虚血性神経細胞死に対するドネペジルの保護作用

虚血性神経細胞死に対するドネペジルの作用を明らかにする目的で、ラット大脳皮質由来初代培養神経細胞を用い、ドネペジルを含む中枢型アセチルコリンエステラーゼ阻害薬の低酸素低グルコース (OGD) 負荷により誘発される神経細胞死に対する作用を検討した。OGD 負荷により誘発される乳酸脱水素酵素 (LDH) 遊離および神経細胞の形態変化は、ドネペジルにより著明に抑制された。一方、タクリン、リバスチグミン、ガランタミンといったドネペジル以外の中枢型アセチルコリンエステラーゼ阻害薬は LDH 遊離抑制作用を示さなかった。ドネペジルの神経保護作用におけるアセチルコリン受容体の関与を検討する目的で、ムスカリン受容体拮抗薬およびニコチン受容体拮抗薬の作用を検討したが、ドネペジルの神経保護作用はこれらの薬物により影響を受けなかった。ドネペジルは OGD 負荷による神経細胞死に対する保護作用を有しており、その神経保護作用にはアセチルコリンエステラーゼ阻害活性とは異なる機序の関与が示唆された。

第二章 興奮性アミノ酸により誘発される神経細胞死に対するドネペジルの保護作用

虚血性神経細胞死は興奮性アミノ酸であるグルタミン酸受容体の活性化を介して進行すると考えられているため、ドネペジルの神経保護作用のメカニズムを探る目的で、グルタミン酸受容体アゴニストによる神経細胞死に対する作用を検討した。ドネペジルは NMDA, AMPA, カイニン酸のいずれの神経細胞死に対しても保護作用を示したが、特に NMDA に対する作用がもっとも顕著であった。ドネペジルの各グルタミン酸受容体に対するアゴニストの結合阻害活性の測定結果より、ドネペジル

はNMDA受容体のグリシンサイトとポリアミンサイトにわずかな拮抗作用を示しただけであった。さらに、細胞内 Ca^{2+} 濃度に対するドネペジルの作用を明らかにする目的でNMDA刺激時の Ca^{2+} 流入を測定した結果、ドネペジルは濃度依存的に Ca^{2+} 濃度上昇を抑制した。ドネペジルはグルタミン酸受容体に対する拮抗作用は弱い、興奮性アミノ酸誘発神経細胞死に対して神経保護作用を示すことが明らかとなり、その保護作用には細胞内 Ca^{2+} 流入抑制作用が部分的に関与することが示された。

第三章 脱分極刺激により誘発されるカチオン流入に対するドネペジルの作用

興奮性アミノ酸誘発神経細胞死には脱分極による細胞内カチオン過剰流入が重要な役割を果たす。ドネペジルの細胞内カチオン流入に対する作用を明らかにする目的で、ラット大脳皮質由来初代培養神経細胞を用いてベラトリジン誘発神経細胞死に対するドネペジルの作用を検討した。 Na^+ チャネル阻害薬であるテトロドドキシン (TTX) と同様にドネペジルもベラトリジン誘発神経細胞死に対して保護作用を示した。 Na^+ 指示薬 SBFI-AM および、 Ca^{2+} 指示薬 Fura2-AM による解析により、ベラトリジン刺激による Na^+ や Ca^{2+} の流入がドネペジルにより抑制されることが明らかになった。一方、NMDA 受容体アンタゴニストである MK801 はベラトリジン脱分極刺激に対して神経細胞保護作用を示すが、カチオン流入抑制作用を示さなかった。そこで、カチオン流入以降の神経細胞死のカスケードを明らかにする目的で、ベラトリジン刺激による興奮性アミノ酸の放出量を測定したところ、TTX および、ドネペジルは興奮性アミノ酸放出量を抑制した。したがって、ドネペジルは細胞内へのカチオン過剰流入を抑制することにより興奮性アミノ酸遊離を抑制すると結論された。

以上、著者は、アルツハイマー型認知症治療薬であるドネペジルが、興奮性アミノ酸および脱分極により誘発される神経細胞死を抑制することにより虚血性神経細胞死に対する保護作用を発現することを明らかにした。本研究の成果は、ドネペジルが脳虚血性疾患、脳虚血障害を伴う神経変性疾患に対して神経保護的に働くことを示唆するものであり、今後の神経変性疾患領域の予防薬や治療薬開発において重要な基礎的資料を提供するものである。

ふりがな
氏名

あかそ ふ しげる
赤祖父 盛

(論文審査の結果の要旨)

アルツハイマー病や脳虚血性疾患では脳神経細胞の脱落が認められ、認知機能をはじめとしたさまざまな機能障害を引き起こす。アルツハイマー病と脳血管性認知症は病態に共通する部分が多く、症状の増悪化に脳虚血による神経細胞死の関与が示唆されている。中枢型アセチルコリンエステラーゼ阻害薬であるドネペジルはアルツハイマー病患者の認知機能障害を緩和する症状改善薬として広く用いられている。しかし、アルツハイマー病の増悪化や脳血管性認知症の原因でもある虚血性神経細胞死に対するドネペジルの作用は不明であった。そこで、虚血誘発神経細胞死に対するドネペジルの作用を解明する目的で薬理学的研究を行った。

第一章 虚血性神経細胞死に対するドネペジルの保護作用

虚血性神経細胞死に対するドネペジルの作用を明らかにする目的で、ラット大脳皮質由来初代培養神経細胞を用い、ドネペジルを含む中枢型アセチルコリンエステラーゼ阻害薬の低酸素低グルコース (OGD) 負荷誘発神経細胞死に対する作用を検討した。OGD 負荷により誘発される乳酸脱水素酵素 (LDH) 遊離および神経細胞の形態変化は、ドネペジルにより著明に抑制された。一方、タクリン、リバスチグミン、ガランタミンは LDH 遊離抑制作用を示さなかった。ドネペジルの神経保護作用におけるアセチルコリン受容体の関与を検討する目的で、ムスカリン受容体拮抗薬およびニコチン受容体拮抗薬の作用を検討したが、ドネペジルの神経保護作用はこれらの薬物により影響を受けなかった。ドネペジルは OGD 負荷による神経細胞死に対する保護作用を有しており、その神経保護作用にはアセチルコリンエステラーゼ阻害活性とは異なる機序の関与が示唆された。

第二章 興奮性アミノ酸により誘発される神経細胞死に対するドネペジルの保護作用

虚血性神経細胞死は興奮性アミノ酸であるグルタミン酸受容体の活性化を介して進行すると考えられているため、ドネペジルの神経保護作用のメカニズムを探る目的で、グルタミン酸受容体アゴニストによる神経細胞死に対する作用を検討した。ドネペジルは NMDA, AMPA, カイニン酸のいずれの神経細胞死に対しても保護作用を示したが、特に NMDA に対する作用がもっとも顕著であった。ドネペジルの各グルタミン酸受容体に対するアゴニストの結合阻害活性の測定結果より、ドネペジルは NMDA 受容体のグリシン

サイトとポリアミンサイトにわずかな拮抗作用しかを示しただけであった。さらに、細胞内 Ca^{2+} 濃度に対するドネペジルの作用を明らかにする目的で NMDA 刺激時の Ca^{2+} 流入を測定した結果、ドネペジルは濃度依存的に Ca^{2+} 濃度上昇を抑制した。ドネペジルはグルタミン酸受容体に対する拮抗作用は弱い、興奮性アミノ酸誘発神経細胞死に対して神経保護作用を示すことが明らかとなり、その保護作用には細胞内 Ca^{2+} 流入抑制作用が部分的に関与することが示された。

第三章 脱分極刺激カチオン流入に対するドネペジルの作用

興奮性アミノ酸誘発神経細胞死には脱分極による細胞内カチオン過剰流入が重要な役割を果たす。ドネペジルの細胞内カチオン流入に対する作用を明らかにする目的で、ラット大脳皮質由来初代培養神経細胞を用いてベラトリジン誘発神経細胞死に対するドネペジルの作用を検討した。 Na^+ チャネル阻害薬であるテトロドトキシン(TTX)と同様にドネペジルもベラトリジン誘発神経細胞死に対して保護作用を示した。 Na^+ 指示薬 SBFI-AM および、 Ca^{2+} 指示薬 Fura2-AM による解析により、ベラトリジン刺激による Na^+ や Ca^{2+} の流入がドネペジルにより抑制されることが明らかになった。一方、NMDA 受容体アンタゴニストである MK801 はベラトリジン脱分極刺激に対して神経細胞保護作用を示すが、カチオン流入抑制作用を示さなかった。そこで、カチオン流入以降の神経細胞死のカスケードを明らかにする目的で、ベラトリジン刺激による興奮性アミノ酸の放出量を測定したところ、TTX および、ドネペジルは興奮性アミノ酸放出量を抑制した。したがって、ドネペジルは細胞内へのカチオン過剰流入を抑制することにより興奮性アミノ酸遊離を抑制すると結論された。

以上、申請者は、アルツハイマー病治療薬であるドネペジルが、興奮性アミノ酸および脱分極により誘発される神経細胞死を抑制することにより虚血性神経細胞死に対する保護作用を発現することを明らかにした。本研究の成果は、ドネペジルが脳虚血性疾患、脳虚血障害を伴う神経変性疾患に対して神経保護的に働くことを示唆するものであり、今後の神経変性疾患領域の予防薬や治療薬開発において重要な基礎的資料を提供するものである。

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。

さらに、平成21年1月20日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。