

氏名	にしもと たかあき 西本 高明
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	薬博第658号
学位授与の日付	平成20年3月24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	薬学研究科医療薬科学専攻
学位論文題目	興奮性神経毒性に対するAMPAの保護作用機序に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 赤池昭紀 教授 金子周司 教授 佐治英郎

論文内容の要旨

中枢神経系においてグルタミン酸は主要な興奮性神経伝達物質である。一方で脳虚血などの血管障害、アルツハイマー病やパーキンソン病のような神経変性疾患などの病的状況下では、グルタミン酸の神経細胞外への過剰放出によって神経細胞毒性が惹起されることが知られている。イオン透過型グルタミン酸受容体には *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体や α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate (AMPA) 受容体などが存在し、これら受容体を介した細胞毒性シグナルの研究は進歩著しい。その一方で神経変性疾患や血管障害に対する有効な治療法・治療薬は未だ見出されていない。これまでの報告で、培養神経細胞を用いた検討で、比較的低濃度のNMDAを前処置することにより、その後の高濃度グルタミン酸による細胞毒性が減弱することが示された。また、虚血モデルマウスを用いた *in vivo* での検討でも、虚血 preconditioning が虚血誘発の細胞死に対する耐性を示すことが示されている。しかし、グルタミン酸受容体刺激や虚血 preconditioning による保護効果の分子機構は明らかではない。この分子機構を解明することは、神経細胞死を誘発する各種疾患に対する根本治療薬の開発において重要な知見を提供できると考えられる。本研究において著者は、グルタミン酸誘発の細胞毒性に対する

AMPA 受容体刺激による保護効果の分子機序を検討する目的で主に細胞内シグナル伝達機構に着目して研究を進めた結果、以下の新知見を得た。

第一章 AMPA 受容体刺激によるグルタミン酸誘発細胞毒性に対する保護効果の検討

AMPA 受容体を予め刺激することがグルタミン酸誘発神経細胞死に与える影響を検討する目的で、LDH (lactate dehydrogenase) アッセイによる神経細胞毒性評価系を確立し、この系を用いて細胞毒性に対するAMPAの効果を検討した。NMDA 受容体またはAMPA 受容体拮抗薬を用いた検討では、グルタミン酸 (100 μ M) 誘発細胞毒性は主にNMDA 受容体を介していることが明らかとなった。AMPA 前処置による効果を検討したところ、AMPAの処置濃度 (0.1~10 μ M) 及び時間 (1~24時間) 依存的にグルタミン酸誘発神経細胞死が抑制された。AMPA 受容体拮抗薬のNBQXは、AMPAの保護効果を減弱した。一方、グルタミン酸処置後6時間でアポトーシスの実行因子のひとつである caspase-3の活性化が観察された。このグルタミン酸により誘発される caspase-3の活性は、AMPAの前処置により抑制された。またHoechst染色を行い観察したところ、グルタミン酸により核の凝集が引き起こされた。この凝集は、caspase-3の活性抑制剤である Ac-DEVD-CHOを前処置することで減弱したことから caspase-3依存性であることが判明した。AMPAは、このグルタミン酸による核の凝集を有意に減弱した。以上のように、1) AMPA受容体刺激はグルタミン酸誘発の細胞毒性を抑制すること、2) グルタミン酸によって誘発される細胞毒性は主に caspase-3を介するアポトーシス性のものであること、3) AMPA受容体を予め刺激することでグルタミン酸誘発のアポトーシスが抑制を受けること、を明らかとした。

第二章 AMPA 受容体刺激による保護作用機構の検討：PI3K-Akt, GSK3 β , caspase-3の関与

これまでの報告で、phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) -Aktシグナル経路の賦活あるいはAktの基質であるglycogen

synthase kinase (GSK) 3 β の不活化により、グルタミン酸誘発細胞毒性が抑制を受ける可能性が示唆されている。そこで、AMPAによる保護効果とPI3K-Akt及びGSK3 β の関与につき検討した。PI3K阻害剤であるLY294002をAMPAと同時処置することでAMPAのグルタミン酸誘発神経毒性に対する保護効果は抑制された。また、Aktの活性化型であるSer473のリン酸化がAMPA処置によって増大した。これらのことから、AMPAの保護効果にPI3K-Akt経路が関与すると考えられた。さらにGSK3 β の抑制型を意味するSer9のリン酸化が、AMPA処置により増大した。GSK3 β 阻害剤であるSB216768あるいはlithium chlorideはグルタミン酸誘発神経毒性を減弱した。さらにSB216763は、グルタミン酸により惹起されるcaspase-3の活性化を抑制した。グルタミン酸によるGSK3 β の賦活がcaspase-3の活性化、あるいは細胞死シグナルに関与することが明らかとなった。AMPAとLY294002の同時処置はGSK3 β (Ser9) のリン酸化を抑制したことから、PI3Kが上流に位置すると考えられた。またGSK3 β (Ser9) のリン酸化は、細胞死を誘発する高濃度グルタミン酸処置では減少したが、AMPAの前処置により回復した。これらの結果から、AMPAはPI3K-Akt経路を賦活、GSK3 β (Ser9) のリン酸化を増大することでGSK3 β を不活化し、神経保護効果を示すことが明らかとなった。

第三章 AMPAによる膜表面のNMDA受容体発現量変化およびCa²⁺流入制御

グルタミン酸誘発神経毒性は主にNMDA受容体を介した細胞内へのCa²⁺の過剰な流入に起因する。そこで著者は、細胞膜表面上のNMDA受容体の発現量に及ぼすAMPAの効果を検討した。

Ca²⁺指示薬であるFura2-AMを用いた検討では、グルタミン酸により誘発される細胞内へのCa²⁺流入が、AMPA前処置により抑制された。さらに、NMDA受容体のサブユニットであるNR1の細胞膜表面上の発現量が、AMPA処置で著明に減少した。

次に、AMPAによる細胞膜表面のNR1の発現量変化とGSK3 β の関係を検討した。GSK3 β 阻害剤であるSB216763 (10 μ M, 24時間) を処置したところ、細胞膜表面のNR1の発現量は著明に減少した。また、Fura2-AMを用いた検討では、SB216763の前処置でグルタミン酸による細胞内へのCa²⁺流入が減少した。すなわちGSK3 β の不活化が細胞膜表面のNR1の発現量の減少、グルタミン酸による細胞内へのCa²⁺流入の減少につながっていることを明らかにした。

AMPAはGSK3 β の活性を抑制するという第二章の結果と併せ考察すると、AMPAを処置することでGSK3 β の活性抑制が起こり、これにより細胞膜表面のNR1の発現量が減少する。その結果、グルタミン酸誘発のCa²⁺の流入が減少すると考えられた。

以上、グルタミン酸誘発神経毒性に対するAMPAの保護効果にはPI3K-Akt経路及び、GSK3 β の活性制御、さらには細胞膜表面のNR1の発現量変化が関与することを、著者は明らかとした。本研究の成果は、脳血管障害や神経変性疾患などグルタミン酸誘発神経細胞死が病態に関与する疾患に対する根本治療薬の開発において、AMPA受容体が創薬標的になり得ることを示すものである。

論文審査の結果の要旨

中枢神経系においてグルタミン酸は主要な興奮性神経伝達物質である。一方で脳虚血などの血管障害、アルツハイマー病やパーキンソン病のような神経変性疾患などの病的状況下では、グルタミン酸の神経細胞外への過剰遊離が生じ神経毒性が惹起されることが知られている。申請者は、グルタミン酸により誘発される神経毒性に対するグルタミン酸受容体サブタイプ α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxasole propionate (AMPA) 受容体刺激の保護効果の作用機序について、主に細胞内シグナル伝達機構に着目し、初代培養神経細胞系を用いた薬理学的研究を行った。

第一章 AMPA受容体刺激によるグルタミン酸誘発細胞毒性に対する保護効果の検討

AMPA受容体を予め刺激することがグルタミン酸誘発神経細胞死に与える影響を検討する目的で、LDH (lactate dehydrogenase) アッセイによる神経細胞毒性評価系を確立し、この系を用いて細胞毒性に対するAMPAの効果を検討した。AMPA前処置による効果を検討したところ、AMPAの処置濃度および時間依存的にグルタミン酸誘発神経細胞死が抑制された。AMPAによる保護作用はAMPA受容体拮抗薬により抑制された。グルタミン酸投与によりcaspase-3の活性および核の凝集といったアポトーシスの関与を示す変化が引き起こされ、これらの細胞変化AMPAの前処置により抑制され

た。グルタミン酸による核の凝集は、caspase-3の活性抑制剤である Ac-DEVD-CHO を前処置することでも抑制された。以上の結果より、AMPA 受容体刺激はグルタミン酸誘発の細胞毒性を抑制すること、グルタミン酸によって誘発される細胞毒性は主に caspase-3 を介するアポトーシス性のものであること、AMPA 受容体を予め刺激することでグルタミン酸誘発のアポトーシスが抑制されることが示された。

第二章 AMPA 受容体刺激による保護作用機構の検討：PI3K-Akt, GSK3 β , caspase-3 の関与

これまでの報告で、phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) -Aktシグナル経路の賦活あるいは Akt の基質である glycogen synthase kinase (GSK)3 β の不活化によりグルタミン酸誘発細胞毒性が抑制をされることが示唆されているので、AMPA 前処置の保護作用に対する PI3K-Akt, GSK3 β の関与について検討した。AMPA のグルタミン酸誘発神経毒性に対する保護効果は PI3K 阻害薬により抑制された。さらに、AMPA 処置により Akt の活性化型である Ser473 のリン酸化が増大した。これらの結果より、AMPA の保護効果に PI3K-Akt 経路が関与することが示唆された。一方、GSK3 β の抑制型の指標である Ser9 のリン酸化が AMPA 処置により増大し、グルタミン酸による誘発される caspase-3 の活性化および神経毒性が GSK3 β 阻害薬により抑制された。したがって、グルタミン酸による GSK3 β の賦活が caspase-3 の活性化、細胞死シグナルに関与することが示唆された。AMPA は、PI3K-Akt 経路を賦活し、GSK3 β (Ser9) のリン酸化を増大することにより GSK3 β を不活化し、神経保護効果を発現すると結論された。

第三章 AMPA による膜表面の NMDA 受容体発現量変化および Ca²⁺ 流入制御

グルタミン酸誘発神経毒性は、主に NMDA 受容体を介した細胞内への Ca²⁺ の過剰な流入を介して発現することから、細胞膜表面上の NMDA 受容体の発現量に及ぼす AMPA の効果を検討した。グルタミン酸により誘発される細胞内への Ca²⁺ 流入は AMPA 前処置により抑制された。さらに、AMPA 処置により、NMDA 受容体のサブユニットである NR1 の細胞膜表面上の発現量が著明に減少した。AMPA による細胞膜表面の NR1 の発現量変化と GSK3 β の関係を検討したところ、GSK3 β 阻害薬により細胞膜表面の NR1 の発現量は著明に減少し、グルタミン酸誘発 Ca²⁺ 流入も抑制された。本章および第二章の結果と考え合わせると、AMPA 処置により GSK3 β の活性抑制が生じ、その結果、細胞膜表面の NR1 の発現量の減少およびグルタミン酸誘発 Ca²⁺ 流入の減少が生じると結論された。

以上、申請者は、AMPA 受容体の緩和かつ持続的刺激によりによりグルタミン酸誘発神経毒性が抑制され、その保護効果には PI3K-Akt 経路の活性化と GSK3 β の活性制御が関与し、細胞膜表面の NR1 の発現量抑制が重要な役割を果たすことを明らかにした。本研究の成果は、脳血管障害や神経変性疾患などにおける神経細胞死の危険因子の一つであるグルタミン酸誘発神経細胞死において、AMPA 受容体および本受容体に連関するシグナル伝達系が、神経毒性発現の制御系として重要な役割を果たすことを示唆する。

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20年2月25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。