

|          |   |
|----------|---|
| 氏 名      | たか だ ゆ き<br>高 田 悠 記                               |
| 学位(専攻分野) | 博 士 (薬 学)   |
| 学位記番号    | 薬 博 第 577 号                                       |
| 学位授与の日付  | 平成 17 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 医療薬科学 専攻                                   |
| 学位論文題目   | アルツハイマー病治療効果を有するアセチルコリンエステラーゼ阻害薬<br>の神経保護作用に関する研究 |

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

アルツハイマー病は老年痴呆の代表的疾患であり、その病理学的特徴として、マイネルト核から大脳皮質に投射するアセチルコリンニューロンが減少し、大脳皮質におけるニコチン受容体 (nAChR) が減少することが報告されている。グルタミン酸により誘発される興奮性神経毒性は、脳虚血などの病理的条件下でのニューロン死の主要な要因の一つであり、アルツハイマー病との関連ではアミロイドβタンパク (Aβ) の神経毒性にグルタミン酸が関与することが示唆されている。Donepezilをはじめとする諸種アセチルコリンエステラーゼ (AChE) 阻害薬はアルツハイマー病治療薬として用いられているが、AChE 阻害活性と記憶学習改善作用の効力との間には相関性が見られないことが指摘されており、さらに持続的ニコチン受容体刺激が神経保護作用を発現することが報告されてきた。そこで著者は、中枢神経系に作用する AChE 阻害薬 (中枢性 AChE 阻害薬) が神経保護作用を有するか否かを明らかにする目的で、神経型 nAChR および phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) 経路に注目して検討を行い、以下の新知見を得た。

#### 第一章 ネクロシス性グルタミン酸神経毒性に対する中枢性アセチルコリンエステラーゼ阻害薬の保護作用

短時間のグルタミン酸投与により誘発される急性神経毒性に対する中枢性 AChE 阻害薬の保護作用を明らかにする目的で、ラット胎仔由来培養大脳皮質細胞を用いた研究を行い、donepezil, galanthamine, tacrine の三種の中枢性 AChE 阻害薬がグルタミン酸神経毒性に対して処置時間依存のかつ濃度依存的な保護作用を発現することを見出した。末梢性および非可逆性 AChE 阻害薬を含む種々の AChE 阻害薬の作用を検討したところ、中枢性 AChE 阻害薬はグルタミン酸神経毒性に対して強い保護作用を示した。中枢性 AChE 阻害薬の作用は nAChR 拮抗薬 mecamylamine により抑制されたが、ムスカリン受容体拮抗薬 scopolamine は影響を受けなかった。Donepezil や galanthamine の神経保護作用は  $\alpha 4\beta 2$ -nAChR 拮抗薬 dihydro- $\beta$ -erythroidine (DH $\beta$ E) および  $\alpha 7$ -nAChR 拮抗薬 methyllycaconitine (MLA) により抑制されたが、tacrine の保護作用はこれらの拮抗薬による影響を受けなかった。また、これら三種の AChE 阻害薬はグルタミン酸およびカルシウムイオノフォアである ionomycin 誘発の神経毒性に対して保護作用を示した。一方、NO ドナーの S-nitrosocysteine により誘発される神経毒性に対しては tacrine のみが保護作用を示した。これらの結果より、中枢性 AChE 阻害薬は nAChR を介してグルタミン酸神経毒性を抑制し、donepezil および galanthamine の保護作用には  $\alpha 4\beta 2$ -および  $\alpha 7$ -nAChR が重要な役割を果たすことが示された。

#### 第二章 アポトーシス性グルタミン酸神経毒性に対する中枢性アセチルコリンエステラーゼ阻害薬の保護作用

グルタミン酸は投与条件によりネクロシスとアポトーシスの両者を誘発することが報告されている。グルタミン酸により誘発されるアポトーシスに対する中枢性 AChE 阻害薬の作用を明らかにする目的で、培養大脳皮質細胞に低濃度のグルタミン酸を 24 時間投与することにより誘発される核の断片化とニューロン死を観察した。この神経毒性は、タンパク合成阻害薬 cycloheximide, RNA 合成阻害薬 actinomycin D および caspase-3 阻害薬 DEVD によって抑制されたことより、低濃度長時間のグルタミン酸投与による神経毒性にはアポトーシスが関与することが示された。三種の中枢性 AChE 阻害薬は

いずれも、グルタミン酸誘発アポトーシス性神経毒性に対して24時間までの前処置時間依存的かつ濃度依存的な保護作用を示した。ネクローシス性グルタミン酸神経毒性に対する作用と同様に、これらの AChE 阻害薬の保護作用は mecamylamine によって抑制されたが、scopolamine は影響を受けなかった。さらに、donepezil や galanthamine の神経保護作用は DH $\beta$ E および MLA により抑制されたが、tacrine の保護作用はこれらの拮抗薬による影響を受けなかった。

ニューロトロフィンやニコチンによるニューロン生存促進作用には、PI3K シグナル経路の関与が示唆されている。ニコチン受容体を介する AChE 阻害薬の神経保護作用機序を解明する目的で、三種の AChE 阻害薬の保護作用における PI3K 経路の関与について検討を行った。その結果、donepezil および galanthamine の保護作用は PI3K 阻害薬 wortmannin および LY294002 により抑制され、非受容体型チロシンキナーゼ阻害薬である PP2 および AG490 によっても抑制されたが、MAPKK 阻害薬である PD98059 では抑制されなかった。Donepezil や galanthamine とは対照的に、tacrine の保護作用はこれらの阻害薬による影響を受けなかった。以上の結果より、中枢性 AChE 阻害薬は nAChR を介してグルタミン酸により誘発されるアポトーシス性の神経毒性を抑制し、donepezil や galanthamine は  $\alpha$ 4 $\beta$ 2- および  $\alpha$ 7-nAChR を介して保護作用を発現すること、さらに、donepezil と galanthamine の神経保護作用にはニコチンと同様に PI3K 経路が重要な役割を果たすことが示唆された。

以上、著者は、培養大脳皮質細胞においてグルタミン酸によるネクローシス性およびアポトーシス性の神経毒性に対して中枢性 AChE 阻害薬が神経型 nAChR を介して保護作用を示すことを明らかにした。さらに、donepezil および galanthamine の保護作用には  $\alpha$ 4 $\beta$ 2- および  $\alpha$ 7-nAChR が関与し、その作用機序には PI3K 経路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、アルツハイマー病治療薬の新たな作用機序を明らかにするとともに、ニューロン死を標的とした新規アルツハイマー病治療薬の開発において有用な基礎的資料を提供するものであると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

アルツハイマー病は老年痴呆の代表的疾患であり、その病理学的特徴として、マイネルト核から大脳皮質に投射するアセチルコリンニューロンが減少し、大脳皮質におけるニコチン受容体 (nAChR) が減少することが報告されている。グルタミン酸により誘発される興奮性神経毒性は、脳虚血などの病理的条件下でのニューロン死の主要な要因の一つであり、アルツハイマー病との関連ではアミロイド  $\beta$  タンパク ( $A\beta$ ) の神経毒性にグルタミン酸が関与することが示唆されている。Donepezil をはじめとする諸種アセチルコリンエステラーゼ (AChE) 阻害薬はアルツハイマー病治療薬として用いられているが、AChE 阻害活性と記憶学習改善作用の効力との間には相関性が見られないことが指摘されており、さらに持続的ニコチン受容体刺激が神経保護作用を発現することが報告されてきた。そこで著者は、中枢神経系に作用する AChE 阻害薬 (中枢性 AChE 阻害薬) が神経保護作用を有するか否かを明らかにする目的で、神経型 nAChR および phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) 経路に注目して検討を行い、以下の新知見を得た。

### 第一章 ネクローシス性グルタミン酸神経毒性に対する中枢性アセチルコリンエステラーゼ阻害薬の保護作用

短時間のグルタミン酸投与により誘発される急性神経毒性に対する中枢性 AChE 阻害薬の保護作用を明らかにする目的で、ラット胎仔由来培養大脳皮質細胞を用いた研究を行い、donepezil, galanthamine, tacrine の三種の中枢性 AChE 阻害薬がグルタミン酸神経毒性に対して処置時間依存的かつ濃度依存的な保護作用を発現することを見出した。末梢性および非可逆性 AChE 阻害薬を含む種々の AChE 阻害薬の作用を検討したところ、中枢性 AChE 阻害薬はグルタミン酸神経毒性に対して強い保護作用を示した。中枢性 AChE 阻害薬の作用は nAChR 拮抗薬 mecamylamine により抑制されたが、ムスカリン受容体拮抗薬 scopolamine は影響を受けなかった。Donepezil や galanthamine の神経保護作用は  $\alpha$ 4 $\beta$ 2-nAChR 拮抗薬 dihydro- $\beta$ -erythroidine (DH $\beta$ E) および  $\alpha$ 7-nAChR 拮抗薬 methyllycaconitine (MLA) により抑制されたが、tacrine の保護作用はこれらの拮抗薬による影響を受けなかった。また、これら三種の AChE 阻害薬はグルタミン酸およびカルシウムイオノフォアである ionomycin 誘発の神経毒性に対して保護作用を示した。一方、NO ドナーの S-nitrosocysteine により誘発される神経毒性に対しては tacrine のみが保護作用を示した。これらの結果より、中枢性 AChE 阻害薬は nAChR を介してグルタミン酸神経毒性を抑制し、donepezil および galanthamine の保護作用には  $\alpha$ 4 $\beta$ 2- および  $\alpha$ 7-nAChR が重要な役割を果たすことが示された。

## 第二章 アポトーシス性グルタミン酸神経毒性に対する中枢性AChE阻害薬の保護作用

グルタミン酸は投与条件によりネクローシスとアポトーシスの両者を誘発することが報告されている。グルタミン酸により誘発されるアポトーシスに対する中枢性AChE阻害薬の作用を明らかにする目的で、培養大脳皮質細胞に低濃度のグルタミン酸を24時間投与することにより誘発される核の断片化とニューロン死を観察した。この神経毒性は、タンパク合成阻害薬 cycloheximide, RNA 合成阻害薬 actinomycin D および caspase-3阻害薬 DEVD によって抑制されたことより、低濃度長時間のグルタミン酸投与による神経毒性にはアポトーシスが関与することが示された。三種の中枢性AChE阻害薬はいずれも、グルタミン酸誘発アポトーシス性神経毒性に対して24時間までの前処置時間依存的かつ濃度依存的な保護作用を示した。ネクローシス性グルタミン酸神経毒性に対する作用と同様に、これらのAChE阻害薬の保護作用は mecamylamine によって抑制されたが、scopolamine は影響を受けなかった。さらに、donepezil や galanthamine の神経保護作用は DH $\beta$ E および MLA により抑制されたが、tacrine の保護作用はこれらの拮抗薬による影響を受けなかった。

ニューロトロフィンやニコチンによるニューロン生存促進作用には、PI3Kシグナル経路の関与が示唆されている。ニコチン受容体を介するAChE阻害薬の神経保護作用機序を解明する目的で、三種のAChE阻害薬の保護作用におけるPI3K経路の関与について検討を行った。その結果、donepezil および galanthamine の保護作用はPI3K阻害薬 wortmannin および LY294002 により抑制され、非受容体型チロシンキナーゼ阻害薬である PP2 および AG490 によっても抑制されたが、MAPKK阻害薬である PD98059 では抑制されなかった。Donepezil や galanthamine とは対照的に、tacrine の保護作用はこれらの阻害薬による影響を受けなかった。以上の結果より、中枢性AChE阻害薬はnAChRを介してグルタミン酸により誘発されるアポトーシス性の神経毒性を抑制し、donepezil や galanthamine は  $\alpha$ 4 $\beta$ 2- および  $\alpha$ 7-nAChR を介して保護作用を発現すること、さらに、donepezil と galanthamine の神経保護作用にはニコチンと同様にPI3K経路が重要な役割を果たすことが示唆された。

以上、著者は、培養大脳皮質細胞においてグルタミン酸によるネクローシス性およびアポトーシス性の神経毒性に対して中枢性AChE阻害薬が神経型nAChRを介して保護作用を示すことを明らかにした。さらに、donepezil および galanthamine の保護作用には  $\alpha$ 4 $\beta$ 2- および  $\alpha$ 7-nAChR が関与し、その作用機序にはPI3K経路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、アルツハイマー病治療薬の新たな作用機序を明らかにするとともに、ニューロン死を標的とした新規アルツハイマー病治療薬の開発において有用な基礎的資料を提供するものであると考えられる。

よって、本論文は博士(薬学)の論文として価値あるものとして認める。

更に、平成17年3月3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。