

氏名	おかみちこ 岡美智子
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	論薬博第 725 号
学位授与の日付	平成 17 年 1 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	虚血性ニューロン死における電位依存性 Ca^{2+} チャネル $\alpha_2\delta$ サブユニットの役割に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 赤池昭紀 教授 金子周司 教授 辻本豪三

論文内容の要旨

脳虚血により誘発されるニューロン死には、電位依存性 Ca^{2+} チャネル (Ca^{2+} チャネル) のが関与することが知られている。 Ca^{2+} チャネルは α_1 , $\alpha_2\delta$, β および γ からなる複数のサブユニットで構成されており、チャネルポアは α_1 サブユニット単独で形成され、これまで開発されてきたカルシウム拮抗薬の多くは α_1 サブユニットを作用点としたものであった。一方、 $\alpha_2\delta$ サブユニットを含むそれ以外のサブユニットは、 α_1 サブユニットの制御系として働くと推定されてきたが、 Ca^{2+} チャネル活性化機構における機能的役割は不明な点が多かった。そこで、申請者は虚血性ニューロン死における $\alpha_2\delta$ サブユニットの役割を明らかにする目的で、培養大脳皮質ニューロンならびに大脳皮質切片を用いた薬理学的研究を行い、以下の新知見を得た。

第一章 脱分極誘発性 Ca^{2+} 流入における Ca^{2+} チャネル $\alpha_2\delta$ サブユニットの役割

Ca^{2+} チャネル活性化における $\alpha_2\delta$ サブユニットの役割を明らかにする目的で、脱分極刺激による Ca^{2+} チャネルを介した細胞内 Ca^{2+} 濃度の変動を解析した。細胞内 Ca^{2+} 濃度の変動の指標として、cGMP 量を測定した。L-型 Ca^{2+} チャネルサブタイプを高発現する培養ヒトアストロサイト細胞に、高濃度 KCl で脱分極刺激を加えることにより、細胞内 cGMP 量 ($[cGMP]_i$) の増加が観察され、この反応は Ca^{2+} キレート剤、一酸化窒素合成酵素 (NOS) 阻害薬、カルモジュリン阻害薬、NO スカベンジャーおよび L-型カルシウム拮抗薬によりそれぞれ抑制された。この結果、L-型 Ca^{2+} チャネルを介した細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加が、 Ca^{2+} /カルモジュリン依存性酵素である NOS を活性化し、生成した NO が可溶性グアニル酸シクラーゼに作用して、 $[cGMP]_i$ を増加させることが示された。そこで、この評価系を用い、マウス培養大脳皮質ニューロンを KCl 脱分極刺激することにより、 $\alpha_2\delta$ サブユニットの役割を検討した。KCl 脱分極刺激誘発性 $[cGMP]_i$ の増加反応は、N-型のカルシウム拮抗薬である ω -conotoxin GVIA により影響されず、L-型の拮抗薬 nifedipine および P/Q-型の拮抗薬である ω -agatoxin IVA によりいずれも 50% 程度抑制された。一方、 Ca^{2+} チャネルの制御サブユニットとして推定されている $\alpha_2\delta$ サブユニットに対して高親和性に結合する代表的薬物の gabapentin は、KCl 脱分極刺激によって増加した $[cGMP]_i$ をほぼ完全に抑制した。さらに、 ω -agatoxin IVA あるいは nifedipine 存在下で KCl 脱分極刺激を行うことにより、L-型あるいは P/Q-型 Ca^{2+} チャネルの活性化を介する $[cGMP]_i$ の増加に対する gabapentin の作用を検討した。L-型および P/Q-型 Ca^{2+} チャネルの関与した $[cGMP]_i$ の増加は、いずれも gabapentin により完全に抑制された。これらの培養細胞では、N-型 Ca^{2+} チャネルを介する反応が得られなかったことから、ラット大脳皮質切片を用い、N-型 Ca^{2+} チャネルを介する $[cGMP]_i$ の増加に対する gabapentin の作用を検討した。Gabapentin は、nifedipine および ω -agatoxin IVA 共存下で誘発される N-型 Ca^{2+} チャネルを介する KCl 脱分極刺激応答を抑制した。これらの結果より、L-型、P/Q-型および N-型 Ca^{2+} チャネルの活性化に対して、 $\alpha_2\delta$ サブユニットは正の調節的役割を担っていることが示唆された。

第二章 虚血性ニューロン死における Ca^{2+} チャネルの関与と $\alpha_2\delta$ サブユニットの役割

脳虚血により誘発されるニューロン死における $\alpha_2\delta$ サブユニットの役割を明らかにする目的で、ラット大脳皮質切片を用いた一過性人工虚血処置によるニューロン死の発現機構を検討した。緩和な障害モデルとして低酸素/低グルコース (3

mM) 処置, 重度の障害モデルとして低酸素/無グルコース処置の2種類の処置を行った。これらの人工虚血処置により, ATPの減少, 組織外へのグルタミン酸の放出および乳酸脱水素酵素(LDH)の漏出が増加した。低酸素/低グルコース(3 mM) 処置によるLDH漏出に対し, ω -agatoxin IVA, ω -conotoxin GVIA および gabapentin はそれぞれ保護的に作用したが, nifedipine は抑制効果を示さなかった。これに対して, 低酸素/無グルコース処置による大量のLDH漏出は, ω -conotoxin GVIA および ω -agatoxin IVA により軽度に抑制され, gabapentin および nifedipine では抑制されなかった。そこで, 重度障害モデルにおけるNO関連ラジカルの関与を解析した。その結果, NOS阻害薬, ONOO⁻スカベンジャーおよびOH[•]スカベンジャーはいずれもLDH漏出を抑制した。これらの結果より, 緩和な障害にわたるニューロン死には, N-型およびP/Q-型Ca²⁺チャネルの活性化が関与し, $\alpha_2\delta$ サブユニットを介した両Ca²⁺チャネルの調節が神経保護に有効であることが示された。一方, 重度障害におけるニューロン死には, NO神経毒性が関与することが示唆された。

以上, 著者は, ニューロンに高発現するN-型, L-型およびP/Q-型の3種類のCa²⁺チャネルにおいて, $\alpha_2\delta$ サブユニットが正の制御因子として働くこと, また $\alpha_2\delta$ サブユニットの機能を制御することにより, 主としてN-型およびP/Q-型Ca²⁺チャネルが抑制され, 虚血性ニューロン死が抑制されることを示した。本研究の成果は虚血性ニューロン死の機構解明に有用な知見となるとともに, 脳卒中, 老年性痴呆など虚血性神経変性疾患の治療薬開発の重要な基礎的資料となるものである。

論文審査の結果の要旨

脳虚血により誘発されるニューロン死には, 電位依存性Ca²⁺チャネル(Ca²⁺チャネル)が関与することが知られている。Ca²⁺チャネルは α_1 , $\alpha_2\delta$, β および γ からなる複数のサブユニットで構成されており, $\alpha_2\delta$ サブユニットは α_1 サブユニットの制御系として働くと推定されてきたが, Ca²⁺チャネル活性化機構における機能的役割は不明な点が多かった。そこで, 申請者は虚血性ニューロン死における $\alpha_2\delta$ サブユニットの役割を明らかにする目的で, 培養大脳皮質ニューロンならびに大脳皮質切片を用いた研究を行った。

第一章 脱分極誘発性Ca²⁺流入におけるCa²⁺チャネル $\alpha_2\delta$ サブユニットの役割

Ca²⁺チャネル活性化における $\alpha_2\delta$ サブユニットの役割を明らかにする目的で, 脱分極刺激によるCa²⁺チャネルを介した細胞内Ca²⁺濃度の変動を解析した。L-型Ca²⁺チャネルサブタイプを高発現する培養ヒトアストロサイト細胞に, 高KClで脱分極刺激を加えることにより, 細胞内cGMP量([cGMP]_i)の増加が観察され, この反応はCa²⁺キレート剤, 一酸化窒素合成酵素(NOS)阻害薬, カルモジユリン阻害薬, NOスカベンジャーおよびL-型カルシウム拮抗薬により抑制された。そこで, この評価系を用い, マウス培養大脳皮質ニューロンをKCl脱分極刺激することにより, $\alpha_2\delta$ サブユニットの役割を検討した。KCl脱分極刺激誘発性[cGMP]_i増加反応は, N-型のカルシウム拮抗薬 ω -conotoxin GVIAにより影響されず, L-型の拮抗薬nifedipine およびP/Q-型の拮抗薬 ω -agatoxin IVAにより部分的に抑制された。一方, $\alpha_2\delta$ サブユニットに対して高親和性に結合するgabapentinは, KCl脱分極刺激によって増加した[cGMP]_iをほぼ完全に抑制した。さらに, L-型およびP/Q-型でCa²⁺チャネルの関与した[cGMP]_iの増加は, いずれもgabapentinにより完全に抑制された。次いで, ラット大脳皮質切片を用い, N-型Ca²⁺チャネルを介する[cGMP]_iの増加に対するgabapentinの作用を検討した結果, gabapentinは, nifedipine および ω -agatoxin IVA 共存下で誘発されるN-型Ca²⁺チャネルを介するKCl脱分極刺激応答を抑制した。これらの結果より, L-型, P/Q-型およびN-型Ca²⁺チャネルの活性化に対して, $\alpha_2\delta$ サブユニットは正の調節的役割を担っていることが示唆された。

第二章 虚血性ニューロン死におけるCa²⁺チャネルの関与と $\alpha_2\delta$ サブユニットの役割

脳虚血により誘発されるニューロン死における $\alpha_2\delta$ サブユニットの役割を明らかにする目的で, ラット大脳皮質切片を用いた一過性人工虚血処置によるニューロン死の発現機構を検討した。緩和な障害モデルとして低酸素/低グルコース処置, 重度の障害モデルとして低酸素/無グルコース処置の2種類の処置を行った。これらの人工虚血処置により, ATPの減少, 組織外へのグルタミン酸の放出および乳酸脱水素酵素(LDH)の漏出が生じた。低酸素/低グルコース処置によるLDH漏出に対し, ω -agatoxin IVA, ω -conotoxin GVIA および gabapentin はそれぞれ保護的に作用したが, nifedipine は抑制効果を示さなかった。これに対して, 低酸素/無グルコース処置による大量のLDH漏出は, ω -conotoxin GVIA および

ω -agatoxin IVAにより軽度に抑制され、gabapentinおよびnifedipineでは抑制されなかった。そこで、重度障害モデルにおけるNO関連ラジカルの関与を解析した結果、NOS阻害薬、ONOO⁻スカベンジャーおよびOH[·]スカベンジャーがLPH漏出を抑制した。これらの結果より、緩和な障害におけるニューロン死には、N-型およびP/Q-型Ca²⁺チャネルの活性化が関与し、 $\alpha_2\delta$ サブユニットを介した両Ca²⁺チャネルの調節が神経保護に有効であることが示された。一方、重度障害におけるニューロン死には、NO神経毒性が関与することが示唆された。

以上、申請者は、ニューロンに高発現するN-型、L-型およびP/Q-型の3種類のCa²⁺チャネルにおいて、 $\alpha_2\delta$ サブユニットが正の制御因子として働くこと、さらに、 $\alpha_2\delta$ サブユニットの機能を制御することにより主としてN-型およびP/Q-型Ca²⁺チャネルの抑制を介して虚血性ニューロン死が抑制されることを明らかにした。本研究の成果は虚血性ニューロン死の機構解明に有用な知見となるとともに、脳卒中、老年性痴呆など虚血性神経変性疾患の治療薬開発の重要な基礎的資料となるものである。

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16年11月17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。