

氏 名 しま づ せい いちろう  
島 津 誠 一 郎  
学位の種類 博 士 (薬 学)  
学位記番号 論 薬 博 第 694 号  
学位授与の日付 平 成 15 年 5 月 23 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 中 脳 下 パ ミ ン ニ ュ ー ロ ン 死 を 標 的 と し た パ ー キ ン ソ ン 病 治 療 薬 に 関 す る  
神 經 薬 理 学 的 研 究

論文調査委員 (主 査) 教 授 赤 池 昭 紀 教 授 佐 藤 公 道 教 授 佐 治 英 郎

### 論 文 内 容 の 要 旨

パーキンソン病は、振戦・無動・筋硬直などの運動障害を主症状とし、中脳黒質緻密部ドパミンニューロン死を特徴とする神経変性疾患である。中脳ドパミンニューロンの変性・脱落を阻止する薬物を開発することはパーキンソン病の予防・治療において重要な役割を果たすが、既存のパーキンソン病治療薬はドパミン系の賦活作用あるいはムスカリン性アセチルコリン系の抑制作用を主作用とするものであり、神経保護作用を主作用とする薬物の開発が待たれている。そこで、申請者は中脳ドパミンニューロン死の危険因子として興奮性アミノ酸による神経毒性に着目し、中脳黒質の切片培養法を確立して興奮性アミノ酸によるドパミンニューロン死の機序と細胞死を制御する薬物に関する研究を行い、以下の新知見を得た。

#### 第一章 中脳切片培養法の確立とドパミンニューロンにおける興奮性神経毒性の解析

ラット新生仔から摘出した脳切片を用いた静置界面切片培養法を確立し、はじめに中脳ドパミンニューロンの神経投射の性質を検討した。中脳と線条体を接触して共培養すると中脳から線条体に多数のドパミン神経線維の投射が観察されたが、小脳との接触共培養あるいは線条体との非接触培養ではこのような神経投射は生じなかった。そこで、切片培養法により維持された中脳ドパミンニューロンに対する*N*-methyl-D-aspartate (NMDA)の神経毒性について検討した。NMDAは中脳単独培養においてドパミンニューロンに対する濃度依存的な神経毒性を発現し、その作用はNMDA受容体拮抗薬MK-801により抑制された。中脳と線条体を接触共培養すると、中脳単独培養の場合と比較して、NMDAのドパミンニューロンに対する神経毒性は減弱した。一方、中脳-小脳接触共培養および中脳-線条体非接触共培養では、このようなNMDA神経毒性の減弱効果はみられなかった。したがって、中脳ドパミンニューロンは、その標的部位である線条体への神経投射により、NMDA神経毒性に対する抵抗性を獲得することが示唆された。

#### 第二章 中脳ドパミンニューロンに対するドパミン系賦活薬の保護作用

選択的B型モノアミンオキシダーゼ (MAO<sub>B</sub>) 阻害薬である (-)-deprenylは、ドパミン系の賦活作用を示すことからパーキンソン病治療薬として用いられている。さらに、種々の細胞系において (-)-deprenylがアポトーシス抑制作用を示すことが報告されてきた。そこで、第1章で確立した中脳切片培養系を用い、ドパミンニューロンにおけるNMDA細胞毒性に対する (-)-deprenylの作用を検討した。中脳単独培養において、(-)-deprenylはNMDAと同時投与することにより、濃度依存的にドパミンニューロンに対するNMDA細胞毒性を抑制した。MAO<sub>B</sub>阻害活性をもたない (+)-deprenylも、(-)-deprenylより効力は弱いもののNMDA毒性に対する保護作用を示した。(-)-deprenylは前処置を行っただけではNMDA毒性を抑制せず、さらに過酸化水素により誘発される神経毒性も抑制しなかった。これらの結果より、(-)-deprenylのNMDA神経毒性に対する保護作用はMAO<sub>B</sub>阻害作用や過酸化水素の無毒化とは関連しないことが示され、(-)-deprenylのもつ抗アポトーシス作用などの細胞保護作用によりドパミンニューロンにおける興奮性神経毒性を抑制することが示唆された。次いで、(-)-deprenylの誘導體で、神経保護作用を有することが確認されている (-)-1-(benzofuran-2-yl)-2-propylaminopentaneについてパーキンソン病モデルに対する行動改善作用を検討したところ、ラ

ットを用いた動物実験モデルにおけるパーキンソン様症状に対して改善作用を示すことが明らかになった。

以上のように、ドパミン系賦活作用に加えて神経保護作用を有する化合物がドパミンニューロン死を標的としたパーキンソン病治療薬の有力な候補化合物となると結論される。

### 第三章 中脳ドパミンニューロンに対する $\sigma$ 受容体リガンドの保護作用

$\sigma$ 受容体はオーファン受容体で生体内に広く分布し、精神疾患や痴呆との関連が指摘されてきている。そこで、中脳切片の単独培養系を用いて、諸種 $\sigma$ 受容体リガンドのドパミンニューロンにおける興奮性神経毒性に対する作用を検討した。 $\sigma$ 受容体に高親和性に結合するifenprodilおよびhaloperidolはNMDA神経毒性を顕著に抑制した。 $\sigma_1$ 受容体の選択的リガンドである (+)-SKF 10047およびphencyclidine結合部位に親和性を持たない $\sigma$ 受容体選択的リガンドの (-)-PPAPもNMDA神経毒性を抑制した。一方、これらの $\sigma$ 受容体リガンドは、カルシウムイオノフォアのイオノマイシンの神経毒性は抑制しなかった。これらの結果より、 $\sigma$ 受容体リガンドはNMDA受容体機能を抑制することにより、中脳ドパミンニューロンにおけるNMDA細胞毒性に対する保護作用を発現することが示唆された。

以上、著者は、*in vivo*に近い培養系として中脳の切片培養法を確立し、線条体への神経投射により中脳ドパミンニューロンの生存が促進されること、さらに、(-)-deprenylおよび $\sigma$ リガンドがドパミンニューロンに対する保護作用を発現することを明らかにした。本研究の結果は、パーキンソン病におけるドパミンニューロン死の制御に基づく新規な予防・治療薬の開発のための重要な基礎的資料を提供するとともに、ドパミンニューロンの生存維持機構の解明に対する有用な知見となるものである。

## 論文審査の結果の要旨

中脳ドパミンニューロンの変性・脱落を阻止する薬物を開発することはパーキンソン病の予防・治療において重要な役割を果たすが、既存のパーキンソン病治療薬はドパミン系の賦活作用あるいはムスカリン性アセチルコリン系の抑制作用を主作用とするものであり、神経保護作用を主作用とする薬物の開発が待たれている。本論文は、中脳ドパミンニューロン死の危険因子として興奮性アミノ酸による神経毒性に着目し、中脳黒質の切片培養法を確立して興奮性アミノ酸によるドパミンニューロン死の機序と細胞死を制御する薬物に関する研究を行ったものである。

著者は、まず、ラット新生仔から摘出した脳切片を用いた静置界面切片培養法を確立し、中脳ドパミンニューロンの神経投射の性質を検討した。中脳と線条体を接触して共培養すると中脳から線条体に多数のドパミン神経線維の投射が観察されたが、小脳との接触共培養あるいは線条体との非接触培養ではこのような神経投射は生じなかった。切片培養法により維持された中脳ドパミンニューロンに対するN-methyl-D-aspartate (NMDA)の神経毒性について検討した。NMDAは中脳単独培養においてドパミンニューロンに対する濃度依存的な神経毒性を発現し、その作用はNMDA受容体拮抗薬MK-801により抑制された。中脳と線条体を接触共培養すると、中脳単独培養の場合と比較して、NMDAのドパミンニューロンに対する神経毒性は減弱した。一方、中脳-小脳接触共培養および中脳-線条体非接触共培養では、このようなNMDA神経毒性の減弱効果はみられなかった。したがって、中脳ドパミンニューロンは、その標的部位である線条体への神経投射により、NMDA神経毒性に対する抵抗性を獲得することが示唆された。

上記の基礎的研究成果に基づいて、ドパミンニューロンにおけるNMDA細胞毒性に対する選択的B型モノアミンオキシダーゼ (MAOB) 阻害薬 (-)-deprenylの作用を検討した。中脳単独培養において、(-)-deprenylはNMDAと同時投与することにより、濃度依存的にドパミンニューロンに対するNMDA細胞毒性を抑制した。MAOB阻害活性をもたない (+)-deprenylも、(-)-deprenylより効力は弱いもののNMDA毒性に対する保護作用を示した。(-)-deprenylは前処置を行っただけではNMDA毒性を抑制せず、さらに過酸化水素により誘発される神経毒性も抑制しなかった。これらの結果より、(-)-deprenylのNMDA神経毒性に対する保護作用はMAOB阻害作用や過酸化水素の無毒化とは関連しないことが示され、(-)-deprenylのもつ抗アポトーシス作用などの細胞保護作用によりドパミンニューロンにおける興奮性神経毒性を抑制することが示唆された。(-)-deprenylの誘導體で、神経保護作用を有することが確認されている (-)-1-(benzofuran-2-yl)-2-propylaminopentaneについてパーキンソン病モデルに対する行動改善作用を検討したところ、ラットを用いた動物実験モデルにおけるパーキンソン様症状に対して改善作用を示すことが明らかになった。

次いで、中枢神経系に広く分布し精神疾患や痴呆との関連が指摘されてきている $\sigma$ 受容体の選択的リガンドのドパミンニューロンにおける興奮性神経毒性に対する作用を検討した。 $\sigma$ 受容体に高親和性に結合するifenprodilおよびhaloperidolはNMDA神経毒性を顕著に抑制した。 $\sigma_1$ 受容体の選択的リガンドである(+)-SKF 10047およびphen-cyclidine結合部位に親和性を持たない $\sigma$ 受容体選択的リガンドの(-)-PPAPもNMDA神経毒性を抑制した。一方、これらの $\sigma$ 受容体リガンドは、カルシウムイオノフォアのイオノマイシンの神経毒性は抑制しなかった。これらの結果より、 $\sigma$ 受容体リガンドはNMDA受容体機能を抑制することにより、中脳ドパミンニューロンにおけるNMDA細胞毒性に対する保護作用を発現することが示唆された。

以上、本研究は、*in vivo*に近い培養系として中脳の切片培養法を確立し、線条体への神経投射により中脳ドパミンニューロンの生存が促進されること、(-)-deprenylおよび $\sigma$ リガンドがドパミンニューロンに対する保護作用を発現することを明らかにしたものである。これらの知見は、パーキンソン病におけるドパミンニューロン死の制御に基づく新規な予防・治療薬の開発のための重要な基礎的資料を提供するとともに、ドパミンニューロンの生存維持機構の解明に対する有用な情報を与えるものと評価される。

よって、本論文は博士(薬学)の論文として価値あるものと認める。

更に、平成15年4月28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。