

氏名	うえだよしこ 上田佳子
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	論薬博第633号
学位授与の日付	平成12年9月25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	神経栄養因子様作用物質の脳梗塞治療薬としての可能性に関する薬理学的研究
論文調査委員	(主査) 教授 佐藤公道 教授 赤池昭紀 教授 伊藤信行

論文内容の要旨

現在、脳梗塞の治療として血栓等の原因を除去する薬物治療が行われているが、神経細胞を虚血による損傷から保護する作用はなく、その結果、引き起こされる後遺症が問題となる。そのため、虚血により起こる脳梗塞から神経細胞を保護する治療薬の出現が望まれている。著者は、神経細胞死を防ぎ神経突起伸展を促すという神経栄養因子が持つ作用に着目し、虚血から神経細胞を保護し損傷を受けた神経細胞の機能を修復できる脳梗塞治療薬の創出を目指して基礎的研究を行ない、以下の新知見を得た。

第1章 神経細胞とアストロサイト相互作用検出のための co-culture 法

神経細胞と神経栄養因子の産生が報告されているアストロサイトとの相互作用を簡便に検出できる co-culture 法を考案した。この方法を用いて、アストロサイトの産生する物質がマウス胎仔培養神経細胞の生存を維持及び神経突起伸展を促し、更に、伸展した神経突起は互いにネットワークを構築していることを確認した。この結果から、脳虚血時にアストロサイトの産生する神経栄養因子は、神経細胞死を防ぐと共に神経突起のネットワーク再構築により失われた神経細胞の機能修復に貢献する可能性が示唆される。

第2章 神経栄養因子様作用を持つ化合物の簡便探索法の構築と FR115427 の発見

これまで見出された蛋白性の神経栄養因子は脳への移行に問題があり、末梢投与で有効な脳梗塞の治療薬になりうるには、神経栄養因子様作用を持つ非蛋白性の低分子化合物を見出す必要がある。そのため、まず、培養神経細胞の生存を維持する化合物を簡便にスクリーニングできる方法について検討した。従来の培養神経細胞数を測定する方法は、顕微鏡下の目視により細胞数を数えていたため、手間と時間がかかりスクリーニング方法として難点があった。そこで、細胞内在の acid phosphatase 活性を測定することにより簡便に生存神経細胞数を推定できる新しい比色定量法、acid phosphatase 法 (AP 法) を確立した。次に、この AP 法を用いて神経細胞の生存を維持する化合物を探索した結果、低分子化合物 FR115427 及び MK801 にその作用のあることを見出した。

第3章 FR115427 の神経栄養因子様作用と NMDA レセプター拮抗作用との関連

FR115427 及び MK801 は生存維持作用を持つだけでなく神経突起伸展も認められ、神経栄養因子様作用を持つ化合物であることが判明した。ところで、FR115427 及び MK801 は共に NMDA レセプター拮抗作用を持っている。脳虚血になると、NMDA レセプターを介して過剰なカルシウムが神経細胞内に流入し細胞死に至ると考えられており、その拮抗薬は神経細胞死を抑制することが報告されていることから、神経栄養因子様作用と NMDA レセプター拮抗作用の関連が考えられる。しかし、NMDA レセプター拮抗作用が FR115427 より強力な CGS19755 及び APH に神経栄養因子様作用が認められなかったため、FR115427 及び MK801 の神経栄養因子様作用は NMDA レセプターを介して発現したものではないと推論できる。

第4章 イソキノリン骨格と神経栄養因子様作用との関連

FR115427 及び MK801 は共にイソキノリン骨格を母核とした化学構造であることから、イソキノリン骨格が両化合物の

神経栄養因子様作用の発現に関与している可能性が推察される。そこで、イソキノリン骨格を母核とする4種類のFR115427誘導体について神経栄養因子様作用を検討した結果、いずれも神経栄養因子様作用を持つことが判明した。従って、これら化合物が共通に持つイソキノリン骨格部分が神経栄養因子様作用発現に関与する可能性が考えられる。

第5章 FR115427の*in vivo*における薬理作用

培養神経細胞を用いた実験系で神経栄養因子様作用が認められたFR115427及びMK801について、脳虚血動物モデルを用いて*in vivo*での神経細胞保護作用を検討した。両化合物とも末梢投与により砂ネズミ両側総頸動脈結紮モデルでの海馬CA1神経細胞死抑制作用及びラット中大脳動脈永久結紮モデルでの梗塞巣縮小作用を発現した。一方、NMDAレセプター拮抗作用はあるが培養神経細胞系での神経栄養因子様作用が認められなかったCGS19755は、FR115427と同等の脳内NMDAレセプター拮抗作用が推察できるにもかかわらず、両虚血モデルにおける神経細胞保護作用はFR115427に比し弱かった。これらの結果から、NMDA拮抗作用よりも神経栄養因子様作用が動物脳虚血モデルでの神経細胞保護作用発現に重要であることが強く示唆される。

以上の結果から、神経栄養因子様作用を持つ非蛋白性低分子化合物が末梢投与で有効な後遺症も軽減できる脳梗塞治療薬になる可能性、及び、神経栄養因子様作用の発現にはイソキノリン骨格の存在が重要であることを指摘した。これらの知見は新しい脳梗塞治療薬の開発に有用な基礎的情報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

虚血によって起こる脳梗塞の治療薬として、虚血による神経細胞死あるいは損傷から神経細胞を保護する作用を持つ薬物の出現が望まれている。著者は、神経細胞死を防ぎ、神経突起伸展を促進するという神経栄養因子が持つ作用に着目し、脳梗塞治療薬の創出を目指して基礎的研究を行い、以下の知見を得た。

第1章 神経細胞とアストロサイト相互作用検出のためのco-culture法

アストロサイト及び神経細胞の産生する液性因子がトランズウェルの膜を介して相互作用できるco-culture法を考案し、アストロサイトの産生する物質が、マウス胎仔大脳皮質初代培養神経細胞に対して神経栄養因子様作用、すなわち、生存維持、神経突起伸展、シナプス形成(ネットワーク再構築)を促す作用を有していることを確認した。

第2章 神経栄養因子様作用を持つ化合物の簡便探索法の構築とFR115427の発見

マウス胎仔大脳皮質初代培養神経細胞の生存維持作用を簡便に検出するために神経細胞に内在するacid phosphatase活性を測定することにより、従来の顕微鏡下での目視による計数法よりも簡便に生存細胞数を推定できる方法を考案し、この方法を用いて低分子化合物FK115427及びMK801に神経細胞生存維持作用のあることを見出した。

第3章 FK115427の神経栄養因子様作用とNMDAレセプター拮抗作用との関連

FR115427及びMK801は、大脳皮質初代培養神経細胞に対して生存維持作用のみならず神経突起伸展作用も有していたので、これらは神経栄養因子様作用を持つ化合物であると推定された。一方、これら両薬物はNMDAレセプター拮抗作用を有しているが、この作用がFK115427よりも強いCGS19755及び2-amino-7-phosphonoheptanoateには神経栄養因子様作用が認められなかったことから、NMDAレセプター拮抗作用がFR115427及びMK801の*in vitro*系における神経栄養因子様作用の直接的要因ではないと推論した。

第4章 イソキノリン骨格と神経栄養因子様作用との関連

FR115427及びMK801は共にイソキノリン骨格を母核とした化合物であるが、本骨格を母核とする4種類のFR115427の誘導体にも神経栄養因子様作用が認められたことから、これらの化合物が持つイソキノリン骨格部分が、大脳皮質初代培養神経細胞における神経栄養因子様作用発現に関与するのではないかと推定した。

第5章 FK115427の*in vivo*における薬理作用

培養神経細胞を用いた*in vitro*実験系で神経栄養因子様作用が認められたFK115427及びMK801は、末梢投与により、砂ネズミ両側総頸動脈結紮モデルにおける海馬CA1野神経細胞死抑制作用及びラット中大脳動脈永久結紮モデルにおける梗塞巣縮小作用を発現した。一方、*in vitro*実験系で神経栄養因子様作用が認められなかったNMDAレセプター拮抗薬CGS19755は、FK115427と同等のNMDAレセプター拮抗作用が推定できる用量において、FK115427よりも両虚血モデ

ルにおける神経細胞保護作用が弱かったことから、*in vivo*動物脳虚血モデルでの神経細胞保護作用発現にはNMDAレセプター拮抗作用よりも神経栄養因子様作用の寄与が大きいことを指摘した。

以上の成績は、大脳皮質初代培養神経細胞において神経栄養因子様作用を有する、特にイソキノリン骨格を母核とする、非蛋白質性低分子化合物が、末梢投与で有効な脳梗塞治療薬になる可能性を示唆している。これらの知見は、新規の脳梗塞治療薬の開発に有用な基礎的情報を提供するものと考えられる。

よって、本論文を博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

さらに、平成12年7月6日に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。