

氏名	く め とし あき 久 米 利 明
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	論 薬 博 第 647 号
学位授与の日付	平 成 13 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	大 脳 皮 質 に お け る グ ル タ ミ ン 酸 神 經 毒 性 に 対 す る ニ ュ ー ロ ト ロ フ ィ ン の 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 佐藤公道 教授 市川 厚

### 論 文 内 容 の 要 旨

グルタミン酸は中枢神経系において興奮性神経伝達物質と神経毒の2つの側面を持つと考えられている。すなわち、グルタミン酸は生理的条件下では興奮性神経伝達物質として働くが、虚血などの病理的条件下でグルタミン酸の過剰遊離が起こると神経毒として働き、中枢神経障害の原因となるとの説が広く認められている。さらに、グルタミン酸神経毒性はアルツハイマー病を含む種々の神経変性疾患に関与していることが明らかにされてきている。著者はグルタミン酸神経毒性を抑制する内因性物質の探索が臨床上有効な神経保護薬の開発につながると考え、ラット胎仔由来初代培養大脳皮質ニューロンを用いた実験系において、グルタミン酸神経毒性の機序の解析およびグルタミン酸神経毒性を抑制する内在性物質の探索を進め、以下の新知見を得た。

#### 第一章 グルタミン酸神経毒性とホスホリパーゼ C- $\delta$ の関連について

アルツハイマー病患者の剖検脳において、その病理学的特徴の一つある老人斑にホスホリパーゼ C (PLC) のアイソフォームである PLC- $\delta$  の発現上昇が見られる。そこで著者はグルタミン酸誘発ニューロン死における PLC- $\delta$  の発現の変化について検討した。グルタミン酸の処置により、抗 PLC- $\delta$  抗体の免疫染色性が増加し、PLC- $\delta$  の発現がグルタミン酸の濃度に依存して上昇した。グルタミン酸による PLC- $\delta$  の発現の上昇は NMDA 受容体阻害薬である MK-801 および一酸化窒素 (NO) 合成酵素阻害薬である  $N^G$ -nitro-L-arginine によって抑制された。以上の結果から NMDA 受容体の活性化による NO 産生がアルツハイマー病で見られるのと同様の PLC- $\delta$  の制御を導くことが示唆された。

第二章 脳由来神経栄養因子 (BDNF) によるグルタミン酸誘発神経毒性の制御大脳皮質に高発現していることが知られているニューロトロフィンの一つである BDNF のグルタミン酸神経毒性に対する作用を培養大脳皮質ニューロンを用いて検討した。BDNF の高親和性受容体である TrkB のチロシンリン酸化を測定したところ、TrkB のリン酸化は10分までに最大に達し、その後は BDNF の投与時間に依存して減少した。BDNF は、1時間以上の前処置により、濃度依存的にグルタミン酸神経毒性を抑制した。一方、グルタミン酸との同時投与では、BDNF は保護作用を示さなかった。BDNF の保護作用機序を調べる目的で、カルシウムイオノフォアのイオノマイシン、NO ドナーの S-ニトロソシステイン (SNOC) および NO と活性酸素を同時に生成する SIN-1 の神経毒性に対する効果を検討したところ、BDNF これらの試薬により誘発される神経毒性を抑制した。NO は活性酸素と反応して ONOO<sup>-</sup> となり神経細胞死を惹起するが、BDNF は ONOO<sup>-</sup> を直接生成する SIN-1 の神経毒性も抑制したことから、BDNF は NO の関与するラジカルの毒性に対する神経細胞の抵抗性を増強することにより保護作用を発現することが示唆される。

#### 第三章 神経成長因子 (NGF) によるグルタミン酸誘発神経毒性の制御

ニューロトロフィンファミリーのプロトタイプである神経成長因子 (NGF) のグルタミン酸神経毒性に対する作用を検討した。培養大脳皮質ニューロンにおいて、NGF の高親和性受容体である TrkAmRNA の発現は認められず、NGF による TrkA のリン酸化も観察されなかった。しかし、NGF の1時間以上の前処置によりグルタミン酸神経毒性は抑制された。BDNF と同様に NGF はイオノマイシン、SNOC および SIN-1 の神経毒性を抑制した。ニューロトロフィンの高親和性受

容体刺激に続いて MAPK の活性化力が引き起こされることが報告されているので、BDNF および NGF による MAPK の活性化について検討した結果、BDNF により MAPK が活性化されたのに対し、NGF では MAPK は活性化されなかった。一方、ニューロトロフィンの低親和性受容体である p75 受容体に対する抗体により、NGF の作用は完全に抑制されたのに対して、BDNF の作用は部分的にしか抑制されなかった。さらに p75 受容体の下流の情報伝達経路と考えられているセラミドの産生について検討したところ、NGF はセラミド産生を亢進した。以上の結果より、BDNF の保護作用は高親和性受容体である TrkB を介して発現するのに対し、NGF の保護作用は低親和性受容体である p75 受容体を介して発現することが示唆される。

以上、著者は培養大脳皮質ニューロンにおけるグルタミン酸神経毒性にアルツハイマー病で見られる PLC- $\delta$  の発現上昇が見られること、また、内在性の保護物質としてニューロトロフィンがグルタミン酸神経毒性に対して保護作用を発現することを示した。NGF および BDNF の神経保護作用には、それぞれ p75 受容体と TrkB 受容体が重要な役割を果たすことを明らかにした。本研究の成果はグルタミン酸神経毒性を抑制する内因性物質の探索における有用な知見となるとともに、神経変性疾患に有効な予防・治療薬の開発において重要な基礎的資料を提供するものである。

### 論文審査の結果の要旨

グルタミン酸は中枢神経系における主要な興奮性神経伝達物質の一つであるが、脳虚血時の低酸素・低血糖状態に脳内で過剰遊離に遊離されると遅延性ニューロン死を誘発する。更に、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患に伴うニューロン死の要因の一つとしてグルタミン酸神経毒性が重要な役割を果たすことが指摘されている。著者はグルタミン酸神経毒性を抑制する内因性物質の探索が臨床上有効な神経保護薬の開発につながると考え、ラット胎仔由来初代培養大脳皮質ニューロンを用いた実験系において、グルタミン酸神経毒性の機序の解析およびグルタミン酸神経毒性を抑制する内在性物質の探索を進め、以下の新知見を得た。

#### 第一章 グルタミン酸神経毒性とホスホリパーゼ C- $\delta$ の関連について

アルツハイマー病患者の剖検脳において、その病理学的特徴の一つある老人斑にホスホリパーゼ C (PLC) のアイソフォームである PLC- $\delta$  の発現上昇が見られる。そこで著者はグルタミン酸誘発ニューロン死における PLC- $\delta$  の発現の変化について検討した。グルタミン酸の処置により、抗 PLC- $\delta$  抗体の免疫染色性が増加し、PLC- $\delta$  の発現がグルタミン酸の濃度に依存して上昇した。グルタミン酸による PLC- $\delta$  の発現の上昇は NMDA 受容体阻害薬である MK-801 および一酸化窒素 (NO) 合成酵素阻害薬である  $N^G$ -nitro-L-arginine によって抑制された。以上の結果から NMDA 受容体の活性化による NO 産生がアルツハイマー病で見られるのと同様の PLC- $\delta$  の制御を導くことが示唆された。

#### 第二章 脳由来神経栄養因子 (BDNF) によるグルタミン酸誘発神経毒性の制御

BDNF の高親和性受容体である TrkB のチロシンリン酸化を測定したところ、TrkB のリン酸化は10分までに最大に達し、その後は BDNF の投与時間に依存して減少した。BDNF は、1時間以上の前処置により、濃度依存的にグルタミン酸神経毒性を抑制した。一方、グルタミン酸との同時投与では、BDNF は保護作用を示さなかった。BDNF は、カルシウムイオノフォアのイオノマイシン、NO ドナーの S-ニトロソシステイン (SNOC) および NO と活性酸素を同時に生成する SIN-1 の神経毒性を抑制した。NO は活性酸素と反応して ONOO $^-$  となり神経細胞死を惹起するが、BDNF は ONOO $^-$  を直接生成する SIN-1 の神経毒性も抑制したことから、BDNF は NO の関与するラジカル細胞毒性に対するニューロンの抵抗性を増強することにより保護作用を発現することが示唆される。

#### 第三章 神経成長因子 (NGF) によるグルタミン酸誘発神経毒性の制御

培養大脳皮質ニューロンにおいて、NGF の高親和性受容体である TrkA mRNA の発現は認められず、NGF による TrkA のリン酸化も観察されなかったが、グルタミン酸神経毒性は NGF により著明に抑制された。BDNF と同様に NGF はイオノマイシン、SNOC および SIN-1 の神経毒性を抑制した。ニューロトロフィン高親和性受容体の情報伝達経路の一つと考えられている MAPK に対して、BDNF は活性化作用を示したのに対して、NGF は活性化作用を示さなかった。一方、ニューロトロフィンの低親和性受容体である p75 受容体に対する抗体により、NGF の作用は完全に抑制されたのに対して、BDNF の作用は部分的にしか抑制されなかった。更に、p75 受容体の下流の情報伝達経路と考えられているセラミ

ドの産生について検討したところ、NGFはセラミド産生を亢進した。以上の結果より、BDNFの保護作用は高親和性受容体であるTrkBを介して発現するのに対し、NGFの保護作用は低親和性受容体であるp75受容体を介して発現することが示唆される。

以上、著者は培養大脳皮質ニューロンにおけるグルタミン酸神経毒性にアルツハイマー病で見られるPLC- $\delta$ の発現上昇が見られること、および、内在性の保護物質としてニューロトロフィンがグルタミン酸神経毒性に対して保護作用を発現することを示した。NGFおよびBDNFの神経保護作用には、それぞれp75受容体とTrkB受容体が重要な役割を果たすことを明らかにした。本研究の成果はグルタミン酸神経毒性を抑制する内因性物質の探索における有用な知見となるとともに、神経変性疾患に有効な予防・治療薬の開発において重要な基礎的資料を提供するものである。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

更に、平成13年4月24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。