

氏名	しら かわ ひさ し 白 川 久 志
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 576 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	大脳皮質におけるニューロアクティブステロイドによる興奮性神経毒性 の制御機構に関する研究
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

ニューロアクティブステロイドとは、中枢および末梢神経系に作用するステロイド化合物の総称であり、その血中濃度は加齢・性周期やストレスなどにより変化し、記憶・学習、睡眠やけいれん・うつ・不安などの病態に関与することが知られている。一般にステロイドホルモンは細胞内受容体に結合したのち核内に移行し、タンパクの *de novo* 合成を介してその作用を発揮し生体ホメオスタシスを制御しているが、ニューロアクティブステロイドはこの作用に加えて細胞膜に存在する神経伝達物質受容体に対して急性的に作用することによっても、その調節作用を発揮すると考えられている。脳虚血および種々の難治性中枢神経変性疾患に伴う神経細胞死の重要な要因として、グルタミン酸による神経細胞の過剰興奮の関与が指摘されている。しかしながら、脳内においてその生合成が近年証明されつつあるニューロアクティブステロイドのグルタミン酸神経毒性に対する作用に関してはほとんど解明されていないことから、その役割を解明することは中枢神経変性疾患の予防・治療薬と成り得るリード化合物の創製において重要な役割を果たすと考えられる。本研究において著者は、ニューロアクティブステロイドが興奮性神経毒性に附して制御作用を有することを明らかにし、さらにその作用機序について解析した結果、以下の新知見を得た。

第一章 ニューロアクティブステロイドによる NMDA 誘発神経細胞死に対する制御

グルタミン酸神経毒性はイオンチャネル型グルタミン酸受容体サブタイプの一つである NMDA 受容体を介していることから、NMDA 誘発神経細胞死におけるニューロアクティブステロイドの作用について検討を行った。培養大脳皮質切片に NMDA を 24 時間投与することにより惹起される神経細胞死に対して代表的なステロイド化合物の作用を検討したところ、progesterone の代謝産物である pregnanolone sulfate ($3\alpha 5\beta S$) が濃度依存的な抑制作用を示した。一方、脳内に最も多く存在するニューロアクティブステロイドの一つである pregnenolone sulfate (PREGS) およびその合成類似体の pregnenolone hemisuccinate (PHS) は NMDA 神経毒性を濃度依存的に増悪した。これらニューロアクティブステロイドの作用はタンパク合成阻害薬である cycloheximide や GABA_A 受容体遮断薬である picrotoxin の投与によっても影響を受けなかった。ホールセルパッチクランプ法を用いて NMDA 受容体機能に及ぼすニューロアクティブステロイドの作用を検討したところ、 $3\alpha 5\beta S$ は NMDA 誘発電流応答を顕著に抑制し、逆に PHS は増強したが、PREGS は有意な作用を示さなかった。細胞内カルシウム濃度測定法を用いて検討を行うと、 $3\alpha 5\beta S$ はグルタミン酸により誘発される細胞内カルシウム濃度増大応答を顕著に抑制し、逆に PHS は増強した。PREGS は細胞内カルシウム濃度増大応答のピーク値に対しては影響を及ぼさなかったが、濃度増大応答の持続を顕著に延長した。以上の結果より、ニューロアクティブステロイドが急性的に NMDA 受容体機能を調節することにより NMDA 誘発神経細胞死に影響を及ぼすことが明らかとなった。

第二章 ニューロアクティブステロイドによるカイニン酸および AMPA 誘発神経細胞死に対する制御

Non-NMDA 型グルタミン酸受容体であるカイニン酸型および AMPA 型受容体もグルタミン酸誘発神経細胞死を媒介することが知られている。そこでカイニン酸の投与により惹起される神経細胞死に対するニューロアクティブステロイドの

作用について検討を行った。代表的なニューロアクティブステロイドのうち、NMDA 神経毒性に対して顕著な増悪作用を示した PREGS のみがカイニン酸誘発神経細胞死を減弱し、その保護作用は濃度依存的であった。PREGS の神経保護作用は、cycloheximide やグルココルチコイド受容体遮断薬である RU-486、および picrotoxin の投与によっても影響を受けなかった。ホールセルパッチクランプ法および細胞内カルシウム濃度測定法を用いて検討したところ、PREGS はカイニン酸により誘発される電流および細胞内カルシウム濃度の増大を抑制した。AMPA の投与により惹起される神経細胞死においても同様に PREGS は AMPA 受容体応答を減弱することにより神経細胞に対する保護作用を示した。以上の結果から、PRFGS は急性的に non-NMDA 受容体機能を抑制して、カチオン流入量を減少させることによりカイニン酸および AMPA 誘発神経細胞死を減弱することが示された。

第三章 興奮毒性および虚血傷害に対する aminoglutethimide (AGT) の保護作用

ステロイドホルモン合成阻害作用を有する AGT を培養大脳皮質神経細胞に投与して、内在性のニューロアクティブステロイドを涸渇させた際の興奮毒性に対する影響について検討した。初代培養大脳皮質細胞におけるグルタミン酸誘発神経細胞死は、AGT の慢性処置により濃度依存的に減弱され、その保護作用は AGT を培養翌日より慢性投与した場合に特に顕著に観察された。切片培養を用いた検討においても AGT の細胞死保護作用が観察されたが、各種ステロイドホルモンの添加はその保護作用に影響を与えなかった。一方、培養大脳皮質切片に化学的虚血を負荷した際に誘導されるグルタミン酸遊離の増加および細胞障害は AGT により濃度依存的に減弱した。これらの結果から、AGT の長期間投与によりニューロアクティブステロイド涸渇作用とは異なる作用を介して、大脳皮質神経細胞の興奮毒性に対する感受性が減弱され、虚血傷害に対する抵抗性が獲得されることが示唆された。

以上、著者は脳内に豊富に存在するニューロアクティブステロイドの中で $3\alpha 5\beta S$ が特異的に NMDA 神経毒性を抑制すること、および PREGS がカイニン酸や AMPA といった non-NMDA 受容体を介する神経毒性を減弱する一方で NMDA 神経毒性を増悪するという正反対の作用を有すること等を見出し、ニューロアクティブステロイドが大脳皮質における興奮性神経毒性の制御系として働くことを明らかにした。本研究の成果は、脳虚血および種々の難治性中枢神経変性疾患の予防・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。

論文審査の結果の要旨

ニューロアクティブステロイドとは、中枢および末梢神経系に作用するステロイド化合物の総称であり、その血中濃度は加齢・性周期やストレスなどにより変化し、記憶・学習、睡眠やけいれん・うつ・不安などの病態に関与することが知られている。脳虚血および種々の難治性中枢神経変性疾患に伴う神経細胞死の重要な要因として、グルタミン酸による神経細胞の過剰興奮の関与が指摘されているが、脳内においてその生合成が近年証明されつつあるニューロアクティブステロイドのグルタミン酸神経毒性に対する作用に関してはほとんど解明されていない。そこで、その役割を解明することは中枢神経変性疾患の予防・治療薬と成り得るリード化合物の創製において重要な役割を果たすと考えられる。本研究において、ニューロアクティブステロイドが興奮性神経毒性に対して制御作用を有することを明らかにし、さらにその作用機序について解析した結果、以下の新知見を得た。

第一章 ニューロアクティブステロイドによる NMDA 誘発神経細胞死に対する制御

グルタミン酸神経毒性はイオンチャネル型グルタミン酸受容体サブタイプの一つである NMDA 受容体を介していることから、NMDA 誘発神経細胞死におけるニューロアクティブステロイドの作用について検討を行った。培養大脳皮質切片に NMDA を 24 時間投与することにより惹起される神経細胞死に対して代表的なステロイド化合物の作用を検討したところ、progesterone の代謝産物である pregnanolone sulfate ($3\alpha 5\beta S$) が濃度依存的な抑制作用を示した。一方、脳内に最も多く存在するニューロアクティブステロイドの一つである pregnenolone sulfate (PREGS) およびその合成類似体の pregnenolone hemisuccinate (PHS) は NMDA 神経毒性を濃度依存的に増悪した。これらニューロアクティブステロイドの作用はタンパク合成阻害薬である cycloheximide や GABA_A 受容体遮断薬である picrotoxin の投与によっても影響を受けなかった。次いで、NMDA 受容体機能に及ぼすニューロアクティブステロイドの作用を検討したところ、 $3\alpha 5\beta S$ は NMDA 誘発電流応答を顕著に抑制し、逆に PHS は増強したが、PREGS は有意な作用を示さなかった。細胞内カルシウム濃度測定法

を用いて検討を行うと、 $3\alpha5\beta S$ はグルタミン酸により誘発される細胞内カルシウム濃度増大応答を顕著に抑制し、逆に PHS は増強した。PREGS は細胞内カルシウム濃度増大応答のピーク値に対しては影響を及ぼさなかったが、濃度増大応答の持続を顕著に延長した。以上の結果より、ニューロアクティブステロイドが急性的に NMDA 受容体機能を調節することにより NMDA 誘発神経細胞死に影響を及ぼすことが明らかとなった。

第二章 ニューロアクティブステロイドによるカイニン酸および AMPA 誘発神経細胞死に対する制御

Non-NMDA 型グルタミン酸受容体であるカイニン酸型および AMPA 型受容体もグルタミン酸誘発神経細胞死を媒介することが知られている。そこでカイニン酸の投与により惹起される神経細胞死に対するニューロアクティブステロイドの作用について検討を行った。代表的なニューロアクティブステロイドのうち、NMDA 神経毒性に対して顕著な増悪作用を示した PREGS のみがカイニン酸誘発神経細胞死を減弱し、その保護作用は濃度依存的であった。PREGS の神経保護作用は、cycloheximide やグルココルチコイド受容体遮断薬である RU-486、および picrotoxin の投与によっても影響を受けなかった。ホールセルパッチクランプ法および細胞内カルシウム濃度測定法を用いて検討したところ、PREGS はカイニン酸により誘発される電流および細胞内カルシウム濃度の増大を抑制した。AMPA の投与により惹起される神経細胞死においても同様に PREGS は AMPA 受容体応答を減弱することにより神経細胞に対する保護作用を示した。以上の結果から、PREGS は急性的に non-NMDA 受容体機能を抑制して、カチオン流入量を減少させることによりカイニン酸および AMPA 誘発神経細胞死を減弱することが示された。

第三章 興奮毒性および虚血傷害に対する aminoglutethimide (AGT) の保護作用

ステロイドホルモン合成阻害作用を有する AGT を培養大脳皮質神経細胞に投与して、内在性のニューロアクティブステロイドを涸渇させた際の興奮毒性に対する影響について検討した。初代培養大脳皮質細胞におけるグルタミン酸誘発神経細胞死は、AGT の慢性処置により濃度依存的に減弱され、その保護作用は AGT を培養翌日より慢性投与した場合に特に顕著に観察された。切片培養を用いた検討においても AGT の細胞死保護作用が観察されたが、各種ステロイドホルモンの添加はその保護作用に影響を与えなかった。一方、培養大脳皮質切片に化学的虚血を負荷した際に誘導されるグルタミン酸遊離の増加および細胞障害は AGT により濃度依存的に減弱した。これらの結果から、AGT の長期間投与によりニューロアクティブステロイド涸渇作用とは異なる作用を介して、大脳皮質神経細胞の興奮毒性に対する感受性が減弱され、虚血傷害に対する抵抗性が獲得されることが示唆された。

以上、著者は脳内に豊富に存在するニューロアクティブステロイドの中で $3\alpha5\beta S$ が特異的に NMDA 神経毒性を抑制すること、および PREGS がカイニン酸や AMPA といった non-NMDA 受容体を介する神経毒性を減弱する一方で NMDA 神経毒性を増悪するという正反対の作用を有すること等を見出し、ニューロアクティブステロイドが大脳皮質における興奮性神経毒性の制御系として働くことを明らかにした。本研究の成果は、脳虚血および種々の難治性中枢神経変性疾患の予防・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。

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。