

氏名	いずみ 泉	やす 安	ひこ 彦
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)		
学位記番号	薬 博 第 621 号		
学位授与の日付	平成 19 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	内 在 性 ド パ ミ ン お よ び ド パ ミ ン 受 容 体 ア ゴ ニ ス ト に よ る 選 択 的 ド パ ミ ン ニューロン死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

パーキンソン病は中脳黒質ドパミンニューロンの変性・脱落による運動障害を主症状とする神経変性疾患である。本疾患の発症に関わる要因として、遺伝、環境および内在性因子が指摘されており、環境因子として農薬の曝露、内在性因子の一つとしてグルタミン酸の関与が示唆されている。これらの因子はドパミンニューロン以外にも傷害を与えるが、パーキンソン病でドパミンニューロンが選択的に変性する機序については不明な点が多い。ドパミンは生理的条件下において自動酸化を起こし、また、スーパーオキシドによりその自動酸化は促進され、顕著な細胞毒性を生じる。本研究において著者は、農薬およびグルタミン酸に対するドパミンニューロンの脆弱性に内在性ドパミンが関与することを明らかにし、その機序について解析した結果、以下の新知見を得た。

#### 第一章 選択的ドパミンニューロン死に対する内在性ドパミンの関与

パーキンソン病患者ではミトコンドリア複合体 I 活性の低下が報告されており、ドパミンニューロン死への関与が示唆されている。そこで、複合体 I 阻害作用を有する殺虫剤のロテノンによるラット胎仔由来中脳初代培養細胞に対する毒性を検討した。複合体 I を完全に阻害する高濃度ではドパミンニューロンおよび非ドパミンニューロンのいずれにおいても細胞死を惹起し、スーパーオキシド除去薬 Mn (III)-tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin により抑制された。一方、複合体 I を部分的に阻害する低濃度のロテノンはドパミンニューロン選択的に細胞死を誘発し、ドパミン生合成酵素チロシンヒドロキシラーゼ (TH) の阻害薬  $\alpha$ -メチル-*p*-チロシン ( $\alpha$ -MT) により細胞内ドパミンを枯渇させると抑制された。低濃度のロテノン毒性にはスーパーオキシドによるドパミン自動酸化の促進が関与することが示唆された。

疫学調査より、除草剤であるパラコート曝露がパーキンソン病の危険因子の一つであることが示唆されている。パラコートを全身投与したマウスでは黒質ドパミンニューロンが選択的に変性することが報告されているが、その機序の詳細については明らかにされていない。ラット副腎髄質褐色細胞腫由来 PC12 細胞を用いてパラコート誘発細胞死の機序について検討したところ、 $\alpha$ -MT により細胞内ドパミンを枯渇させることでパラコート毒性は抑制された。パラコートにより細胞内ドパミン量が一過性に上昇した。パラコートは、ドパミン生合成には影響を与えなかったが、ドパミン分解に関わるアルデヒド脱水素酵素の活性を抑制した。したがって、パラコートによりドパミン代謝機能が障害され、過剰に蓄積したドパミンが細胞死を誘発することが示唆された。

ロテノンおよびパラコートの細胞毒性に内在性ドパミンを介した機序が示されたので、グルタミン酸神経毒性における内在性ドパミンの関与について検討した。中脳初代培養細胞にグルタミン酸を曝露すると、非ドパミンニューロンに比べドパミンニューロンで、より低濃度から細胞死が惹起された。グルタミン酸誘発ドパミンニューロン死は  $\alpha$ -MT および小胞モノアミントランスポーター阻害薬レセルピンにより細胞内ドパミンを枯渇させることで抑制された。ドパミン生合成を促進する TH リン酸化過程を検討したところ、グルタミン酸により TH の Ser19 および Ser31 のリン酸化が増加した。ドパミンニューロンのグルタミン酸に対する脆弱性に TH リン酸化が関与することが示唆された。

以上の結果より、農薬およびグルタミン酸による選択的ドパミンニューロン死に内在性ドパミンが重要な役割を果たすと結論された。

## 第二章 ドパミン誘発細胞死におけるドパミン酸化中間体の役割

ドパミンは生理的条件下において容易に酸化され、活性酸素種を発生するとともに、酸化中間体であるキノンやアミノクロームに変換される。しかし、いずれの因子がドパミン誘発細胞死に寄与するかについては解明されていない。そこで、ヒト神経芽細胞腫由来 SH-SY5Y 細胞を用いてドパミン誘発細胞死の機序を検討したところ、ドパミン毒性は抗チオール酸化薬グルタチオンによりほぼ完全に抑制されたが、過酸化水素除去酵素カタラーゼによる保護作用は限定的なものでしかなかった。グルタチオンはドパミン酸化中間体の生成を抑制したものの、カタラーゼは影響を与えなかった。さらに、鉄イオンによりドパミン酸化中間体から最終生成物であるメラニンへの変換を促進し、ドパミン酸化中間体を減少させることによりドパミン毒性は抑制された。これらの結果より、ドパミン誘発細胞死にはドパミン酸化中間体が中心的な役割を果たしていることが示された。

## 第三章 プラミペキソールによるグルタミン酸神経毒性に対する保護作用機序

最近、ドパミン D<sub>2/3</sub> 受容体アゴニストであるプラミペキソールがパーキンソン病での神経変性の進行を遅らせることを示唆する臨床報告が提出された。そこで、中脳初代培養細胞においてグルタミン酸神経毒性に対するプラミペキソールの作用について検討したところ、100  $\mu$ M 以上の濃度においてドパミンニューロンを保護した。しかし、この保護作用は D<sub>2</sub> タイプアンタゴニストのドンペリドンにより抑制されなかったことからドパミン D<sub>2/3</sub> 受容体刺激を介さないと考えられる。プラミペキソールはドパミン含有量を顕著に減少させ、その機序を検討したところ、ドパミンの小胞内取込を阻害した。したがって、プラミペキソールはドパミン含有量を低下させることによりグルタミン酸誘発ドパミンニューロン死に対し保護作用を発現すると推定される。

以上、著者は、種々の神経毒に対するドパミンニューロンの脆弱性に内在性ドパミンが関与し、その毒性にはドパミン酸化中間体が重要な役割を果たすことを示した。さらに、パーキンソン病治療薬プラミペキソールの神経保護作用に関する新たな機序を見出した。本研究の成果は、パーキンソン病の発症機構および病態解析の解明に寄与するものであり、新しい治療法の開発など臨床応用に結びつく有用な基礎的知見を提供するものである。

## 論文審査の結果の要旨

パーキンソン病は中脳黒質ドパミンニューロンの変性・脱落による運動障害を主症状とする神経変性疾患である。本疾患の発症に関わる要因として、遺伝、環境および内在性因子が指摘されており、環境因子として農薬の曝露、内在性因子の一つとしてグルタミン酸の関与が示唆されている。これらの因子はドパミンニューロン以外にも傷害を与えるが、パーキンソン病でドパミンニューロンが選択的に変性する機序については不明な点が多い。ドパミンは生理的条件下において自動酸化を起し、スーパーオキシドによりその自動酸化は促進され、顕著な細胞毒性を生じる。申請者は、農薬およびグルタミン酸に対するドパミンニューロンの脆弱性に内在性ドパミンが関与することを明らかにし、その機序に関する薬理学的研究を行った。

### 第一章 選択的ドパミンニューロン死に対する内在性ドパミンの関与

選択的ドパミンニューロン死を惹起することが示唆されているロテノンおよびパラコートによる神経毒性の機序を検討した。複合体 I を部分的に阻害する低濃度のロテノンはドパミンニューロン選択的に細胞死を誘発し、ドパミン生合成酵素チロシンヒドロキシラーゼ (TH) の阻害薬  $\alpha$ -メチル-p-チロシン ( $\alpha$ -MT) により細胞内ドパミンを枯渇させると抑制された。低濃度のロテノン毒性にはスーパーオキシドによるドパミン自動酸化の促進が関与することが示唆された。次いで、ラット副腎髄質褐色細胞腫由来 PC12 細胞を用いてパラコート誘発細胞死の機序について検討した。パラコート毒性は、 $\alpha$ -MT により細胞内ドパミンを枯渇させることにより抑制された。パラコートにより細胞内ドパミン量が一過性に上昇し、ドパミン生合成には影響を与えなかったが、ドパミン分解に関わるアルデヒド脱水素酵素の活性を抑制した。したがって、パラコートによりドパミン代謝機能が障害され、過剰に蓄積したドパミンが細胞死を誘発することが示唆された。これらの農薬の細胞毒性に内在性ドパミンを介した機序が示されたので、グルタミン酸神経毒性における内在性ドパミンの関与につ

いて検討した。中脳初代培養細胞におけるグルタミン酸誘発ドーパミンニューロン死は $\alpha$ -MT および小胞モノアミントランスポーター阻害薬レセルピンにより細胞内ドーパミンを枯渇させることで抑制された。ドーパミン生合成を促進する TH リン酸化過程を検討したところ、グルタミン酸により TH の Ser19 および Ser31 のリン酸化が増加した。ドーパミンニューロンのグルタミン酸に対する脆弱性に TH リン酸化が関与することが示唆された。以上の結果より、農薬およびグルタミン酸による選択的ドーパミンニューロン死に内在性ドーパミンが重要な役割を果たすと結論された。

## 第二章 ドーパミン誘発細胞死におけるドーパミン酸化中間体の役割

ドーパミンは生理的条件下において容易に酸化され、活性酸素種を発生するとともに、酸化中間体であるキノンやアミノクロームに変換される。ヒト神経芽細胞腫由来 SH-SY5Y 細胞を用いてドーパミン誘発細胞死の機序を検討したところ、ドーパミン毒性は抗チオール酸化薬グルタチオンによりほぼ完全に抑制されたが、過酸化水素除去酵素カタラーゼによる保護作用は限定的なものでしかなかった。グルタチオンはドーパミン酸化中間体の生成を抑制したものの、カタラーゼは影響を与えなかった。鉄イオンによりドーパミン酸化中間体から最終生成物であるメラニンへの変換を促進し、ドーパミン酸化中間体を減少させることによりドーパミン毒性は抑制された。これらの結果より、ドーパミン誘発細胞死にはドーパミン酸化中間体が中心的な役割を果たしていることが示された。

## 第三章 プラミベキソールによるグルタミン酸神経毒性に対する保護作用機序

最近、ドーパミン  $D_{2/3}$  受容体アゴニストであるプラミベキソールがパーキンソン病での神経変性の進行を遅らせることを示唆する臨床報告が提出された。そこで、中脳初代培養細胞においてグルタミン酸神経毒性に対するプラミベキソールの作用について検討し、プラミベキソールがグルタミン酸神経毒性に対する著明な保護作用を発現することを見出した。この保護作用は  $D_2$  タイプアンタゴニストのドンペリドンにより抑制されなかったことからドーパミン  $D_{2/3}$  受容体刺激を介さないと考えられる。プラミベキソールはドーパミン含有量を顕著に減少させ、その機序を検討したところ、ドーパミンの小胞内取込を阻害した。これらの結果より、プラミベキソールはドーパミン含有量を低下させることによりグルタミン酸誘発ドーパミンニューロン死に対し保護作用を発現することが示された。

以上、申請者は、種々の神経毒に対するドーパミンニューロンの脆弱性に内在性ドーパミンが関与し、その毒性にはドーパミン酸化中間体が重要な役割を果たすことを明らかにした。さらに、パーキンソン病治療薬プラミベキソールの神経保護作用に関する新たな機序を見出した。本研究の成果は、パーキンソン病の発症機構および病態解析の解明に寄与するものであり、新しい治療法の開発など臨床応用に結びつく有用な基礎的知見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19年2月23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。