

氏 名 原 田 淳
 学位(専攻分野) 博 士 (薬 学)
 学 位 記 番 号 論 薬 博 第 613 号
 学位授与の日付 平成 11 年 7 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 脳神経細胞死防止薬の作用点に関する基礎的研究
 — カスパーゼを中心とした検討 —

論文調査委員 (主 査)
 教 授 佐 藤 公 道 教 授 赤 池 昭 紀 教 授 川 崎 敏 祐

論 文 内 容 の 要 旨

細胞死の形態にはアポトーシスとネクロシスの2つの種類があることが知られている。アルツハイマー病等の神経変性疾患や、脳卒中急性期に生じる神経細胞死はネクロシスであると考えられていたが、近年それらのうちの少なくとも一部がアポトーシスであることが報告されている。アポトーシスにはカスパーゼと呼ばれる一群のプロテアーゼが関与することが知られており、カスパーゼの阻害薬はこれらの疾患に対する治療薬としての可能性が期待されている。そこで著者は2種類の初代培養神経細胞のアポトーシスモデル系を用いて、カスパーゼの活性化とその阻害薬の作用を中心とした生化学・薬理学的研究を行った。その結果、カスパーゼを阻害するだけでは神経細胞死の防止には十分でなく、その阻害薬により生存維持された細胞はネクロシスを起こしやすくなること、アポトーシスが誘導される過程で生じる細胞のエネルギー状態の低下をも抑えることが有効に神経細胞を保護するために必要であることを示唆する以下の新知見を得た。

第1編 培養小脳顆粒細胞の低カリウム誘発アポトーシスにおけるカスパーゼの活性化とそれに関与する細胞内機構の検討

高純度の神経細胞が多量に得られる点で生化学的解析に適している培養小脳顆粒細胞の培地中のカリウム濃度を低下させると、カスパーゼ-3活性の増大にひきつづき典型的なアポトーシスを生じた。この低カリウムによるアポトーシスはカスパーゼ阻害薬により防止された。低カリウムによるカスパーゼ-3の活性化に先だって c-Jun のリン酸化 / 活性化が生じる。p 38 MAP キナーゼの他に c-Jun のリン酸化 / 活性化酵素 (JNK) の一部のアイソフォームも阻害することが知られている SB 203580 が低カリウムによる c-Jun のリン酸化 / 活性化、カスパーゼ-3の活性化およびアポトーシスを防止することを見出した。一方、カスパーゼ阻害薬は c-Jun のリン酸化 / 活性化を抑制しなかった。また、このモデルにおいて S-adenosyl-L-methionine やポリアミンがアポトーシス防止作用を有することを見出した。これらの薬物と、既にアポトーシス防止作用が報告されている BDNF, dibutyryl cAMP, NMDA, actinomycin D はいずれもカスパーゼ-3の活性化を抑制し、その作用の強さはそれぞれの薬物の抗アポトーシス作用の強さとよく相関した。

以上の結果より、培養小脳顆粒細胞の低カリウムによるアポトーシスを引き起こすカスパーゼ-3の活性化に c-Jun が関与していると考えられる。また、培養小脳顆粒細胞ではカスパーゼ阻害薬に限らず、アポトーシスを防止する多くの薬物がカスパーゼ-3の活性化を防止することにより作用していることが示唆される。

第2編 カスパーゼ阻害薬によりアポトーシスを防止した時に生じるネクロシス様の神経細胞死

培養小脳顆粒細胞を低カリウム処理すると、カスパーゼの活性化に先立ち、細胞のエネルギー状態やミトコンドリア機能の指標である MTT 還元能が低下した。アポトーシス防止作用を持つ薬物の多くは低カリウムによる MTT 還元能の低下をも防止したが、カスパーゼ阻害薬はこの MTT 還元能の低下を抑制しなかった。またカスパーゼ阻害薬は低カリウムによって生じる細胞内 ATP レベルの低下も防止しなかった。これらの MTT 還元能や ATP レベルの低下は、actinomycin D で抑制されたことから何らかの遺伝子発現を介して生じていると考えられ、カスパーゼの活性化過程で起こるミトコンドリア膜電位の低下やチトクローム C の遊離を反映している可能性がある。

カスパーゼ阻害薬により生存維持された小脳顆粒細胞は、引き続いて加えられた高カリウムやグルタミン酸刺激に脆弱になり、ネクロシス様の細胞死を起こした。これらの細胞死はそれぞれ nifedipine と MK-801 を用いてカルシウムイオンの流入を抑制すると防止された。一方、actinomycin D や SB 203580 で生存維持された小脳顆粒細胞では ATP レベルの低下は少なく、また高カリウムやグルタミン酸刺激に対して抵抗性であった。

アルツハイマー病における神経変性は主に大脳皮質で生じる。その原因物質と考えられている β -アミロイドは細胞の MTT 還元能を低下させ、そのエネルギー状態と細胞内カルシウム調節能も低下することが知られている。 β -アミロイドを培養大脳皮質神経細胞に作用させるとアポトーシスが生じ、またアポトーシスに先だってカスパーゼ-3 の活性化が見られた。用いた β -アミロイドの種類と濃度や細胞の密度を変化させたときのカスパーゼ-3 の活性化の程度と、細胞死の程度とは、ほぼ相関していた。カスパーゼ阻害薬により、 β -アミロイドによるアポトーシスは防止されたが、ネクロシスと考えられる神経細胞死が生じた。

これらの結果より、カスパーゼ阻害薬によりカスパーゼ活性を抑えることでアポトーシスは防止できても、それらの神経細胞はエネルギー状態が低下しており、通常の細胞には細胞死を起こさないような刺激に対しても脆弱になりネクロシスを生じる可能性が明らかとなった。

以上のように、著者は、カスパーゼの活性化を抑制することが神経細胞のアポトーシスを防止するために必要であるが、カスパーゼ阻害薬によりその活性を抑えるだけではネクロシスを含めた神経細胞死に対する保護効果は十分でないことを指摘した。アポトーシスが誘導される過程で生じる細胞のエネルギー状態の低下をも抑制することが神経細胞保護に重要であることが示唆される。本研究の成果は、新規脳神経細胞保護薬を開発するための基礎的知見であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

アルツハイマー病などの神経変性疾患や脳卒中急性期の脳神経細胞死のメカニズムの一つアポトーシスには、プロテアーゼの一群であるカスパーゼが関与することが知られている。著者は、2種類の初代培養神経細胞のアポトーシスモデル系を用いてカスパーゼの活性化やその阻害薬の作用を中心に生化学的・薬理学的研究を行い、以下の新知見を得た。

第1編 培養小脳顆粒細胞の低カリウム誘発アポトーシスにおけるカスパーゼの活性化とそれに関与する細胞内機構の検討

高純度の神経細胞が多量に得られる培養小脳顆粒細胞の培地中のカリウム濃度を低下させると、カスパーゼ-3 様のプロテアーゼ活性の増大に引き続いてアポトーシスが誘発された。カスパーゼ阻害薬、S-adenosyl-L-methionine、ポリアミンは、このカスパーゼ活性化およびアポトーシスを防止した。すでにアポトーシスを防止することが報告されている BDNF, dibutyryl cAMP, NMDA, actinomycin D のアポトーシス抑制作用とカスパーゼ-3 様プロテアーゼ活性化抑制作用の強さは良く相関した。MAP キナーゼの p 38, JNK の阻害薬 SB 203580 が、本モデル系での低カリウム処置によって生じるアポトーシス、カスパーゼ-3 様プロテアーゼ活性化、c-Jun の発現・リン酸化を防止した。これらの結果から、培養小脳顆粒細胞の低カリウム誘発アポトーシスにカスパーゼの活性化が関与し、この活性化を阻害することがアポトーシスを防止するのに必要なこと、さらに、この系では JNK MAP キナーゼあるいは p 38 MAP キナーゼが低カリウム処置によるカスパーゼ活性化に関与する可能性が示唆される。

第2編 カスパーゼ阻害薬によりアポトーシスを防止したときに生じるネクロシス様の神経細胞死

カスパーゼ阻害薬により低カリウム誘発アポトーシスを免れ生存維持された培養小脳顆粒細胞は、actinomycinD や SB 203580 などのアポトーシス防止作用を持つ他の薬物によって生存維持された場合とは異なり、MTT 還元能が低下したままであり、引き続き加えられた高カリウムやグルタミン酸のようなカルシウム流入を起こす刺激に脆弱化しており、ネクロシス様の細胞死を起こした。培養大脳皮質神経細胞にアルツハイマー病の神経細胞死の原因物質といわれる β -アミロイドを作用させると、カスパーゼ-3 様プロテアーゼの活性化に引き続いてアポトーシスが認められた。カスパーゼ阻害薬は β -アミロイドによるアポトーシスを抑制したが、培養時間が長くなるにつれてネクロシス様の神経細胞死が生じた。これらの結果から、カスパーゼ阻害薬は培養小脳顆粒細胞の低カリウム誘発アポトーシスを防止するが、そのようにして生存維持された細胞ではエネルギー状態が低下しており、ネクロシス誘発刺激に対して脆弱化している可能性および大脳皮質神経細胞における β -アミロイドによるアポトーシスにもカスパーゼが関与するが、カスパーゼを阻害するだけでは β -アミロイ

ドによる細胞死を完全には抑制できないことが示唆される。

以上のように、著者は、カスパーゼの活性化を抑制することが神経細胞のアポトーシスを防止するためには必要であるが、カスパーゼ阻害薬によりその活性化を抑えるだけではネクロシスを含めた神経細胞死に対する保護効果は不十分であることを示し、アポトーシスが誘導される過程で生じる細胞のエネルギー状態の低下をも抑制することが神経細胞保護に重要であることを指摘した。これらの成果は新規脳神経細胞保護薬開発の基礎的知見であると考えられる。

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 11 年 6 月 15 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。