

氏 名	にし かわ ひろ ゆき 西 川 弘 之
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	薬 博 第 473 号
学位授与の日付	平 成 13 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	シグマ受容体リガンドおよび牛胎仔血清由来神経保護活性物質のグルタミン酸神経毒性に対する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

虚血に伴う脳組織の低酸素 - 低血糖状態に対して神経細胞は非常に脆弱であることが知られており、特に、新皮質や海馬などの大脳皮質系の神経細胞は短時間の虚血により致命的障害を受ける。脳虚血および種々の中枢神経変性疾患において、グルタミン酸をはじめとする興奮性アミノ酸は神経細胞死を引き起こす重要な危険因子の一つと考えられている。グルタミン酸神経毒性の機序の解明ならびにグルタミン酸神経毒性を抑制する物質の探索は、中枢神経変性疾患の予防・治療薬の開発において重要な役割を果たすと期待されている。本研究において著者は、ラット胎仔由来初代培養大脳皮質細胞を用い、急性グルタミン酸神経毒性の機序および *in vitro* 化学的虚血誘発神経細胞死の機序を明らかにし、さらに、これらの神経細胞死を抑制する保護物質としてシグマ受容体リガンドの作用を解析するとともに牛胎仔血清由来神経保護活性物質の作用を検討した結果、以下の新知見を得た。

第1章 培養大脳皮質細胞におけるグルタミン酸神経毒性の機序およびシグマ受容体リガンドの作用

培養大脳皮質細胞を高濃度のグルタミン酸で短時間処置することにより、急性の神経細胞死が観察された。このグルタミン酸神経毒性は、*N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体拮抗薬、一酸化窒素 (NO) 合成酵素阻害薬の投与および細胞外液の Ca^{2+} 除去により著明に抑制された。また、NO ドナーの *S*-nitrosocysteine (SNOC) によってもグルタミン酸と類似した急性の神経毒性が誘発された。これらの結果は、急性グルタミン酸神経毒性の機序に、NMDA 受容体を介した細胞内への Ca^{2+} 流入と、それに続く NO 合成酵素の活性化に伴い産生される NO が関与していることを示唆する。

培養大脳皮質細胞の急性グルタミン酸神経毒性に対するシグマ受容体リガンドの作用を検討した結果、NMDA 受容体に親和性を持つリガンドの (+)-SKF10,047, haloperidol および (-)-PPAP は急性グルタミン酸神経毒性を抑制するのに対して、NMDA 受容体に親和性を持たないリガンドの carbetapentanc および (+)-3-PPP はグルタミン酸神経毒性に影響を与えないことを見出した。また、(+)-SKF10,047, haloperidol および (-)-PPAP の神経保護作用はシグマ受容体拮抗薬により影響を受けなかった。Fura-2 蛍光を指標とした細胞内 Ca^{2+} 測定において、(+)-SKF10,047 および haloperidol は、グルタミン酸刺激後の細胞内への Ca^{2+} 流入を著明に抑制したが、この作用もシグマ受容体拮抗薬により影響を受けなかった。以上の結果より、培養大脳皮質細胞の急性グルタミン酸神経毒性に対して NMDA 受容体に親和性を持つシグマ受容体リガンドが著明な保護作用を示し、その神経保護作用にはシグマ受容体は関与せず、むしろ NMDA 受容体に対する直接的抑制作用が主たる役割を果たすことが示唆された。

第2章 *In vitro* 化学的虚血誘発神経細胞死におけるグルタミン酸神経毒性の関与およびシグマ受容体リガンドの作用

酸化リン酸化阻害薬のアジ化ナトリウムと解糖系阻害薬の 2-デオキシグルコースを用いて培養大脳皮質細胞に化学的に低酸素 - 低血糖状態を負荷した。この *in vitro* 化学的虚血により誘発される神経細胞死は NMDA 受容体拮抗薬および細胞外液の Ca^{2+} 除去により著明に抑制された。さらに、化学的虚血負荷後に培養液中のグルタミン酸濃度が上昇することなどの知見から、化学的虚血誘発神経細胞死にグルタミン酸神経毒性が関与することが示された。化学的虚血誘発神経細胞

死に対するシグマ受容体リガンドの作用を検討した結果、(+)-SKF 10,047 および haloperidol は化学的虚血誘発神経細胞死を抑制したが、carbetapentane および(+)-3-PPP は抑制しなかった。(+) -SKF10,047 および haloperidol の神経保護作用はシグマ受容体拮抗薬により抑制されなかった。以上の結果より、初代培養大脳皮質細胞を用いた *in vitro* 化学的虚血誘発神経細胞死においてグルタミン酸神経毒性が重要な役割を果たすこと、および、化学的虚血誘発神経細胞死に対しても NMDA 受容体に親和性を持つシグマ受容体リガンドが保護作用を示すことが明らかとなった。

第3章 グルタミン酸神経毒性を抑制する内因性保護物質の探索

培養大脳皮質細胞に比べ培養線条体細胞はグルタミン酸神経毒性に対する感受性が低いことを見出し、その原因の一つに培養線条体細胞がグルタミン酸神経毒性を抑制する物質に保護されている可能性を想定した。そこで、グルタミン酸存在下に線条体細胞を培養して得られる条件培地 (CM) の作用を検討したところ、培養大脳皮質細胞のグルタミン酸神経毒性を抑制することを見出した。CM 中に含まれる神経保護活性物質はエーテルなどの有機溶媒により抽出された。さらに、CM 中に10%含まれる牛胎仔血清 (FCS) のエーテル抽出物も比較的大量の投与によりグルタミン酸神経毒性を抑制した。原料の確保が容易なことから、FCS エーテル抽出物に焦点を絞って検討した結果、FCS エーテル抽出物は NO 誘発神経毒性を抑制することにより神経保護作用を発現することを見出した。非胎仔血清の馬血清のエーテル抽出物もまたグルタミン酸神経毒性を抑制したが、その作用は FCS エーテル抽出物に比べ弱く、NO 誘発神経毒性に対しては影響がなかった。FCS エーテル抽出物に含まれる神経保護活性物質の精製・単離を行った結果、分子量382の化合物が得られた。

以上、著者は、培養大脳皮質細胞の急性グルタミン酸神経毒性に NMDA 受容体を介した NO 産生が重要な役割を果たすこと、および、*in vitro* 化学的虚血誘発神経細胞死においてグルタミン酸神経毒性が関与することを示し、これらの神経細胞死に対してシグマ受容体リガンドが NMDA 受容体の直接的抑制により保護作用を発現することを明らかにした。さらに、急性グルタミン酸神経毒性を抑制する新規内因性保護物質が、CM ならびに FCS のエーテル抽出物中に含まれることを見出した。本研究の成果は、脳虚血をはじめとする中枢神経変性疾患の予防・治療薬の開発に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

脳虚血および種々の中枢神経変性疾患において、グルタミン酸をはじめとする興奮性アミノ酸は神経細胞死を引き起こす重要な危険因子の一つと考えられ、グルタミン酸神経毒性の機序の解明ならびにグルタミン酸神経毒性を抑制する物質の探索は、中枢神経変性疾患の予防・治療薬の開発において重要な役割を果たすと期待されている。本研究において著者は、ラット胎仔由来初代培養大脳皮質細胞を用い、急性グルタミン酸神経毒性の機序と *in vitro* 化学的虚血誘発神経細胞死の機序を明らかにし、さらに、これらの神経細胞死を抑制する保護物質としてシグマ受容体リガンドの作用を解析および牛胎仔血清由来神経保護活性物質の作用を検討を行い、以下の新知見を得た。

はじめに、培養大脳皮質細胞におけるグルタミン酸神経毒性の機序とシグマ受容体リガンドの作用を解析した。培養大脳皮質細胞を高濃度のグルタミン酸で短時間処置することにより誘発される急性神経毒性は、N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体拮抗薬、一酸化窒素 (NO) 合成酵素阻害薬の投与により抑制された。さらに、NO ドナーの投与によってもグルタミン酸と類似した急性の神経毒性が誘発された。急性グルタミン酸神経毒性に対するシグマ受容体リガンドの作用を検討した結果、NMDA 受容体に親和性を持つリガンドの (+)-SKF10,047, haloperidol および (-)-PPAP は急性グルタミン酸神経毒性を抑制するのに対して、NMDA 受容体に親和性を持たないリガンドの carbetapentane および (+)-3-PPP は抑制しないことを見出した。また、(+)-SKF10,047, haloperidol および (-)-PPAP の保護作用はシグマ受容体拮抗薬により影響を受けなかった。Fura-2 蛍光を指標とした細胞内 Ca^{2+} 測定において、(+)-SKF10,047 および haloperidol は、グルタミン酸刺激後の細胞内への Ca^{2+} 流入を著明に抑制したが、この作用もシグマ受容体拮抗薬により影響を受けなかった。これらの結果より、培養大脳皮質細胞の急性グルタミン酸神経毒性に対して NMDA 受容体に親和性を持つシグマ受容体リガンドが著名な保護作用を示し、その神経保護作用にはシグマ受容体は関与せず、むしろ NMDA 受容体に対する直接的抑制作用が主たる役割を果たすことが示唆された。

次いで、*In vitro* 化学的虚血誘発神経細胞死におけるグルタミン酸神経毒性の関与およびシグマ受容体リガンドの作用を

検討した。酸化的リン酸化阻害薬のアジ化ナトリウムと解糖系阻害薬の2-デオキシグルコースを用いて培養大脳皮質細胞に化学的に低酸素-低血糖状態を負荷した。この *in vitro* 化学的虚血により誘発される神経細胞死は NMDA 受容体拮抗薬により抑制された。さらに、化学的虚血負荷後に培養液中のグルタミン酸濃度が上昇することなどの知見から、化学的虚血誘発神経細胞死にグルタミン酸神経毒性が関与することが示された。化学的虚血誘発神経細胞死に対するシグマ受容体リガンドの作用を検討した結果、(+)-SKF10,047 および haloperidol は化学的虚血誘発神経細胞死を抑制したが、carbetapentane および (+)-3-PPP は抑制しなかった。(+)SKF10,047 および haloperidol の神経保護作用はシグマ受容体拮抗薬により抑制されなかった。以上の結果より、初代培養大脳皮質細胞を用いた *in vitro* 化学的虚血誘発神経細胞死においてグルタミン酸神経毒性が重要な役割を果たすこと、および、化学的虚血誘発神経細胞死に対しても NMDA 受容体に親和性を持つシグマ受容体リガンドが保護作用を示すことが明らかとなった。

さらに、グルタミン酸神経毒性を抑制する内因性保護物質の探索を行った。グルタミン酸存在下に線条体細胞を培養して得られる条件培地 (CM) の作用を検討したところ、培養大脳皮質細胞のグルタミン酸神経毒性を抑制することを見出した。CM 中に含まれる神経保護活性物質はエーテルなどの有機溶媒により抽出された。さらに、CM 中に10%含まれる牛胎仔血清 (FCS) のエーテル抽出物も比較的大量の投与によりグルタミン酸神経毒性を抑制した。原料の確保が容易なことがら、FCS エーテル抽出物に焦点を絞って検討した結果、FCS エーテル抽出物は NO 誘発神経毒性を抑制することにより神経保護作用を発現することを見出した。FCS エーテル抽出物に含まれる神経保護活性物質の精製・単離を行った結果、分子量 382 の化合物が得られた。

以上、著者は、培養大脳皮質細胞の急性グルタミン酸神経毒性に NMDA 受容体を介した NO 産生が重要な役割を果たすこと、および、*in vitro* 化学的虚血誘発神経細胞死においてグルタミン酸神経毒性が関与することを示し、これらの神経細胞死に対してシグマ受容体リガンドが NMDA 受容体の直接的抑制により保護作用を発現することを明らかにした。さらに、急性グルタミン酸神経毒性を抑制する新規内因性保護物質が牛胎仔血清のエーテル抽出物に含まれることを見出した。本研究の成果は、脳虚血をはじめとする中枢神経変性疾患の予防・治療薬の開発に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認める。

更に、平成13年2月26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。