

(論文内容の要旨)

神経新生には、神経前駆細胞増加、運命決定、細胞移動、神経突起伸長、シナプス形成などのステージが存在する。中枢における神経新生が少ない理由のひとつとして、神経突起伸長が抑制されていることがあげられる。神経突起伸長を促進、増強することは、神経新生の増加につながり、その結果、神経疾患における中枢神経機能を改善することが期待される。パーキンソン病やアルツハイマー病などの神経変性疾患では、疾患特異的な神経細胞の変性・脱落が起こり、症状が発症する。本研究において著者は、パーキンソン病治療薬およびアルツハイマー病治療薬が神経突起伸長作用を有するか検討し、その機序について解析した。

第一章 パーキンソン病治療薬の神経突起伸長に対する作用

パーキンソン病は中脳黒質ドパミン神経細胞の選択的な脱落で特徴づけられる神経変性疾患である。近年、パーキンソン病モデル動物において、ドパミンAゴニストが黒質-線条体の投射を回復させ、行動を改善することが報告された。ドパミンAゴニストが黒質-線条体の投射を回復させる機序として、神経前駆細胞数の増加が示唆されているが、神経新生の他のステージ（運命決定、細胞移動、軸索/樹状突起伸長、シナプス形成など）の関与は明らかにされていない。ドパミンAゴニストが神経突起伸長作用を有するかを明らかにするため、著者らはドパミンD₂受容体Aゴニストであるブロモクリプチン、タリペキソールおよびプラミペキソールの突起伸長作用を、神経突起伸長のモデルとして頻用されているPC12細胞を用いて検討した。ブロモクリプチンは濃度依存的に突起伸長を引き起こした。しかし、タリペキソールおよびプラミペキソールは突起伸長に影響を与えなかった。ドパミンD₂受容体アンタゴニストであるドンペリドンおよびスルピリドはブロモクリプチン誘発神経突起伸長に影響を与えなかった。これらの結果はドパミンD₂受容体刺激が神経突起伸長に影響を与えないことを示唆する。次に、著者らはブロモクリプチンが神経突起伸長を引き起こす機序を検討した。PC12細胞における神経突起伸長にはmitogen-activated protein kinase kinase (MEK) によるextracellular signal-regulated kinase (ERK) のリン酸化が重要な役割を果たすことが知られている。そこで、ブロモクリプチン誘発神経突起伸長におけるMEK/ERK経路の関与について検討した。MEK阻害薬は、ブロモクリプチン誘発神経突起伸長を有意に抑制した。また、ブロモクリプチン処置によりERKのリン酸化が引き起こされた。さらにSrc阻害薬は、ブロモクリプチンによる神経突起伸長を有意に抑制し、ERKのリン酸化を抑制した。以上の結果より、ドパミンD₂受容体の活性化は神経突起伸長に影響を与えず、ブロモクリプチンは、SrcおよびMEK/ERKの活性化を介して、PC12細胞の神経突起を伸長することが示唆された。

第二章 アルツハイマー病治療薬の神経突起伸長に対する作用

ドネペジルは強力かつ選択的なアセチルコリンエステラーゼ阻害薬でアルツハイマー病の治療に用いられている。しかし、ドネペジルはアセチルコリンエステラーゼ阻害作用に加えて、神経保護作用や神経前駆細胞の増加作用を有することが報告されている。著者らは、ドネペジルが神経突起伸長作用を有するか否かを明らかにする目的で、ドネペジルの PC12 細胞に対する神経突起伸長作用を検討した。ドネペジルは神経成長因子 (NGF) 誘発神経突起伸長を有意に増強し、その作用は濃度依存的であった。一方、単独では突起の伸長に影響を与えなかった。ドネペジルの作用機序として、ドネペジルのアセチルコリンエステラーゼ阻害活性により、アセチルコリン受容体が刺激され、神経突起伸長が増強される可能性が考えられる。しかし、ドネペジルによる突起伸長増強作用はアセチルコリン受容体アンタゴニストによって阻害されなかった。さらに、アセチルコリン受容体のアゴニストは突起の伸長に影響を与えなかった。これらの結果より、ドネペジルの NGF 誘発突起伸長増強作用にはアセチルコリンエステラーゼ阻害活性は関係していないことが示唆された。NGF 誘発突起伸長には ERK のリン酸化が重要である。ドネペジルは NGF 誘発 ERK リン酸化を増強させた。これらの結果より、ドネペジルが、ERK のリン酸化の増強によって突起の伸長を増強することが示唆された。

ドネペジルは $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX) を活性化することが報告されている。NCX は細胞内 Ca^{2+} 濃度の調節に関与することが報告されており、細胞内 Ca^{2+} 濃度の調節は神経突起伸長において重要な役割を果たす。これらのことより、ドネペジルの神経突起伸長増強作用に NCX が関わっている可能性が考えられる。そこで、PC12 細胞における NGF 誘発神経突起伸長に対する NCX 阻害薬の作用を検討した。NGF と同時に NCX 阻害薬を 1 日間処置したところ、NGF 誘発神経突起伸長は有意に抑制された。次に、NCX 阻害薬による NGF 誘発 ERK リン酸化に対する影響を検討したところ、NCX 阻害薬は NGF 誘発性 ERK リン酸化を抑制しなかった。以上の結果より、NCX 阻害薬は ERK のリン酸化を介さずに突起の伸長を抑制することが示唆された。したがって、ドネペジルは、ERK のリン酸化の増強作用に加えて、NCX 活性化作用により、NGF 誘発神経突起伸長作用を増強することが考えられる。

以上、著者は、パーキンソン病治療薬のブロモクリプチンが Src、MEK/ERK 経路を介して神経突起伸長作用を示すことを明らかにした。さらに、アルツハイマー病治療薬のドネペジルが NGF 誘発突起伸長を増強し、その機序には ERK の活性化および NCX の活性化が関与することを示した。本研究の成果は、神経突起伸長の機序の解明に寄与するものであり、神経変性疾患の新しい治療法の開発など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)

神経新生には、神経前駆細胞増加、運命決定、細胞移動、神経突起伸長、シナプス形成などのステージが存在する。神経突起伸長を促進、増強することは、神経新生の増加につながり、その結果、神経疾患における中枢神経機能を改善することが期待される。パーキンソン病やアルツハイマー病などの神経変性疾患では、疾患特異的な神経細胞の変性・脱落が起こり、症状が発症する。申請者は、パーキンソン病治療薬およびアルツハイマー病治療薬の神経突起伸長作用を検討し、その機序について解析した。

第一章 パーキンソン病治療薬の神経突起伸長に対する作用

ドパミンアゴニストが神経突起伸長作用を有するかを明らかにするため、著者らはドパミン D2 受容体アゴニストであるブロモクリプチン、タリペキソールおよびプラミペキソールの突起伸長作用を、神経突起伸長のモデルとして頻用されている PC12 細胞を用いて検討した。ブロモクリプチンは濃度依存的に突起伸長を引き起こした。しかし、タリペキソールおよびプラミペキソールは突起伸長に影響を与えなかった。ドパミン D2 受容体アンタゴニストであるドンペリドンおよびスルピリドはブロモクリプチン誘発神経突起伸長に影響を与えなかった。これらの結果はドパミン D2 受容体刺激が神経突起伸長に影響を与えないことを示唆する。ブロモクリプチン誘発神経突起伸長における MEK/ERK 経路の関与について検討した結果、MEK 阻害薬は、ブロモクリプチン誘発神経突起伸長を有意に抑制し、ブロモクリプチン処置により ERK のリン酸化が引き起こされることなどを明らかにした。さらに、Src 阻害薬は、ブロモクリプチンによる神経突起伸長を有意に抑制し、ERK のリン酸化を抑制した。これらの結果より、ドパミン D2 受容体の活性化は神経突起伸長に影響を与えず、ブロモクリプチンは、Src および MEK/ERK の活性化を介して、PC12 細胞の神経突起を伸長することが示唆された。

第二章 アルツハイマー病治療薬の神経突起伸長に対する作用

アルツハイマー病治療薬であるドネペジルが神経突起伸長作用を有するか否かを明らかにする目的で、ドネペジルの PC12 細胞に対する神経突起伸長作用を検討した。ドネペジルは神経成長因子 (NGF) 誘発神経突起伸長を有意に増強し、その作用は濃度依存的であった。一方、単独では突起の伸長に影響を与えなかった。ド

ネペジルの作用機序として、ドネペジルのアセチルコリンエステラーゼ阻害活性により、アセチルコリン受容体が刺激され、神経突起伸長が増強される可能性が考えられる。しかし、ドネペジルによる突起伸長増強作用はアセチルコリン受容体アンタゴニストによって阻害されなかった。さらに、アセチルコリン受容体のアゴニストは突起の伸長に影響を与えなかった。これらの結果より、ドネペジルの NGF 誘発突起伸長増強作用にはアセチルコリンエステラーゼ阻害活性は関係していないことが示唆された。NGF 誘発突起伸長には ERK のリン酸化が重要である。ドネペジルは NGF 誘発 ERK リン酸化を増強させた。これらの結果より、ドネペジルが、ERK のリン酸化の増強によって突起の伸長を増強することが示唆された。

ドネペジルは $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX) を活性化することが報告されている。NCX は細胞内 Ca^{2+} 濃度の調節に関与することが報告されており、細胞内 Ca^{2+} 濃度の調節は神経突起伸長において重要な役割を果たす。これらのことより、ドネペジルの神経突起伸長増強作用に NCX が関わっている可能性が考えられる。そこで、PC12 細胞における NGF 誘発神経突起伸長に対する NCX 阻害薬の作用を検討した。NGF と同時に NCX 阻害薬を 1 日間処置したところ、NGF 誘発神経突起伸長は有意に抑制された。次に、NCX 阻害薬による NGF 誘発 ERK リン酸化に対する影響を検討したところ、NCX 阻害薬は NGF 誘発性 ERK リン酸化を抑制しなかった。以上の結果より、NCX 阻害薬は ERK のリン酸化を介さずに突起の伸長を抑制することが示唆された。したがって、ドネペジルは、ERK のリン酸化の増強作用に加えて、NCX 活性化作用により、NGF 誘発神経突起伸長作用を増強することが考えられる。

以上、申請者は、パーキンソン病治療薬のプロモクリプチンが Src、MEK/ERK 経路を介して神経突起伸長作用を示すことを明らかにした。さらに、アルツハイマー病治療薬のドネペジルが NGF 誘発突起伸長を増強し、その機序には ERK の活性化および NCX の活性化が関与することを示した。本研究の成果は、神経突起伸長の機序の解明に寄与するものであり、神経変性疾患の新しい治療法の開発など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）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成 21 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。