

氏 名	た ぐち りょう た 田 口 良 太
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	薬 博 第 578 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	内因性神経保護活性物質セロフェンド酸によるアポトーシス制御および その機序に関する研究

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

グルタミン酸は、生理的条件下においては興奮性神経伝達物質として働くが、脳虚血時やアルツハイマー病をはじめとする種々の神経変性疾患などの病態時に過剰に遊離されると神経細胞死を引き起こす。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内因性物質の探索は、神経変性疾患の予防・治療薬の開発研究において重要な役割を果たすと考えられる。著者は、グルタミン酸による神経細胞死を抑制する内因性の神経保護物質として、ウシ胎仔血清中からアチサン型環状ジテルペンを基本構造とした新規化合物セロフェンド酸の単離に成功した。本研究では、セロフェンド酸および低濃度一酸化窒素 (NO) の神経保護作用機序について検討した結果、以下の新知見を得た。

第一章 NO を介するグルタミン酸神経毒性に対するセロフェンド酸の保護作用

推定構造に基づき合成されたセロフェンド酸の薬理活性を評価する目的で、ラット胎仔由来初代培養大脳皮質細胞におけるグルタミン酸神経毒性に対する作用を検討した。培養大脳皮質細胞に 500 μ M のグルタミン酸を 1 時間投与すると、急性のグルタミン酸神経毒性が観察された。セロフェンド酸はグルタミン酸との同時投与では保護作用を示さなかったが、30 分以上の前投与を行うことによりグルタミン酸神経毒性を濃度依存的に抑制した。しかし、セロフェンド酸はグルタミン酸投与による細胞内 Ca^{2+} 濃度の増大および cGMP の生成には影響を与えなかった。そこで次に、 Ca^{2+} 選択的なイオノフォアを形成して細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させるイオノマイシンおよび NO ドナーである S-ニトロソシステインにより誘発される神経毒性に対するセロフェンド酸の作用を検討した結果、セロフェンド酸はいずれの神経毒性も抑制した。以上の結果より、セロフェンド酸は培養大脳皮質細胞におけるグルタミン酸神経毒性を抑制し、その保護作用は NMDA 受容体刺激により生成する NO の神経毒性に対する抑制作用に基づくものであることが示唆された。

第二章 グルタミン酸により誘発されるアポトーシス性神経細胞死に対するセロフェンド酸の保護作用

グルタミン酸により誘発される神経細胞死にはネクローシスおよびアポトーシスの両者が関与することが報告されている。本章において著者は、グルタミン酸により誘発されるアポトーシス性の神経細胞死に対するセロフェンド酸の作用を検討した。培養大脳皮質細胞に 100 μ M のグルタミン酸を 24 時間投与することにより細胞体の萎縮および細胞核の断片化を特徴とするアポトーシス性の神経細胞死が観察された。この神経細胞死はカスパーゼ阻害薬である z-VAD-fmk の投与により抑制された。セロフェンド酸の作用を検討したところ、急性グルタミン酸神経毒性に対する作用と同様に、グルタミン酸との同時投与では保護作用を示さなかったが、1 時間の前投与をすることによりグルタミン酸による神経細胞死を抑制した。そこで次に、ミトコンドリア膜電位および細胞内カスパーゼ 3 活性を測定したところ、グルタミン酸投与により 5 分後にはミトコンドリア膜電位が低下し、また投与後 3 時間をピークとする一過性の細胞内カスパーゼ 3 活性の上昇が観察されたが、セロフェンド酸はミトコンドリア脱分極とそれに引き続き起こる細胞内カスパーゼ 3 の活性化を抑制した。セロフェンド酸のカスパーゼ各分子種に対する作用を human recombinant caspase を用いて検討した結果、セロフェンド酸は保護作用を発現する濃度よりも高濃度が必要ではあるが、検討した全ての分子種の酵素活性を濃度依存的に抑制した。以上の結果より、

セロフェンド酸は培養大脳皮質細胞においてグルタミン酸により誘発されるアポトーシス性の神経細胞死に対してミトコンドリアの脱分極を抑制することによって抗アポトーシス作用を示し、さらにより高濃度においてはカスパーゼ活性を直接抑制することが示された。

第三章 グルタミン酸神経毒性に対する低濃度 NO の保護作用機序

NO はグルタミン酸神経毒性のメディエーターとして働くとともに、低濃度では神経保護作用を発現することが指摘されてきたが、その作用機序の詳細については不明な点が多い。ニトロキシ基を側鎖に持つアドレナリン α_1 受容体および β 受容体遮断薬ニブラジロールは緑内障治療薬として臨床的に用いられており、近年、網膜に対する神経保護作用を発現することが報告されている。本章において著者は、細胞内の酵素により代謝されて NO を遊離するニブラジロールを NO ドナーとして用い、その作用を脱ニトロキシニブラジロールと比較検討した。ニブラジロールは高濃度 ($500\mu\text{M}$) においては著明な神経細胞死を惹起したが、低濃度 ($10\text{--}100\mu\text{M}$) のニブラジロールはグルタミン酸神経毒性を抑制した。脱ニトロキシニブラジロールはグルタミン酸神経毒性に影響を与えなかった。そこで次に、細胞内 Ca^{2+} 濃度を測定したところ、ニブラジロールはグルタミン酸投与による細胞内 Ca^{2+} 濃度の増大を抑制したが、脱ニトロキシニブラジロールは影響を与えなかった。以上の結果より、ニブラジロールは細胞内で代謝されて NO を遊離し、NMDA 受容体機能を抑制することによりグルタミン酸神経毒性に対して保護作用を発現することが示された。

以上、著者は、セロフェンド酸が培養大脳皮質細胞におけるネクローシス性およびアポトーシス性グルタミン酸神経毒性を抑制することを見出し、グルタミン酸によるミトコンドリア脱分極の抑制作用およびカスパーゼ活性阻害作用を有することを明らかにした。さらに、臨床的に緑内障治療薬として用いられているニブラジロールが NMDA 受容体機能の抑制作用によりグルタミン酸神経毒性を抑制することを見出した。本研究の成果は、脳卒中やアルツハイマー病をはじめとする種々の神経変性疾患における神経細胞死の機序の解明、内因性神経保護因子の探索およびそれら疾患の予防・治療薬の開発研究において重要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

グルタミン酸は、生理的条件下においては興奮性神経伝達物質として働くが、脳虚血時やアルツハイマー病をはじめとする種々の神経変性疾患などの病態時に過剰に遊離されると神経細胞死を引き起こす。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内因性物質の探索は、神経変性疾患の予防・治療薬の開発研究において重要な役割を果たすと考えられる。著者は、グルタミン酸による神経細胞死を抑制する内因性の神経保護物質として、ウシ胎仔血清中からアチサン型環状ジテルペンを基本構造とした新規化合物セロフェンド酸の単離に成功した。本研究では、セロフェンド酸および低濃度一酸化窒素 (NO) の神経保護作用機序について検討した結果、以下の新知見を得た。

第一章 NO を介するグルタミン酸神経毒性に対するセロフェンド酸の保護作用

推定構造に基づき合成されたセロフェンド酸の薬理活性を評価する目的で、ラット胎仔由来初代培養大脳皮質細胞におけるグルタミン酸神経毒性に対する作用を検討した。培養大脳皮質細胞に $500\mu\text{M}$ のグルタミン酸を 1 時間投与すると、急性のグルタミン酸神経毒性が観察された。セロフェンド酸はグルタミン酸との同時投与では保護作用を示さなかったが、30 分以上の前投与を行うことによりグルタミン酸神経毒性を濃度依存的に抑制した。しかし、セロフェンド酸はグルタミン酸投与による細胞内 Ca^{2+} 濃度の増大および cGMP の生成には影響を与えなかった。そこで次に、イオノマイシンおよび S-ニトロソシステインにより誘発される神経毒性に対するセロフェンド酸の作用を検討した結果、セロフェンド酸はいずれの神経毒性も抑制した。以上の結果より、セロフェンド酸は培養大脳皮質細胞におけるグルタミン酸神経毒性を抑制し、その保護作用は NMDA 受容体刺激により生成する NO の神経毒性に対する抑制作用に基づくものであることが示唆された。

第二章 グルタミン酸により誘発されるアポトーシス性神経細胞死に対するセロフェンド酸の保護作用

グルタミン酸により誘発される神経細胞死にはネクローシスおよびアポトーシスの両者が関与することが報告されている。本章において著者は、グルタミン酸により誘発されるアポトーシス性の神経細胞死に対するセロフェンド酸の作用を検討した。培養大脳皮質細胞に $100\mu\text{M}$ のグルタミン酸を 24 時間投与することにより細胞体の萎縮および細胞核の断片化を特徴とするアポトーシス性の神経細胞死が観察された。この神経細胞死はカスパーゼ阻害薬により抑制された。セロフェンド酸の

作用を検討したところ、1時間の前投与をすることによりグルタミン酸による神経細胞死を抑制した。そこで次に、ミトコンドリア膜電位および細胞内カスパーゼ3活性を測定したところ、グルタミン酸投与により5分後にはミトコンドリア膜電位が低下し、また投与後3時間をピークとする一過性の細胞内カスパーゼ3活性の上昇が観察されたが、セロフェンド酸はミトコンドリア脱分極とそれに引き続き起こる細胞内カスパーゼ3の活性化を抑制した。セロフェンド酸のカスパーゼ各分子種に対する作用を human recombinant caspase を用いて検討した結果、セロフェンド酸は保護作用を発現する濃度よりも高濃度が必要ではあるが、検討した全ての分子種の酵素活性を濃度依存的に抑制した。以上の結果より、セロフェンド酸は培養大脳皮質細胞においてグルタミン酸により誘発されるアポトーシス性の神経細胞死に対してミトコンドリアの脱分極を抑制することによって抗アポトーシス作用を示し、さらにより高濃度においてはカスパーゼ活性を直接抑制することが示された。

第三章 グルタミン酸神経毒性に対する低濃度 NO の保護作用機序

NO はグルタミン酸神経毒性のメディエーターとして働くとともに、低濃度では神経保護作用を発現することが指摘されてきたが、その作用機序の詳細については不明な点が多い。ニトロキシ基を側鎖に持つアドレナリン α_1 受容体および b 受容体遮断薬ニブラジロールは緑内障治療薬として臨床的に用いられており、近年、網膜に対する神経保護作用を発現することが報告されている。本章において著者は、細胞内の酵素により代謝されて NO を遊離するニブラジロールを NO ドナーとして用い、その作用を脱ニトロキシニブラジロールと比較検討した。ニブラジロールは高濃度 (500 μ M) においては著明な神経細胞死を惹起したが、低濃度 (10-100 μ M) のニブラジロールはグルタミン酸神経毒性を抑制した。脱ニトロキシニブラジロールはグルタミン酸神経毒性に影響を与えなかった。そこで次に、細胞内 Ca^{2+} 濃度を測定したところ、ニブラジロールはグルタミン酸投与による細胞内 Ca^{2+} 濃度の増大を抑制したが、脱ニトロキシニブラジロールは影響を与えなかった。以上の結果より、ニブラジロールは細胞内で代謝されて NO を遊離し、NMDA 受容体機能を抑制することによりグルタミン酸神経毒性に対して保護作用を発現することが示された。

以上、著者は、セロフェンド酸が培養大脳皮質細胞におけるネクローシス性およびアポトーシス性グルタミン酸神経毒性を抑制することを見出し、グルタミン酸によるミトコンドリア脱分極の抑制作用およびカスパーゼ活性阻害作用を有することを明らかにした。さらに、臨床的に緑内障治療薬として用いられているニブラジロールが NMDA 受容体機能の抑制作用によりグルタミン酸神経毒性を抑制することを見出した。本研究の成果は、脳卒中やアルツハイマー病をはじめとする種々の神経変性疾患における神経細胞死の機序の解明、内因性神経保護因子の探索およびそれら疾患の予防・治療薬の開発研究において重要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。