

審査の結果の要旨

氏名 高野博通

AD 治療薬としてアリセプトやメマンチンが市販されているが、病態の進行を遅延させるにとどまっておき、原因療法はもとより病態の進行を止める薬剤は存在しない。一方、脳梗塞においては、血管が閉塞して脳虚血に陥ると中枢の神経細胞へ十分な酸素が供給されず、神経細胞死が誘導されるが、その原因は血栓による血流の低下にあることから、tissue plasminogen activator (t-PA)等の血栓溶解療法が用いられている。しかし、発症後 3 時間以内に t-PA を処置しなければならぬため治療可能時間は非常に短く、また、重篤な副作用である脳出血を引き起こす危険性がある。現在適用されているこれら両疾患の治療薬では満たされないニーズに対し、新たな作用機作による治療薬が必要であることは明白である。両疾患は共に神経変性疾患の一つであり神経細胞死が誘導されるが、細胞死に至る機序については数多くの不明な点が残されている。従って、それぞれの疾患における神経細胞死に至るメカニズムを解明する意義は非常に大きい。

本研究で高野は、1) AD において重要な役割を演じている β アミロイド ($A\beta$)により誘導される神経細胞死について c-Jun N-terminal kinase (JNK)を中心にそのメカニズムを明らかにすること、2) 脳虚血時に惹起される細胞内への Ca^{2+} 流入を介した神経細胞死について、calmodulin (CaM)および CaM 依存性酵素を中心にそのメカニズムを明らかにすることを目的に研究を行い、以下の点を明らかにした。

1. $A\beta$ 刺激誘導の神経細胞死のメカニズム

AD の病理的特徴の一つに患者脳における老人斑が挙げられる。老人斑は凝集した $A\beta$ が脳に沈着したものである。AD の発症機序はいまだ解明されていないが $A\beta$ 仮説が最も支持されている。 $A\beta$ 刺激誘導の神経細胞死には、酸化ストレスや細胞内 Ca^{2+} の恒常性の破綻、蛋白質合成依存的なメカニズムが示唆されているが、細胞死の引き金を引く直接の細胞内情報伝達系は明確にされていない。神経細胞死のメカニズムに関してはいくつかの報告があるが、JNK の関与を示唆する報告が数多い。JNK には 1~3 の isoform が存在するが、JNK3 は主に中枢に特異的に発現する。そこで高野は、JNK が中枢において $A\beta$ による神経細胞死に重要であることが明らかとなれば、JNK3 を特異的に阻害することにより AD の神経細胞死を抑制し、病態の進行を止め得る新規 AD 治療薬の創製に繋がる可能性があると考えた。そこで、主にげっ歯類の初代培養神経細胞を用いて JNK の $A\beta$ 刺激誘導神経細胞死への関与を検討し、さらにその下流のシグナル伝達機構を解析した。その結果、1) JNK の上流の酵素および c-Jun の機能欠損型の遺伝子を細胞に導入した神経細胞、あるいは 2) JNK3 KO マウスの神経細胞において、神経細胞死が減弱することを示し、 $A\beta$ 刺激誘導神経細胞死に JNK3 pathway が関与することを明らかにした。

JNK が細胞死を惹起するメカニズムについても不明な点が多いが、 $A\beta$ 刺激誘導のアポトーシスが JNK3-c-Jun の転写活性に依存していることから、標的因子が介在している可能性がある。そこで、 $A\beta$ 刺激により JNK が神経細胞死を惹起するメカニズムに FasL-Fas 系が関与する可能性

を考えた。その結果、1) A β 刺激により FasL mRNA および蛋白質の発現が誘導され、JNK3 KO マウスの神経細胞では認められないことを示した。また、A β 刺激により誘導される神経細胞死が、2) Fas の機能を阻害する蛋白質の前処理や、3) FasL および Fas の機能欠損型変異マウスの神経細胞において減弱すること、4) caspase-8 の阻害剤を処理することにより抑制されることなどを明らかにした。これらの結果から高野は、A β 刺激誘導の神経細胞死において JNK3-FasL-Fas-caspase-8 の経路が関与していることを示した。

2. 細胞内 Ca²⁺濃度上昇を介した中枢神経細胞死のメカニズム

脳梗塞は、血栓による脳虚血に端を発し、脱分極を介したグルタミン酸等の神経伝達物質の過剰な遊離、細胞内 Ca²⁺濃度の上昇、イオンバランスの破綻、種々の Ca²⁺依存性酵素の活性化等を介して細胞死を誘導することが報告されている。このように、Ca²⁺が虚血による神経細胞死に重要な役割を演じていると考えられているが、細胞内 Ca²⁺濃度の変動以降の主たる役割を担っているメカニズムについては不明な点が多い。虚血後の細胞内への Ca²⁺流入の後に Ca²⁺結合蛋白質である CaM が Ca²⁺と結合して活性化されることにより、CaM kinase II (CaMKII)、nitric oxide synthase (NOS)、calcineulin や phosphodiesterase 等の CaM 依存性経路が活性化され細胞障害が誘導されるという報告がある。CaM は中枢神経系に多く発現する Ca²⁺結合蛋白質である。CaM アンタゴニストが海馬の組織培養系において低酸素および低グルコースによる細胞障害に対して抑制作用を示すこと、Ca²⁺濃度上昇による細胞死や虚血性脳障害を抑制すること、CaM 依存性酵素の阻害剤が神経保護作用を示すこと、などの報告があることから、高野は CaM とその依存性酵素に注目して、虚血時の神経細胞死のメカニズムを検討した。初代培養神経細胞を用い、脳虚血の *in vitro* 試験系の一つと考えられている Na⁺ チャネル活性化剤 veratridine 刺激誘導の神経細胞死における CaM および CaM 依存性酵素の関与を調べた。その結果、veratridine 刺激誘導の細胞死において、1)各種 CaM アンタゴニストおよび CaMKII 阻害剤が細胞死を抑制し、その効果はその阻害活性の強さと一致すること、2) veratridine により CaMKII のリン酸化が亢進され、CaM や CaMKII 阻害剤によりリン酸化が抑制されること、3) 各種 NOS 阻害剤、calcineulin 阻害剤は細胞死に影響を与えないことを示し、veratridine 刺激誘導の神経細胞死に CaMKII が関与することを示した。さらに、脳虚血時の神経細胞内におけるイベントを模倣した実験系として、細胞内 Ca²⁺濃度上昇を介した神経細胞死モデルを用い、新規 CaM アンタゴニストである DY-9760e の保護効果を検討した。その結果、1) グルタミン酸刺激および N-methyl-D-aspartic acid (NMDA)刺激等の興奮毒性による細胞死、2) veratridine および高濃度 KCl による脱分極刺激誘導の細胞死、3) thapsigargin による小胞体からの Ca²⁺放出を介した細胞死に対して保護作用を示すことを明らかにした。以上の結果から、veratridine 刺激による神経細胞死に CaM / CaMKII が関与すること、また、DY-9760e が種々の細胞内 Ca²⁺濃度を上昇させる刺激により誘導される神経細胞死を抑制したことから、CaM が脳虚血による神経細胞死に対する保護薬の重要な標的であることを示唆した。

本研究により高野は、A β 刺激誘導の神経細胞死に JNK3-c-Jun-FasL-Fas-caspase-8 が関与することを明らかにした。また、脳虚血時の神経細胞死に CaM が重要な役割を演じ、その一部には CaMKII が

関与していること、CaM アンタゴニストが神経細胞保護作用を示すことを示した。JNK3 は中枢に特異的に作用して神経細胞死を抑制する新規 AD 治療薬の創製に、CaM は脳虚血時に神経細胞を保護する薬剤の創製に繋がるターゲットとして有用である可能性が示され、博士（薬学）に充分値するものと判断した。