

別紙 1

## 博士論文要旨

論文題目 : 脳虚血モデル動物における興奮性神経毒性に対する細胞内カリウムレベル低下による保護効果に関する研究

申請者 東 紘史 印

専攻分野 医療薬学専攻

研究指導分野 臨床薬学

指導教員 倉本 展行

神経変性疾患は神経細胞が徐々に脱落する疾患である。通常加齢とともに徐々に進行する神経変性が加速される機構には、異常タンパク質の蓄積、酸化ストレス等の他、興奮性神経毒性がある。興奮性伝達は神経系の情報伝達の根幹であるが、過剰な興奮は神経細胞を脱落させる。これを興奮性神経毒性という。興奮性神経毒性は、脳梗塞のような脳血管疾患後の神経変性にも関与する。脳梗塞は血管の閉塞により、低酸素・低栄養を来たす。それに伴い、梗塞巣から先の神経細胞や血管内皮細胞が傷害される。神経細胞が死ぬと神経細胞内に貯蔵されている興奮性伝達物質が遊離し、また、血管内皮細胞が死ぬと血液脳関門が破綻し、血漿中に含まれる神経細胞を興奮させる物質が神経組織に侵入することで周辺領域と呼ばれる梗塞巣周辺の神経組織が二次的に傷害を受ける。

グルタミン酸受容体の一つ、N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 受容体はカルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) チャンネル内蔵型の受容体である。神経細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$  流入は脱分極を引き起こすだけでなく、細胞内の種々の機能タンパク質の活性を変動させる。ミトコンドリアはマトリックス内に  $\text{Ca}^{2+}$  を取り込むことで細胞質基質の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が異常に高くないよう微弱ながら緩衝しているが、マトリックス内に  $\text{Ca}^{2+}$  が多くなると、ミトコンドリア膜透過性遷移孔 (PTP) と呼ばれる非特異的に陽イオン透過性を亢進するポアが開口する。ミトコンドリアの電子伝達系は内膜の内外に水素イオン ( $\text{H}^+$ ) の勾配を形成するとともに、内膜のマトリックス側に負の膜電位を形成させる。また  $\text{H}^+$  勾配は交換体を作動させることでマトリックスから  $\text{Ca}^{2+}$  及びカリウムイオン ( $\text{K}^+$ ) 等をくみ出す駆

動力となり、マトリックス内のこれらイオンの濃度を下げる。したがって PTP 開口はこれら陽イオンをマトリックス内へ戻し、ミトコンドリア内膜を脱分極させる。

通常  $K^+$  は細胞外よりも細胞質基質に多い。細胞膜の  $K^+$  チャネル開口は  $K^+$  を細胞外へ流出させて細胞膜を過分極させるが、ミトコンドリア内膜の  $K^+$  透過性亢進はマトリックス内へ  $K^+$  を流入させて、ミトコンドリア内膜を脱分極させる。ミトコンドリアの脱分極が大きい程、ミトコンドリアからチトクロム c が放出され、アポトーシスが誘引される。また細胞質画分とミトコンドリアマトリックスとの間の  $K^+$  濃度差が大きい程、脱分極の程度も大きくなる。したがって、細胞質基質の  $K^+$  濃度の低下は、PTP 開口時のミトコンドリア傷害の程度を下げる可能性がある。本研究では、ATP 感受性  $K^+$  ( $K_{ATP}$ ) チャネル開口薬であるミノキシジルにより細胞質基質  $K^+$  濃度が低下した神経細胞への興奮性神経毒性に対する神経細胞保護効果について検討した。

#### 〔中大脳動脈結紮術 (MCAO) による神経組織傷害とミノキシジルによる抑制効果〕

6 週齢の C57/BL6 雄性マウスの右頸動脈を露出させ、外頸動脈から幅 180-200  $\mu\text{m}$  のシリコンコーティングを施したナイロンファイバーを挿入し、中大脳動脈を閉塞した。この処置 1 時間後に再灌流することで、脳虚血再灌流モデル動物を作成した。ミノキシジルは中大脳動脈閉塞直後に尾静脈より投与した。再灌流 24 時間後の動物の自発運動量を測定したところ、MCAO 処置マウスは一方向性の回転運動数の増加を示したがミノキシジル投与はこの回転数を有意に減少させた。また、再灌流 24 時間後に 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 染色にて梗塞巣の定量を行ったところ、ミノキシジルは MCAO による虚血性神経組織傷害を濃度依存的に縮小し、神経組織保護作用を示した。

#### 〔ミノキシジルによる血圧低下作用が脳保護作用を示した可能性に関する検討〕

MCAO による虚血性神経組織傷害に対するミノキシジルの保護作用は、ミノキシジルの血圧低下作用に起因する可能性が考えられた。したがって、ミノキシジルと異なる系統の降圧薬によりミノキシジルと同等の血圧低下をもたらした条件で MCAO による虚血性神経組織傷害に対する保護効果について検討した。ミノキシジルは投与後 15 分後から血圧を 50% 以下に有意に抑制し、少なくとも投与後 180 分後まで持続した。 $\alpha$  受容体阻害薬ドキサゾシン、 $\alpha\beta$  受容体阻害薬カルベジロール、アンギオテンシン受容体阻害薬ロサルタンはそれぞれ 15 分後から血圧を 25% 程度有意に抑制したが、この作用は投与後 180 分以内に消失した。一方、ドキサゾシン・ロサルタン併用投与したところ、血圧を

50%程度有意に低下させ、少なくとも 180 分後まで持続した。この条件が、最もミノキシジルによる血圧低下作用を模倣したとして、MCAO 直後に投与した。しかしながらドキサゾシン・ロサルタン併用投与は、MCAO による虚血性神経組織傷害を抑制しなかった。したがって、ミノキシジルによる神経組織保護作用は少なくとも血圧低下と無関係である可能性が示唆された。

#### 〔初代培養神経細胞における興奮毒性に対するミノキシジルの抑制効果〕

マウス胎児大脳皮質由来初代培養神経細胞にミトコンドリア膜電位指示薬 DiSC<sub>3</sub>(5)を取り込ませた後、NMDA を曝露すると、DiSC<sub>3</sub>(5)の蛍光強度が増加し、ミトコンドリアの脱分極が認められた。この脱分極はミノキシジル前処置で抑制された。また、NMDA 曝露はミトコンドリアからのチトクロム c の細胞質への遊離、カスパーゼ 3 の活性化及び MTT 還元能の低下をもたらしたが、ミノキシジル前処置はこれらをすべて抑制した。したがって、ミノキシジルは K<sub>ATP</sub> チャンネルを開口することで、ミトコンドリアの脱分極に寄与する K<sup>+</sup>の絶対量を減少させることで、ミトコンドリアの脱分極の程度を減少させ、機能障害を抑制したと考えられた。

#### 〔K<sub>ATP</sub> チャンネル開口阻害薬によるミノキシジルの神経保護作用に対する効果〕

次に、K<sub>ATP</sub> チャンネル特異的阻害薬グリベングラミドを用いて、ミノキシジルの神経保護作用が抑制されるか検討した。グリベングラミドは、ミノキシジルによる MCAO 処置マウスの虚血性神経組織傷害の減少を有意に抑制した。また、グリベングラミドはミノキシジルによる培養神経細胞の細胞膜の K<sup>+</sup>透過性亢進及び細胞内 K<sup>+</sup>レベル低下を共に抑制した。さらに、グリベングラミドは培養神経細胞の細胞膜の Ca<sup>2+</sup>透過性を向上させ、ミノキシジルはこれを有意に抑制した。したがって、ミノキシジルによる保護作用は K<sub>ATP</sub> チャンネル開口に起因する細胞内 K<sup>+</sup>レベル減少を介していることが確認された。またグリベングラミドは、K<sub>ATP</sub> チャンネルを遮断することで神経細胞を脱分極させ、ミノキシジルはこれを競合的に阻害したと考えられた。

#### 〔総括〕

ミノキシジルは、MCAO を処置した動物での虚血性神経組織傷害を抑制した。この作用はミノキシジルの血圧低下作用ではなく、神経細胞への直接的な作用によるものであることが示唆された。ミノキシジルは培養神経細胞細胞膜にある K<sub>ATP</sub> チャンネル開口に伴い細胞内 K<sup>+</sup>レベルを減少させた。NMDA は神経細胞内に Ca<sup>2+</sup>濃度を増加させ、ミトコンドリア PTP 開口によるミトコンドリアの脱分極を誘導し、チトクロム c の遊離とカスパーゼ 3 の活性化によりアポトーシスを誘導したが、ミノキシジルによる細胞内 K<sup>+</sup>レベル低下は、PTP を介したミ

トコンドリアマトリックス内への  $K^+$ 流入の絶対量を減少させ、ミトコンドリアの脱分極の程度を抑制し、ミトコンドリアの機能障害を抑制することで、神経細胞保護作用を示すことが示唆された。

本研究では、細胞内  $K^+$ レベルが神経細胞の脆弱性を決定する因子である可能性が示唆された。また、 $K_{ATP}$  チャンネル開口薬には興奮性神経毒性を抑制する作用があることが示唆された。しかしながらこのチャンネルは、中枢神経系だけでなく、心臓血管系で血圧調整に、膵臓  $\beta$  細胞ではインスリン分泌調節に、それぞれ関与する等、その発現や役割は末梢で多岐にわたる。したがって、現存する  $K_{ATP}$  チャンネル開口薬を神経変性疾患に適応するのは末梢作用に起因する副作用が現れることが危惧され、現実的では無い。それよりも、神経細胞内の  $K^+$ 濃度を下げることができれば十分かもしれない。具体的な調査は無いが、神経変性疾患では神経細胞内の  $K^+$ 濃度が徐々に増加することで神経細胞が脆弱になっているかもしれない。したがって、中枢神経系に特異的に作用し、神経細胞内の  $K^+$ 濃度を低下させる薬物は、神経変性疾患に対して有効な予防または治療のために有用となる可能性が示唆される。