

# グルタミン酸神経毒性と内因性神経保護物質

田村 豊, 塩見浩人

## Glutamate neurotoxicity and endogenous neuroprotective substance

Yutaka TAMURA and Hirohito SHIOMI

### ABSTRACT

Glutamate is well known as an excitatory neurotransmitter in the vertebrate central nervous system (CNS). Recently, glutamate is also postulated to play an important role in the pathogenesis of the neuronal cell loss that is associated with several neurological disease states in the CNS. Glutamate neurotoxicity in the cultured cortical neurons is mediated by nitric oxide (NO). As the excitatory action of glutamate is regulated by other neurotransmitters, the neurotoxic action of glutamate may be affected by other endogenous substances. We have previously found that cholecystokinin (CCK) prevented glutamate neurotoxicity in the cultured cortical neurons. The evidence has suggested that CCK<sub>B</sub> receptor stimulation causes suppression of a step in NO formation triggered by N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor activation. CCK may have a role to promote cell survival in the life-regulatory function of the CNS. This review mainly discusses the mechanisms of glutamate neurotoxicity and CCK-induced protection against glutamate neurotoxicity.

## 【はじめに】

現在、日本を含む先進諸国では医療技術の進歩にともない非常な勢いで高齢化社会を向かえつつある。高齢化に関連して医学・薬学領域では「痴呆」が大きな問題として取り上げられている。痴呆は大別して血管障害性痴呆とアルツハイマー型痴呆の2つに分類されるが、どちらのタイプの痴呆も神経細胞が大量に死ぬことにより引き起こされる。痴呆は癌やエイズといった病気と比較すると「死」と直結した病気ではないが、QOL (quality of life) を考えるとき人類が緊急に克服しなければならない疾患の一つである。

近年、血管障害性痴呆の原因としてグルタミン酸による神経細胞死が注目されている。グルタミン酸は脊椎動物の中枢神経系における主要な興奮性神経伝達物質であり、大脳皮質を含む多くの部位における興奮性シナプス後電位や長期増強現象などに関与することが知られている<sup>1)</sup>。このような神経伝達物質としての作用に加えて、1980年代の中頃から、グルタミン酸が神経毒性を持つことが明らかにされ、中枢神経疾患と結び付けて考えられるようになってきた。そして最近では、中枢神経系の種々の変性疾患に伴う神経細胞死においてグルタミン酸が重要な役割を果たすことが明らかにされてきている<sup>2), 3)</sup>。したがって現在では、グルタミン酸は興奮性神経伝達物質と神経毒の2つの側面を持つと考えられている<sup>4), 5)</sup>。すなわちグルタミン酸は生理的条件下では興奮性神経伝達物質として働き、脳梗塞、脳溢血などの病的な条件下で過剰遊離された場合は神経毒として働き、中枢神経障害の原因となるとの説が広く認められている。

グルタミン酸の神経毒性に関する分野は最近の初代培養細胞系を用いた研究により大きく進歩した。特に、大脳皮質や海馬など知性・理性や記憶といった脳の高次機能に関与する部位の培養細胞において短時間のグルタミン酸処置が遅発性神経細胞死を誘発することから、初代培養細胞におけるグルタミン酸神経毒性が脳虚血などによる脳機能障害のモデルとして用いられるようになってきている。さらに、グルタミン酸神経毒性の発現機序を解明し、これを抑制する薬物を開発することが臨床上有効な神経保護薬 (= 抗痴呆薬) の開発につながるとの考えから多くの研究が行われている<sup>6)</sup>。

我々の研究室でも大脳皮質の初代培養神経細胞を用いてグルタミン酸神経毒性の発現機序の解明、ならびに、グルタミン酸神経毒性を抑制する内在性物質の探索研究を行っている。本稿では我々の研究成績を中心に、大脳皮質におけるグルタミン酸神経毒性の発現機序ならびにコレシストキニンの神経保護作用機序について解説する。

## 1. グルタミン酸神経毒性の発現機序

### 1-1 グルタミン酸誘発神経細胞死の経時変化

グルタミン酸は中枢神経系のほとんど全ての部位で神経毒性を発現するが、その発現様式は部位によって異なる。すなわちグルタミン酸毒性に対して非常に脆弱な部位と比較的

抵抗性を有する部位とに分けられ、脆弱な部位では短時間のグルタミン酸処置によりdelayed neuronal death（遅発性神経細胞死）が誘発される。遅発性神経細胞死とは桐野<sup>7)</sup>によって名づけられた神経細胞死の一形態であり、初代培養細胞では5から10分間のグルタミン酸処置により、処置直後では細胞は生存しているが、その後1から24時間グルタミン酸不含液中で細胞をインキュベートすることにより時間依存性に細胞死が誘発される現象をいう。一方、抵抗性を有する部位ではこのようなグルタミン酸の短時間処置では神経細胞死は起こらず、1時間以上の長時間連続処置を必要とする。グルタミン酸神経毒性に対して脆弱な代表的部位として大脳皮質、海馬、小脳などが挙げられる。著者らが行った初代培養大脳皮質ニューロンを用いた実験においても、10分間のグルタミン酸処置後、グルタミン酸不含液中で細胞をインキュベートすることによりグルタミン酸処置直後では細胞の生存率の低下は起こらずインキュベート時間に依存して生存率が低下した (Fig.1)。

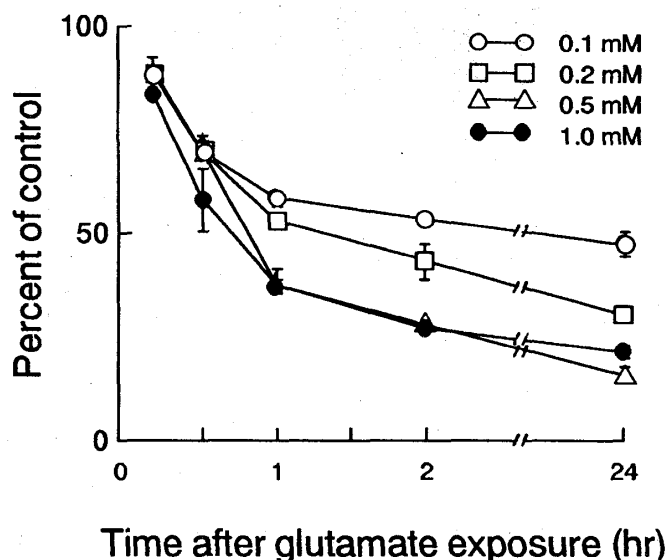


Fig.1 培養大脳皮質ニューロンにおけるグルタミン酸誘発神経毒性  
縦軸は無処置細胞の生存率に対するグルタミン酸不含液中でのインキュベート時間を示している。

#### 1-2 グルタミン酸神経毒性発現に関与する受容体サブタイプ

グルタミン酸受容体はイオンチャネル型受容体 (ionotropic receptor) と代謝型受容体 (metabotropic receptor) の2種類に大別される。イオンチャネル型受容体は薬理学的性質と生理機能の違いからNMDA (N-methyl-D-aspartate) 受容体とAMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate), カイニン酸受容体の3種類にさらに細分される<sup>8), 9)</sup>。そこでグルタミン酸とグルタミン酸受容体サブタイプの選択的な

アゴニストであるNMDA, AMPAおよびカイニン酸により誘発される神経毒性の特性について検討した。この実験ではNMDA受容体は膜電位依存性に $Mg^{2+}$ によるチャネル阻害を受けることから<sup>10)</sup>, NMDAをアゴニストとして用いる実験では細胞外液中の $Mg^{2+}$ を除去した。Fig. 2に示すようにグルタミン酸およびNMDAの短時間処置により細胞の生存率は著明に低下したが, APMA, カイニン酸の短時間処置では生存率は低下しなかった。

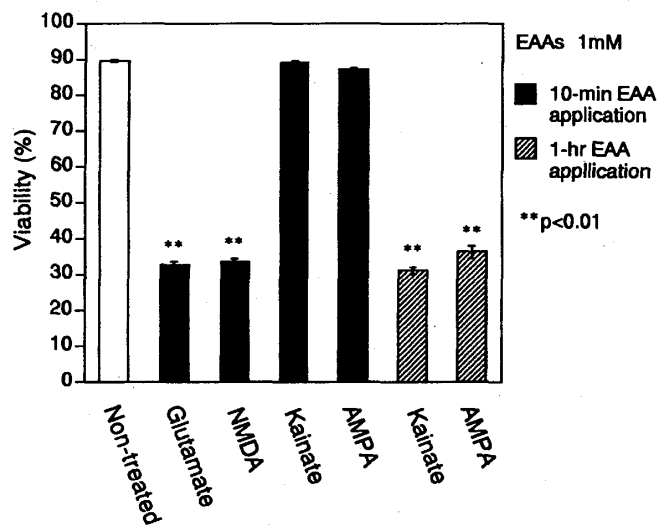


Fig.2 諸種興奮性アミノ酸により誘発される神経毒性

さらにFig. 3に示すようにグルタミン酸により惹起される神経毒性はNMDA受容体拮抗薬のMK-801により減弱された。

したがって大脳皮質ニューロンにおけるグルタミン酸神経毒性は主としてNMDA受容体を介して発現していると考えられる。

### 1-3 グルタミン酸神経毒性発現における細胞外 $Ca^{2+}$ の影響

前述したように大脳皮質ニューロンにおけるグルタミン酸神経毒性は主としてNMDA受容体を介して発現する。NMDA受容体が形成するイオンチャネルの特徴は、前述の $Mg^{2+}$ による電位依存性の抑制のほかに、 $Ca^{2+}$ に対する高い透過性を有することが挙げられる<sup>11), 12)</sup>。NMDA受容体性イオンチャネルは電位依存性 $Ca^{2+}$ チャネルとは異なり不活性化機構を持たないため、グルタミン酸を連続投与すると持続的な細胞内への $Ca^{2+}$ 流入が生じる。そこでグルタミン酸神経毒性発現過程における細胞外 $Ca^{2+}$ の影響について検討した。Fig. 4に示すようにグルタミン酸処置中およびその後の50分間のインキュベート中の全ての時点で細胞外の $Ca^{2+}$ を除去するとグルタミン酸神経毒性はほぼ完全に抑制

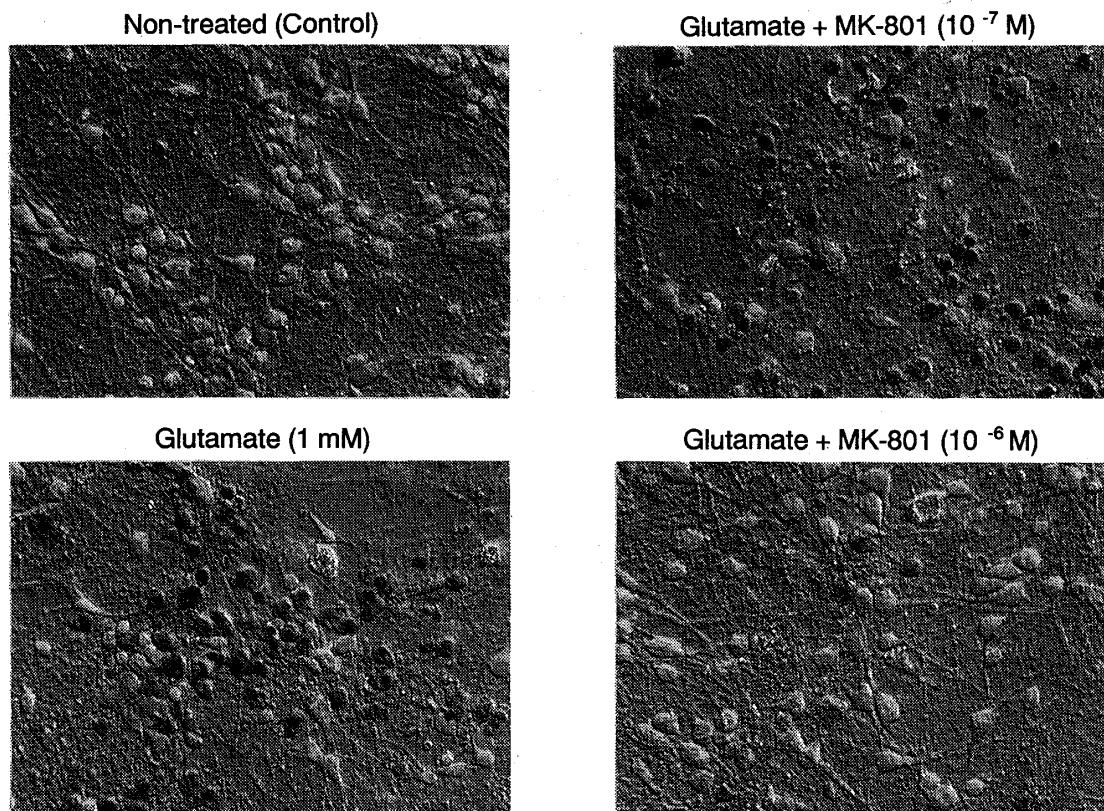


Fig.3 培養大脳皮質ニューロンにおけるグルタミン酸神経毒性に対するMK-801の作用  
MK-801はグルタミン酸処置中の10分間およびその後のインキュベート中の50分間の両方に添加した。バーは50  $\mu\text{m}$

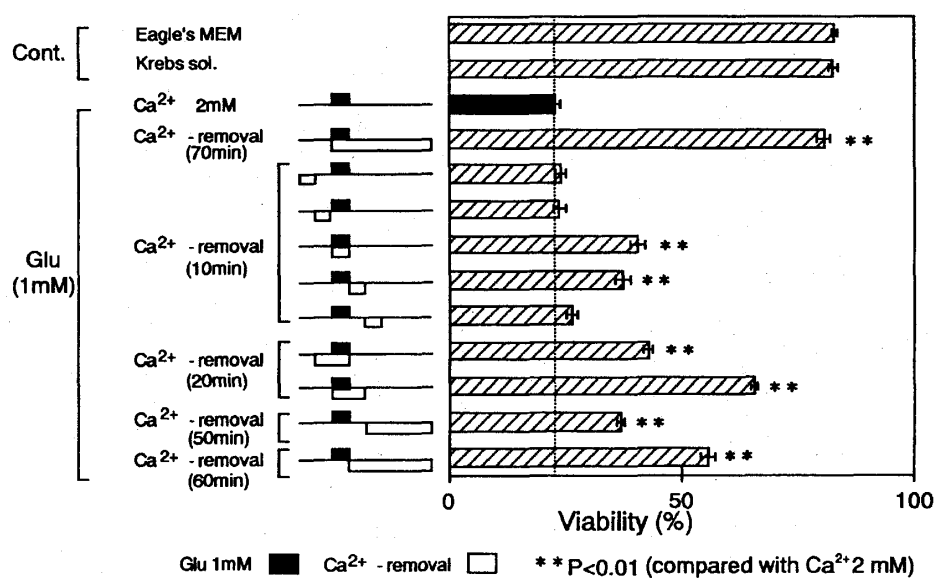


Fig.4 グルタミン酸神経毒性発現における細胞外Ca<sup>2+</sup>の影響

された。

また $\text{Ca}^{2+}$ 除去を10分間に限定した場合、グルタミン酸処置中の $\text{Ca}^{2+}$ 除去がグルタミン酸神経毒性を抑制するためには最も効果的であった。この結果よりグルタミン酸神経毒性の発現には細胞外 $\text{Ca}^{2+}$ が必須であること、またグルタミン酸処置中の $\text{Ca}^{2+}$ が毒性発現に最も重要な役割を果たしている異が明かとなった。

#### 1-4 NMDA受容体調節因子としてのポリアミンおよびグリシンのグルタミン酸神経毒性に対する作用

NMDA受容体にはアゴニスト結合部位以外にもポリアミン調節部位<sup>13)</sup> やストリキニーネ非感受性グリシン調節部位 (glycine<sub>B</sub>受容体)<sup>14)</sup> が存在し、有機化合物によって受容体の活性が調節されていることが報告されている。ポリアミンもグリシンも中枢神経系には高濃度存在することから、NMDA受容体を介するグルタミン酸神経毒性の発現に関与していることが考えられる。そこでグルタミン酸およびNMDAにより誘発される神経毒性に対するポリアミンおよびグリシンの作用について検討した。本実験ではポリアミンとしてスペルミジンを用いた。Fig. 5に示すように0.01 mMのグルタミン酸あるいはNMDA

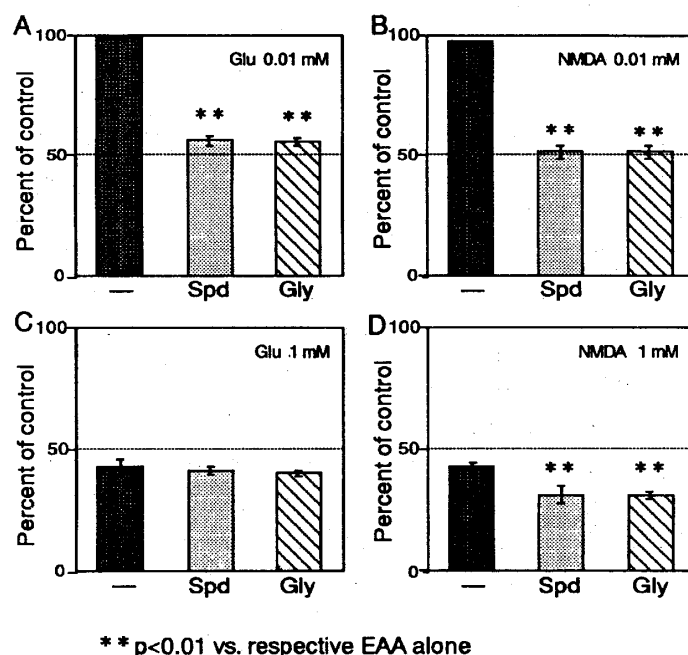


Fig.5 スペルミジン (Spd) およびグリシン (Gly) によるグルタミン酸、NMDA神経毒性の増強

SpdおよびGlyの濃度は0.1mMであり、両者ともにグルタミン酸あるいはNMDA含有液中に添加した。A：グルタミン酸0.01mM投与中にSpdおよびGlyを添加したときの生存率変化、B：NMDA0.01mM投与中にSpdおよびGlyを添加したときの生存率変化、C：グルタミン酸1mM投与中にSpdおよびGlyを添加したときの生存率変化、D：NMDA1mM投与中にSpdおよびGlyを添加したときの生存率変化を示している。

A処置中に0.1 mMのスペルミジンあるいはグリシンを添加することにより神経毒性は著明に増強された。

さらに1 mMのNMDA神経毒性もスペルミジン、グリシンにより有意に増強された。この結果は、大脳皮質のNMDA受容体がスペルミジンとグリシンによって促進的に調節を受けていることを示唆する。スペルミジンはNMDAにより誘発される膜電流を増加させること<sup>15)</sup>、NMDA受容体に対するMK-801結合を増加させること<sup>16)</sup>、さらにNMDA受容体の脱感作を抑制すること<sup>17)</sup>とが報告されている。一方、グリシンもglycine<sub>B</sub>受容体に作用してNMDA受容体の脱感作を抑制することが報告されており<sup>18)</sup>、本実験で観察されたポリアミン、グリシンのグルタミン酸、NMDA神経毒性の増強作用も上記のような機序に基づくと考えられる。

#### 1-5 グルタミン酸神経毒性発現における一酸化窒素 (NO) の役割

最近、NMDA受容体を介するグルタミン酸神経毒性発現に一酸化窒素 (NO) の関与する可能性が示唆されている<sup>19), 20), 21)</sup>。NOは最初、内皮由来弛緩因子 (endothelium-derived relaxing factor: EDRF) としてその存在が予測され、その後Palmerら<sup>22), 23)</sup>によってNOとEDRFが同一であることが確認された。現在ではNOはガス性の生体内活性物質という新しい概念の神経伝達物質として研究されている。生体内でNOが産生される経路は幾つかあるが、特に中枢神経系における機能と関連して最も重要なものはNO合成酵素 (NO synthase: NOS) を介するNOの産生経路である。NOSはアルギニンを基質としてNOとシトルリンを産生する。NOはTable 1に示すように非誘導型と誘導型の大きく2種類のアイソザイムに分類される<sup>24)</sup>。

Table 1 2種類のNO合成酵素の共通点と相違点

	非誘導型 NOS	誘導型 NOS
分 布	神経細胞、内皮細胞 血小板など	マクロファージ、肝細胞 多核白血球など
特 性	<ul style="list-style-type: none"> <li>・細胞質に存在</li> <li>・NADPH依存性</li> <li>・L-アルギニン誘導体により抑制</li> <li>・Ca<sup>2+</sup>/calmidulin依存性</li> <li>・ピコモルレベルのNOを遊離</li> <li>・短時間の遊離</li> <li>・サイトカインにより影響を受けない</li> <li>・グルココルチコイドにより影響を受けない</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・細胞質に存在</li> <li>・L-アルギニン誘導体により抑制</li> <li>・Ca<sup>2+</sup>/calmidulin非依存性</li> <li>・ナノモルレベルのNOを遊離</li> <li>・長時間の遊離</li> <li>・サイトカインにより誘導される</li> <li>・グルココルチコイドにより誘導が阻害される</li> </ul>

神経細胞には非誘導型のNOSが分布する。著者らの用いた培養大脳皮質ニューロンにもNOS含有細胞が存在するか否か調べたところFig. 6に示すようにNOS含有細胞が存在し、その割合は2.6%であった。

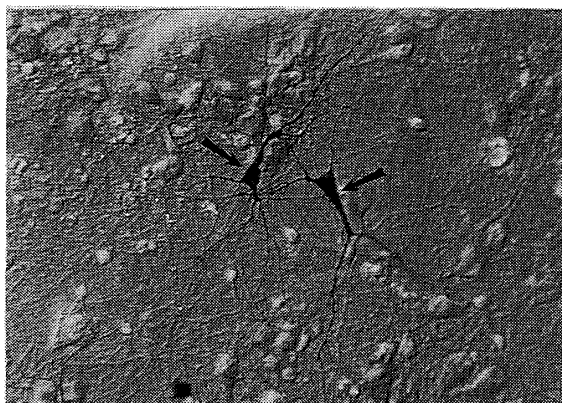


Fig.6 培養大脳皮質ニューロン中における一酸化窒素合成酵素（NOS）含有細胞

神経細胞に存在するNOSは $\text{Ca}^{2+}$ 、カルモジュリン 要求性である。すなわち、細胞内に $\text{Ca}^{2+}$ が流入するとNOSが活性化されNO産生される。これまで述べてきたように、グルタミン酸神経毒性はNMDA受容体を介して流入する $\text{Ca}^{2+}$ によって引き起こされる。神経細胞内に流入した $\text{Ca}^{2+}$ はNOSを活性化しNOが産生されと考えられる。そこでグルタミン酸神経毒性発現にNOが関与するか否を検討した。Fig. 7に示すようにグルタミン酸およびNMDA神経毒性はNOS阻害剤であるN<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine（N-Arg）やNOをトラップするヘモグロビン（Hb）によって有意に抑制された。

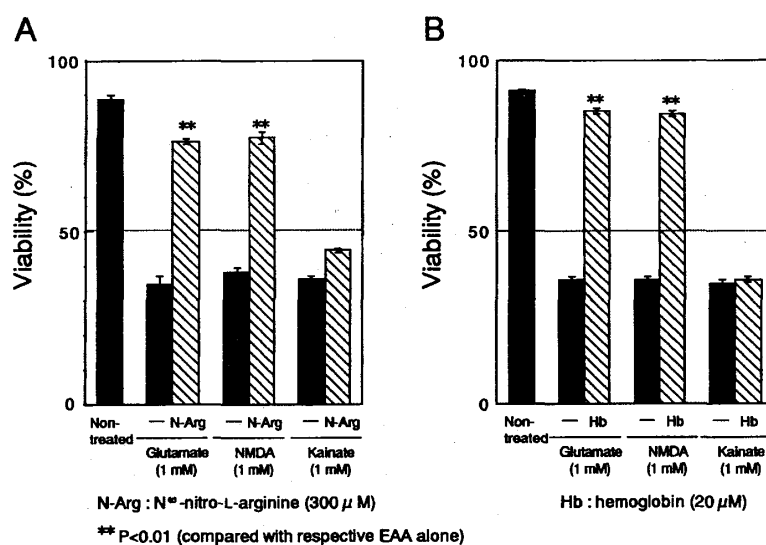


Fig.7 諸種興奮性アミノ酸（EAA）神経毒性に対するN<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine（A）およびヘモグロビン（B）の作用



一方、非NMDA受容体を介して発現するカイニン酸神経毒性はN-ArgやHbでは抑制されなかった。さらに水溶液中でNOを生成する試薬により神経毒性が発現するか否かを検討した。Fig. 8に示すようにNO生成試薬であるニトロプルシドナトリウム (sodium nitroprusside: SNP) あるいはS-nitrosocysteine (SNOC) の処置によっても処置直後では毒性が発現せず、遅発性に毒性が発現するグルタミン酸と同様の神経毒性が観察された。

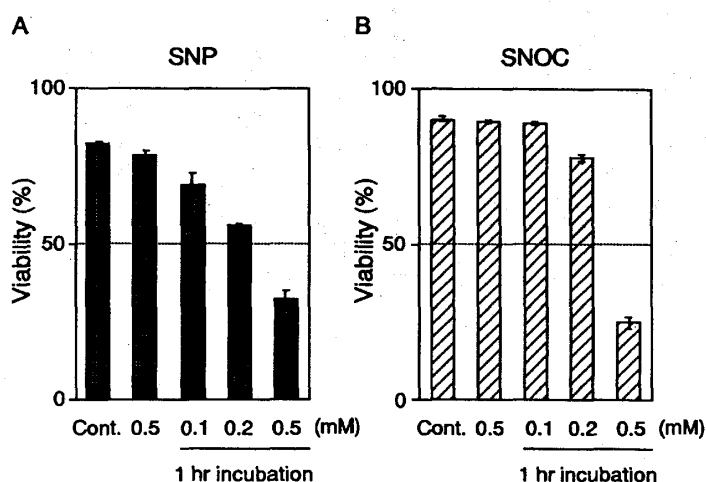


Fig. 8 NO生成試薬により誘発される神経毒性の用量作用関係  
縦軸は細胞生存率、横軸のCont.は無処置細胞、0.5は0.5mM 10分間の処置のみの細胞、1 hr incubationはそれぞれの濃度のNO生成試薬を10分間処置した後、NO生成試薬不含液中で1時間インキュベートした細胞を示す。

これらの結果は、グルタミン酸神経毒性発現にはNMDA受容体を介して流入した $\text{Ca}^{2+}$ が引き金となって産生されるNOが重要な役割を果たしていることを示唆する。また、細胞膜を透過しないHbが保護的に作用することから、産生されたNOは細胞膜を透過して隣接した周囲の細胞に対して毒性を発現すると考えられる。

さらに最近、LiptonらがNOの化学的な状態によって神経毒性と神経保護という反対の作用を発現するという仮説を提唱している<sup>25)</sup>。NOは周囲の環境によりラジカル状態( $\text{NO}^\cdot$ )とイオン化状態( $\text{NO}^+$ )の両方を取り得る。 $\text{NO}^\cdot$ は細胞内の活性酸素( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )と反応してペルオキシ亜硝酸( $\text{ONOO}^-$ )を生成する。 $\text{ONOO}^-$ はさらにヒドロキシル・ラジカル( $\text{OH}^\cdot$ )を生成する。ヒドロキシル・ラジカルは非常に反応性に富んでおり細胞膜、ミトコンドリアの電子伝達系あるいはDNAに損傷を与え神経細胞死を誘発する。一方、 $\text{NO}^+$ はNMDA受容体の調節部位の一つである酸化還元部位(redox site)に作用してNMDA受容体機能を抑制し神経保護的に働く。著者らもグルタミン酸あるいはSNOC神

経毒性が細胞内の活性酸素を除去するスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) によって減弱され、 $\text{NO}^+$ を還元して $\text{NO}^\cdot$ を生成するアスコルビン酸により増強されることを確認している (Fig. 9)。

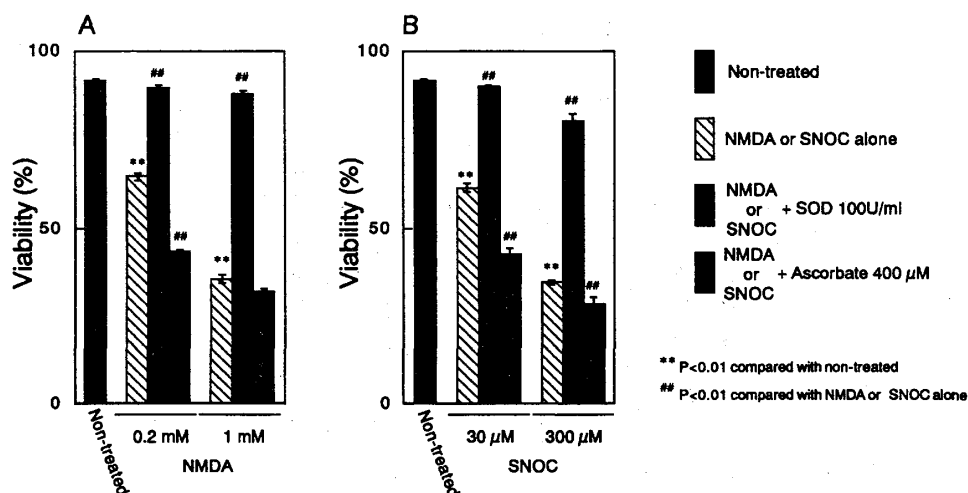


Fig.9 NMDA (A)、SNOC (B) 神経毒性に対するスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) およびアスコルビン酸の作用

これらの知見は $\text{NO}^\cdot$ がグルタミン酸神経毒性発現に重要な役割を果たすことを強く示唆する。

以上の知見を基に培養大脳皮質ニューロンにおけるグルタミン酸神経毒性の発現機序を Fig.10にまとめた。

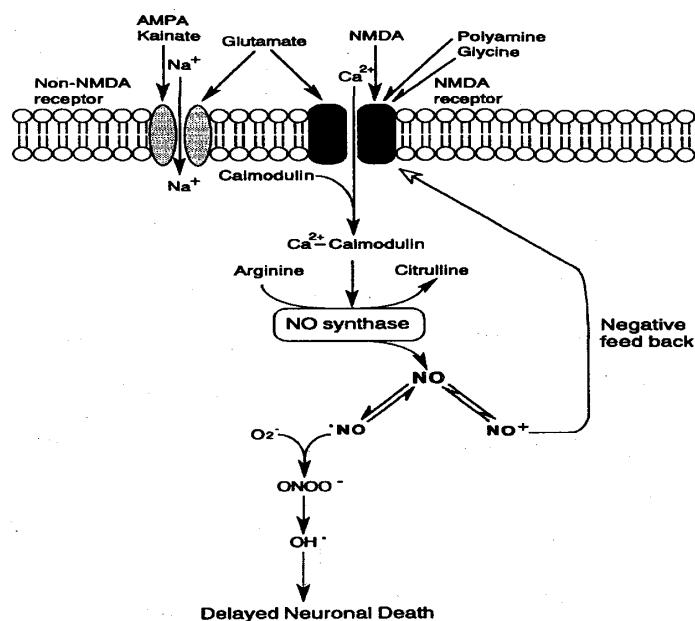


Fig.10 培養大脳皮質ニューロンにおけるグルタミン酸神経毒性の発現機序

グルタミン酸により活性化されたNMDA受容体を介して $\text{Ca}^{2+}$ が過剰に細胞内に流入する。この $\text{Ca}^{2+}$ はカルモジュリンと結合しNOSを活性化する。NOSにより産生されたNOと活性酸素との反応から種々のラジカルが生成され神経細胞死が発現する。大脳皮質におけるグルタミン酸神経毒性が $\text{Ca}^{2+}$ -NO系路のみによって発現しているか否かについては未だ不明な点もあるが、少なくとも上記の経路が中心的に働いていることは確実であると考えられる。

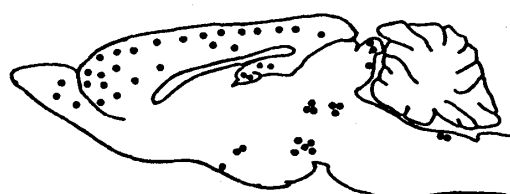
## 2. コレシストキニンの神経保護作用機序

一般に生体の機能は拮抗する2つの力によって調節を受けていることが多い。代表的な例としては自律神経系の働きが挙げられる。自律神経系の交感神経系と副交感神経系は同一の臓器に対して拮抗する働きで機能を調節している。この他にも痛覚発現におけるブラジキニン（発痛物質）とエンケファリン、エンドルフィン（内因性モルヒネ様物質）、ホルモン系では血糖調節におけるインシュリンとグルカゴンなど数え上げればきりが無い。中枢神経系においてもグルタミン酸が興奮性神経伝達物質として働くのに対して抑制性神経伝達物質としてGABAが存在する。さらにグルタミン酸の神経伝達は他の神経伝達物質により調節を受けている。このような生体のメカニズムを考えれば、グルタミン酸が神経毒として働くならば、神経保護的に働く物質が必ず中枢神経系に存在するはずである。このような発想を基に、著者らは神経保護作用を有する物質を検索し、神経ペプチドの一種であるコレシストキニン（cholecystokinin: CCK）が強力な神経保護作用を有することを見出した。以下ではCCKの神経保護作用機序について解説する。

### 2-1 グルタミン酸神経毒性に対するコレシストキニンの保護作用

CCKは中枢神経系に広く分布する神経ペプチドの一種である（Fig.11）。ラットあるいはモルモットを用いた免疫組織学的研究により、終脳の中でも大脳皮質を含むいくつかの領域においてCCKが高濃度に存在することが報告されている<sup>26), 27), 28), 29)</sup>。中枢神経系におけるCCKにはCCK-4, -8, -13, -33, -39の5つの亜型があるが<sup>30)</sup>、終脳に存在するCCKは8個のアミノ酸から構成されN末端から2番目のチロシンが硫酸化されたsulfated CCK octapeptide (CCK-8S)が主要成分であることが報告されている<sup>31), 32)</sup>。中枢神経系におけるCCK-8Sは主として非錐体細胞に局在している<sup>33), 34)</sup>。中枢神経系のCCK-8Sの作用については、大脳皮質において脱分極濃度の $\text{K}^+$ やグルタミン酸がCCKの遊離を引き起こすこと<sup>35)</sup>、GABAによりCCKの遊離が抑制されること<sup>36)</sup>、さらにイオントホレーシス法によるCCK-8Sの投与が主として興奮性の反応を引き起こすことから<sup>37), 38), 39), 40)</sup>、興奮性の神経伝達物質あるいは神経修飾因子として働いていると考えられている。Fig.12に示すようにCCK関連ペプチドであるCCK-8S、セルレチド

### Agonists of CCKA and CCKB receptors



●はCCK含有細胞

**Figure 1 Data Summary:**

Drug	Concentration	Protection (%)
CCK-8S	10 <sup>-9</sup> M	~25
	10 <sup>-8</sup> M	~75
	10 <sup>-7</sup> M	~85
CLT	10 <sup>-9</sup> M	~15
	10 <sup>-8</sup> M	~75
	10 <sup>-7</sup> M	~95
CCK-8NS	10 <sup>-9</sup> M	~20
	10 <sup>-8</sup> M	~75
	10 <sup>-7</sup> M	~85

**Inset Graph Data:**

Time (min)	Glutamate (1 mM)	Drug
0	Starts	Starts
10	Ends	Ends
60	-	Ends

**Protection (%) Formula:**

$$\text{Protection (\%)} = \frac{[\text{Drug}] - [\text{Glu}]}{[\text{Cont.}] - [\text{Glu}]} \times 100$$

コレシストキニン関連ペプチドはグルタミン酸処置中およびその後のインキュベート中の全ての時点で投与した。保護率算出中の[Cont.]、[Glu]および[Drug]はコントロール（無処置）細胞の生存率、グルタミン酸処置細胞の生存率、および薬物（コレシストキニン関連ペプチド）投与細胞の生存率を示す。

—27—

CCK受容体はCCK<sub>A</sub>およびCCK<sub>B</sub>の2種類のサブタイプに分類される<sup>41)</sup>。以前はCCK<sub>A</sub>受容体は末梢型、CCK<sub>B</sub>受容体が中枢型と考えられてきたが、現在では両方のサブタイプが中枢神経系に存在することが報告されている<sup>42)</sup>。前述したように、3種類のCCK関連ペプチドはグルタミン酸神経毒性に対して同程度の保護作用を発現した。この3種類のCCK関連ペプチドのうちCCK-8SとセルレチドはCCK<sub>A</sub>受容体、CCK<sub>B</sub>受容体の両方に作用し、CCK-8NSはCCK<sub>B</sub>受容体に選択的に作用することからCCK関連ペプチドの保護作用はCCK<sub>B</sub>受容体を介して発現することが示唆された。そこでCCK-8Sの保護作用発現に関与するCCK受容体サブタイプの検討を行った。Fig.13に示すようにCCK-8Sの保護作用はCCK<sub>A</sub>受容体の拮抗薬であるL-365260では拮抗されず、CCK<sub>B</sub>受容体拮抗薬であるL-364718により有意に減弱された。

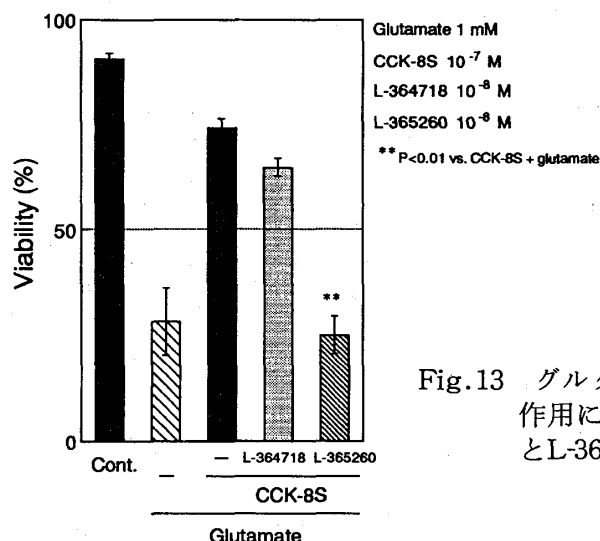


Fig.13 グルタミン酸神経毒性に対するCCK-8Sの保護作用におけるL-364718 (CCK<sub>A</sub>受容体拮抗薬)とL-365260 (CCK<sub>B</sub>受容体拮抗薬)の作用

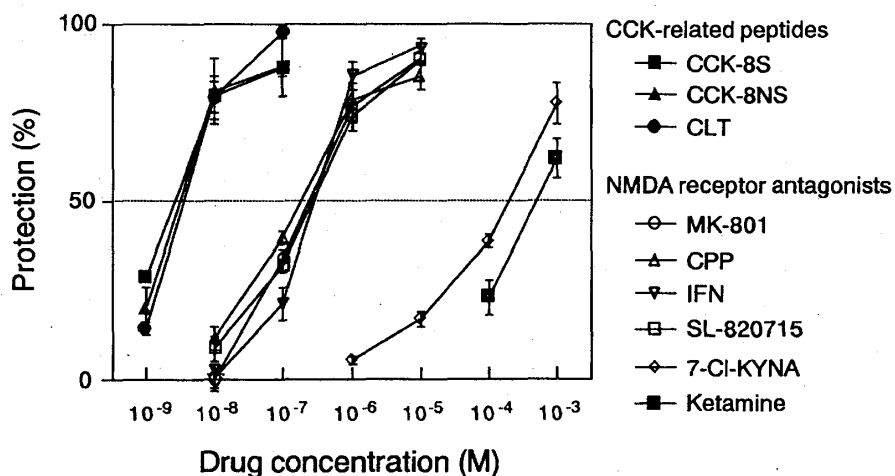


Fig.14 グルタミン酸神経毒性に対するCCK関連ペプチドおよび諸種NMDA受容体拮抗薬の保護作用の用量作用関係

この結果よりCCK-8SはCCK<sub>B</sub>受容体を介してグルタミン酸神経毒性を抑制することが明らかとなった。

グルタミン酸神経毒性に対するCCK関連ペプチドとNMDA受容体拮抗薬の保護作用の用量作用関係をFig.14にまとめた。

CCK関連ペプチドは $10^{-7}$ Mで最大の保護作用を発現した。一方、NMDA受容体の非競合的拮抗薬であるMK-801、競合的拮抗薬であるCPP、NMDA受容体ポリアミン調節部位の拮抗薬であるイフェンプロジル (IFN) やSL-820.715は $10^{-5}$ Mで最大保護作用を発現した。このようにCCK関連ペプチドの保護作用はNMDA受容体拮抗薬の1/100の濃度で発現する強力なものだった。

## 2-2 NMDA受容体刺激により誘発されるCa<sup>2+</sup>流入に対するCCK-8Sの影響

すでに述べたようにグルタミン酸神経毒性はNMDA受容体を介して流入するCa<sup>2+</sup>によって引き起こされる。これまでにCCK関連ペプチドがNMDA受容体に直接作用することを示す知見は報告されていない。しかし、CCK-8Sが細胞内情法伝達系を介して間接的にNMDA受容体を抑制する可能性は否定できない。そこで、CCK-8SがNMDA受容体刺激により誘発されるCa<sup>2+</sup>流入を抑制するか否かを検討する目的でCa<sup>2+</sup>蛍光指示薬を用いて細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の測定を試みた。Ca<sup>2+</sup>蛍光指示薬を用いて細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度を測定する場合、①感度がよい、②2波長測定で絶対濃度がある程度測定できる、などの点から一般にfura-2 AMがよく用いられる。しかし、神経細胞死が起こる場合の細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の変化は非常に大きいと予想される。そこで本研究では1波長測定で絶対濃度は測定できないが、fura-2 AMよりもKd値が大きく高濃度のCa<sup>2+</sup>が測定可能なrhod-2 AMを蛍光指示薬として用いた<sup>43)</sup>。Fig.15に示すようにrhod-2 AMを負荷した細胞にNMDAを投与することにより、投与直後の急激な蛍光強度の加およびこれに続く持続的な蛍光強度の増加が観察された (Fig.15-A-a)。CCK-8SおよびMK-801はNMDA投与2分前に投与し、これらの薬物存在下にNMDAを投与した。Rhod-2 AM蛍光強度の増加に反映されるCa<sup>2+</sup>流入はCCK-8Sによっては影響を受けなかった (Fig.15-A,-b)。一方、NMDA受容体の拮抗薬であるMK-801はNMDAによる蛍光強度の増加を抑制した。Fig.15-Cにまとめた結果を示した。NMDA投与によるCa<sup>2+</sup>流入量は最大流入量の46.5%であった。このNMDA誘発Ca<sup>2+</sup>流入量はCCK-8S存在下では42.5%、セルレチド存在下では45.1%と影響を受けなかった。一方、MK-801はNMDA誘発Ca<sup>2+</sup>流入量を12.9%にまで有意に減少した。

この実験結果よりCCK-8SはNMDA受容体の拮抗薬としての作用を有していないことを示すとともに、CCK受容体刺激により活性化される細胞内情法伝達系がNMDA受容体に対して連関していないことを示唆する。

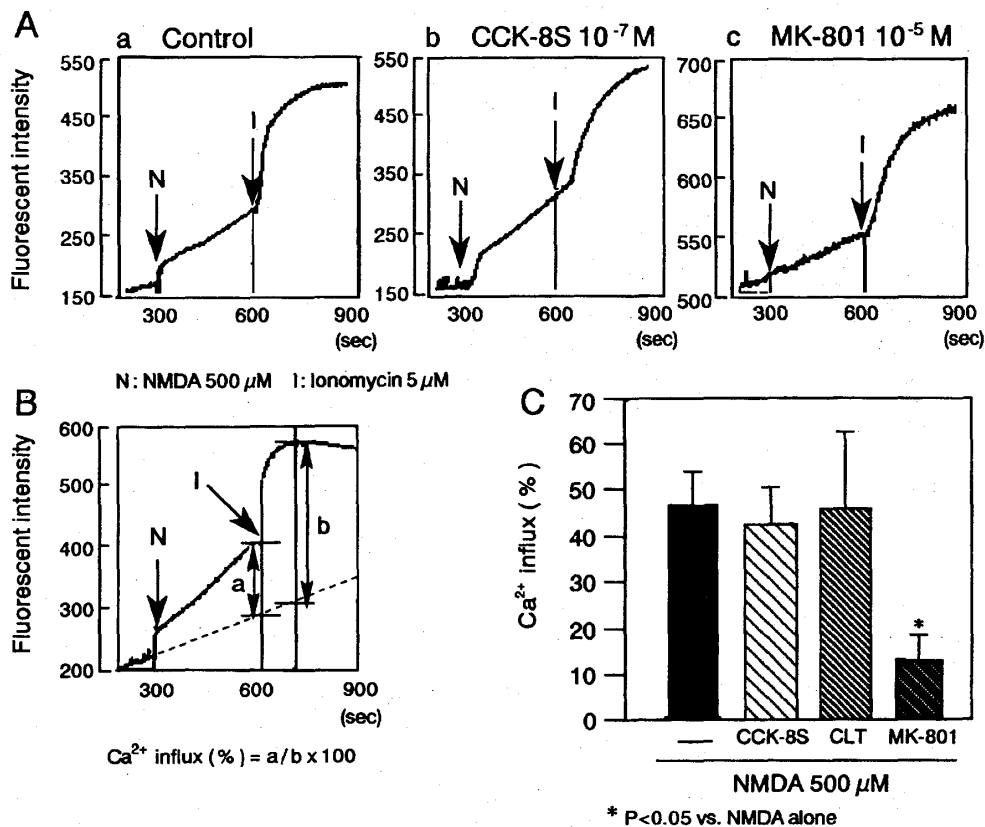


Fig.15 NMDA誘発 $\text{Ca}^{2+}$ 流入に対するCCK関連ペプチドの作用

A:  $500 \mu\text{M}$ のNMDAにより誘発される細胞内への $\text{Ca}^{2+}$ 流入の具体例(a)、 $10^{-7}\text{M}$ のCCK-8S存在下(b)、 $10^{-5}\text{M}$ のMK-801存在下。B: NMDA誘発 $\text{Ca}^{2+}$ 流入量の算出方法。C: NMDA誘発 $\text{Ca}^{2+}$ 流入に対するCCK-8S、CLTおよびMK-801の効果

### 2-3 ニトロプルシドナトリウム神経毒性に対するCCK-8Sの作用

前述したようにCCK-8Sはグルタミン酸により誘発される細胞内への $\text{Ca}^{2+}$ 流入を抑制しなかった。したがって、CCK-8S存在下においてもグルタミン酸投与により細胞内へ $\text{Ca}^{2+}$ が流入しNOが生成される可能性が考えられる。そこでNO生成試薬であるニトロプルシドナトリウムにより誘発される神経毒性に対するCCK-8Sの作用を検討した。Fig.16に示すように、ニトロプルシドナトリウム毒性はNOをトラップするヘモグロビンNOによってのみ抑制されCCK-8Sやセルレチドでは抑制されなかった。

この結果よりCCK-8SはNO自体に対する抑制作用やNOにより生成されるラジカル類を除去する細胞内反応系を促進する作用ではなく、NO生成以前のステップに対する作用であることが推測された。

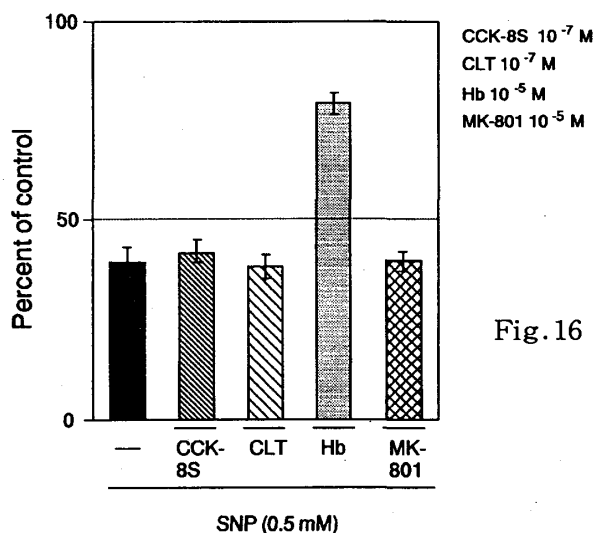


Fig.16 ニトロプルシドナトリウム(SNP)神経毒性に対するCCK関連ペプチドの作用

#### 2-4 グルタミン酸により誘発されるNO生成反応に対するCCK-8Sの作用

CCK-8Sがグルタミン酸誘発の $\text{Ca}^{2+}$ 流入およびNO神経毒性を抑制しないことから、CCK-8Sの神経保護作用はNOの生成過程に対するものであることが考えられた。したがってNO生成に対するCCK-8Sの作用を検討する必要がでてきた。NOは非常に短寿命生理活性物質であり、NOそのものの測定は非常に困難である。現在のところNOを測定する方法としてはTable 2に示したように、(1) オゾン化学発光法、(2) オキシヘモグロビン法、(3) グリース反応法、(4) 電極法、(5) ESR法、(6) radio isotope 法、(7) ルミノール化学発光法がある<sup>44)</sup>。

Table.2 一酸化窒素 (NO) 測定方法

測定方法	測定原理	特徴、問題点
オゾン化学発光法	$\text{NO} + \text{O}_3 \rightarrow \text{NO}_2 + {}^1\text{O}_2$ $\text{NO}_2$ と ${}^1\text{O}_2$ の可視光および近赤外での化学発光を測定	・高感度 ・NOを気相に追い出さなければならない
オキシヘモグロビン法	$\text{O}_2\text{Fe}^{2+}\text{Hb} + \text{NO} \rightarrow \text{Fe}^{3+}\text{Hb} + \text{NO}^-$ ポルフィリンのソーレー帯の吸収変化を測定	・特異性に問題 ・検出感度が低い
グリース反応法	スルファニル酸とナフチルエチレンジアミンが $\text{NO}^-$ 存在下生成するジアゾ化合物を吸光度により定量	・検出感度が低い
電極法	(1) Clark type (2) Ni(II) Porphyrine type	・電極作成が困難
ESR法	スピントラップ剤をNOと反応させ、生成する化合物の特異的ESRシグナルを測定 (1) オキシヘモグロビン法 (2) Ingoldらの方法 (3) PTIO法	・オキシヘモグロビンの生成が困難 ・検出感度が低い
Radio isotope法	$[\text{H}]\text{Arginine} \rightarrow \text{NO} + [\text{H}]\text{Citulline}$ アルギニンのシトルリンへの変換をRIで測定	・簡便、大量の資料の測定が可能 ・リアルタイムでの測定が出来ない
ルミノール化学発光法	$\text{Luminol}/\text{H}_2\text{O}_2 + \text{NO} \rightarrow \text{Chemiluminescence}$ ルミノールに過酸化水素を添加した系にNOを反応させた時に観察される化学発光を測定	・現在最も高感度 ・特異性に問題



しかし、いずれの方法も応用範囲に制約があり、特定の条件下でもの測定に成功している場合が多い。そこで著者はNOそのものの測定ではないが、NO様物質を高感度で検出できる血管弛緩反応を利用した生物学的検定法によりNO生成反応に対するCCK-8Sの作用を検討した。

大脳皮質から遊離されるNO様物質はGarthwaiteら<sup>45)</sup>の方法に修正を加えることによりFig.17に示すような装置を用いて実験を行った。

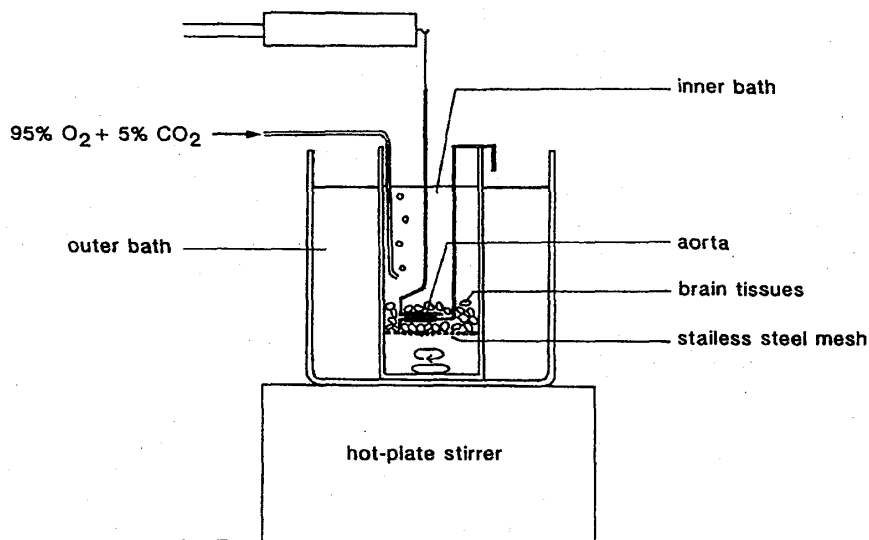


Fig.17 摘出大動脈標本を用いたNO様物質の生物学的検定法の実験装置模式図

Fig.18に摘出大動脈標本に対するフェニレフリン、アセチルコリン、ニトロプルシドナトリウム、およびCCK-8Sの作用を示す。フェニレフリンは $10^{-8}$ Mから $10^{-4}$ Mで用量依存的に収縮を引き起こした。この収縮はアセチルコリンで影響を受けなかったことから血管内皮細胞が除去されていることが確認された。さらにNO生成試薬のニトロプルシドナトリウムで速やかな弛緩が観察されたことからNOに対する感受性を有していることが確認された (Fig.18-A)。CCK-8Sは血管の静止張力およびフェニレフリン収縮に対して影響を及ぼさなかった。(fig.18-B) また、CCK-8S存在下においてもニトロプルシドナトリウム投与によりCCK-8S存在下と同様の速やかな弛緩が観察された (Fig.18-C)。グルタミン酸投与により誘発されるNO生成反応に対するCCK-8Sの作用をFig.19に示した。大脳皮質組織非存在下においてグルタミン酸はフェニレフリン収縮に影響を及ぼさなかった。一方、ニトロプルシドナトリウムは速やかな弛緩作用を発現した。さらにCCK-8Sはニトロプルシドナトリウムの血管弛緩反応に影響を与えなかった (Fig.19-A)。これに対して大脳皮質存在下にグルタミン酸を投与するとフェニレフリン誘発血管収縮に対して弛緩作用が発現し、血管は静止張力のレベルにまで弛緩した。この状態でCCK-8Sを投

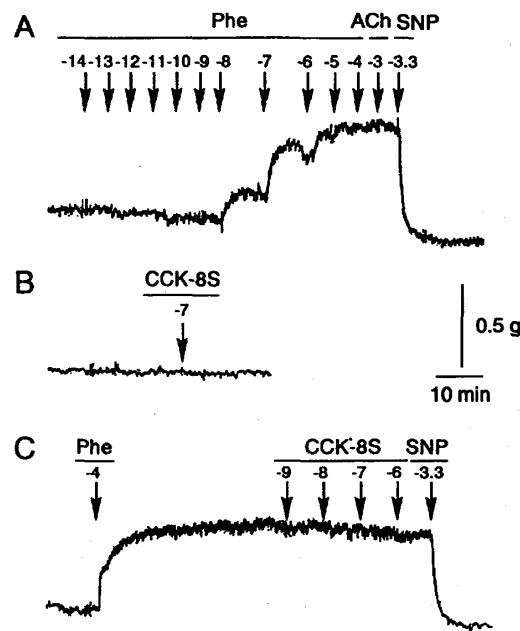


Fig.18 摘出大動脈血管のフェニレフリン収縮に対するCCK-8Sの作用  
 A：フェニレフリンにより誘発される血管収縮の用量反応性。  
 B：静止張力に対するCCK-8Sの作用。C：フェニレフリン収縮に対するCCK-8Sの作用。グラフ中、矢印の上の数値は薬物のモル濃度を対数で示したものである。

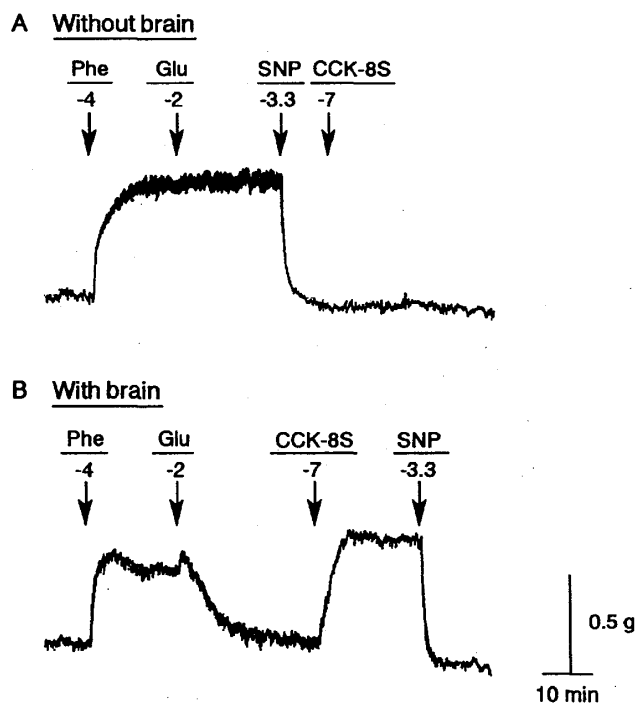


Fig.19 大脳皮質組織存在下におけるグルタミン酸誘発血管弛緩反応に対するCCK-8Sの作用  
 グラフ中、矢印の上の数値は薬物のモル濃度を対数で示したものである。

与するとグルタミン酸による弛緩反応はほぼ完全に抑制され、フェニレフリンによる最大収縮反応にまで張力は回復した。さらにCCK-8S投与後にニトロプルシドナトリウムを投与すると血管は再び急速に弛緩した (Fig. 19-B)。

以上の結果は、CCK-8Sが脳皮質において、グルタミン酸によって促進されるNO生成反応を抑制することを示すものである。

本研究によって明かとなった脳皮質のグルタミン酸神経毒性に対するCCK-8Sの保護作用機序をFig. 20 にまとめた。

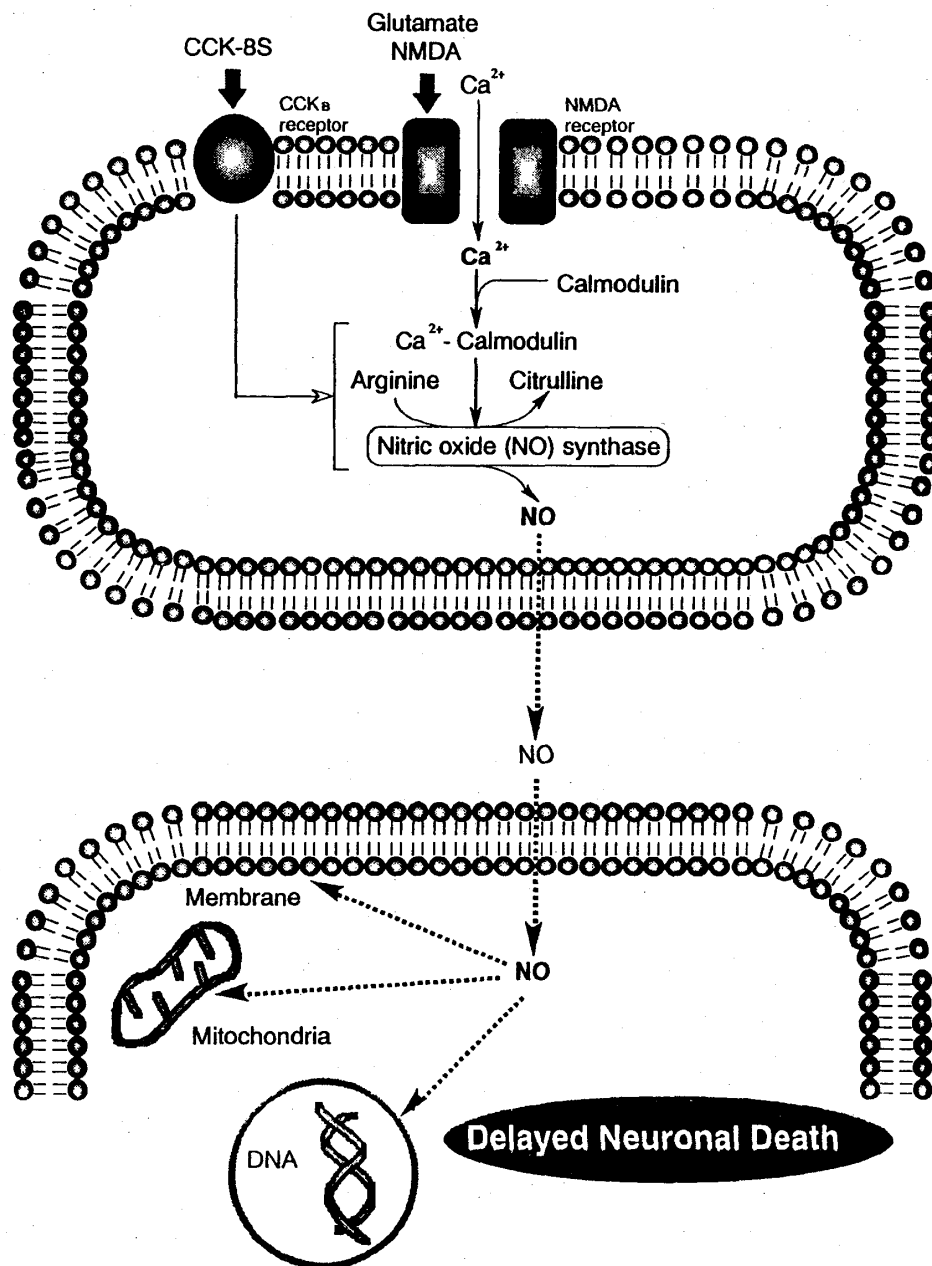


Fig. 20 脳皮質ニューロンのグルタミン酸神経毒性に対するCCK-8Sの神経保護作用機序

グルタミン酸によるNMDA受容体刺激は細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の増大をもたらす。これにより神経細胞内のNOSが活性化されNOが生成される。NOは細胞膜を透過し周囲の細胞に対して毒性を発現する。CCK-8SはCCK<sub>B</sub>受容体を介してNOの生成を抑制することにより保護作用を発現すると考えられる。

#### 【おわりに】

本論は初代培養大脳皮質ニューロンを用いて、短時間のグルタミン酸処置により惹起される遅発性神経細胞死の発現機序，ならびにこれを抑制するコレシストキニンの保護作用機序を解明を試みたものである。その結果大脳皮質にけるグルタミン酸神経毒性はNOによって引き起こされていること，およびコレシストキニンはNOの生成を抑制することによって大脳皮質ニューロンをグルタミン酸神経毒性から保護していることが明らかにされた。我々は培養大脳皮質ニューロンにおいてコレシストキニンの他にもニコチン性アセチルコリン<sup>46)</sup>，神経成長因子<sup>47)</sup>，脳由来神経栄養因子<sup>48)</sup>，プロスタグランジンE<sub>2</sub><sup>49)</sup>などがグルタミン酸神経毒性を制御することを見出している。さらに，線条体ニューロンに対してはドーパミンがカイニン酸受容体を介するグルタミン酸神経毒性に対して保護的に働くことを見出している<sup>50)</sup>。これらの結果は，興奮性アミノ酸による神経変性を主因とする中枢神経系の変性疾患に対する治療あるいは予防薬の開発に重要な知見を与えるとともに，中枢神経系の各部位に特有の神経保護物質が存在し，グルタミン酸神経毒性に対する保護機構を形成していることを示すものである。

#### 参考文献

- 1) Gasic, G. P. and Hollman, M., *Annu. Rev. Physiol.* 54, 507-536 (1992)
- 2) Choi, D. W., *Trends Neurosci.* 11, 465-469 (1988)
- 3) Medlum, B. and Garthwaite, J., *Trends Pharmacol. Sci.* 11 379-387 (1990)
- 4) Bresnick, G. H., *Arch. Ophthalmol.* 107, 339-341 (1989)
- 5) Choi, D. W., Maulucci-Gedde, M. and Kriegstein, A., *J. Neurosci.* 7, 357-368 (1987)
- 6) Levy, D. I. and Lipton, S. A., *Neurology* 40, 852-855 (1990)
- 7) Kirino, T., *Brain Res.* 239, 57-69 (1982)
- 8) Collingridge, G. L. and Lester, R. A. J., *Pharmacol. Rev.* 40, 143-210 (1989)
- 9) Young, A. B. and Fagg, G. E., *Trends Pharmacol. Sci.* 11, 126-133 (1990)
- 10) Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A. and Prochiantz A., *Nature* 307, 462-465 (1984)

- 11) Watkins, J. C., Krogsgaard-Larsen, P. and Honore, T., Trends Pharmacol. Sci. 11, 25-33 (1990)
- 12) Lei, S. Z., Zhang, D. Abele, A. E. and Lipton, S. A., Brain Res. 598, 196-202 (1992)
- 13) Ransom, R. W. and Stec, N., J. Neurochem. 51, 830-836 (1988)
- 14) Johnson, J. W. and Ascher, P., Nature 325, 529-531 (1987)
- 15) Sprosen, T. S. and Woodruff, G. N., Eur. J. Pharmacol. 179, 477-478 (1990)
- 16) Steele, J. E., Bowen, D. M., Francis, P. T., Green, A. R. and Cross, A. J., Eur. J. Pharmacol. 189, 195-200 (1990)
- 17) Lerma, J., Neuron 8, 343-352 (1992)
- 18) Lerma, J., Zukin, R. S. and Bennett, V. L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 2354-2358 (1990)
- 19) Dawson, V. L., Dawson, T. M., London, E.D., Bredt, D.S. and Snyder, S. H., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 6368-6371 (1991)
- 20) Garthwaite, J., Trends. Neurosci. 14, 60-67 (1991)
- 21) Snyder, S. H., Science 257, 494-496 (1992)
- 22) Palmer, R. M. J., Ferrige, A. G. and Moncada, S., Nature 327, 524-526 (1987)
- 23) Palmer, R. M. J., Ashton, D. S. and Moncada, S., Nature 333, 664-666 (1988)
- 24) 小菅邦彦, 由井芳樹, 長澤浩志, 比企一晃, 佐瀬一洋, 服部隆一, 篠山重威:  
生体の科学, 44(1) 44-50 (1993)
- 25) Lipton, S. A., Choi, Y-B., Pan, Z-H., Lei, S. Z., Chen, H-S. V., Sucher, N. J., Loscalzo, J., Singel, D. J. and Stamler, J.S., Nature 364, 626-632 (1993)
- 26) Araki, T., Kato, H. and Kogure, K., Brain Res. 528, 114-122 (1990)
- 27) Ciofi, P. and Tramù, G., J. Comp. Neurol. 10, 108-116 (1990)
- 28) Hendry, S. H. C., Jones, E. G., DeFelipe, J., Schmechel, D., Brandon, C. and Emson, P. C., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6526-6530 (1984)
- 29) Innis, R. B., Correa, F. M. A., Uhl, G., Shneider, B. and Snyder, S. H., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 521-525 (1979)
- 30) Bradwein, J. and Montigny, C. D., Nature 312, 363-364 (1984)
- 31) Dockray, G. J., Brain Res. 188, 155-165 (1980)
- 32) Rehfeld, I. J., J. Biol. Chem. 253, 4022-4030 (1987)
- 33) Ibii, N., Ikeda, M., Takahara, Y., Eigyo, M., Akiyoshi, T. and Matsushita, A., Peptides 10, 779-783 (1989)

- 34) Innis, R. B. and Snyder, S. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 6917-6921 (1980)
- 35) Sierralta, J. and Gysling, K., *Neurosci. Lett.* 112, 313-317 (1990)
- 36) Yaksh, T. L., Furui, T., Kanawati, I. S. and Go, V. L. W., *Brain Res.* 406, 207-214 (1987)
- 37) Brooks, P. A. and Kelly, J. S., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 448, 361-374 (1985)
- 38) Buckett, K. J. and Saint, D. A. *Neurosci. Lett.* 107, 162-166 (1989)
- 39) Chiodo, L. A. and Bunney, B. S., *Science* 219, 1449-1451 (1983)
- 40) Chiodo, L. A., Freeman, S. A. and Bunney, B. S., *Brain Res.* 410, 205-211 (1987)
- 41) Chang, R. S. and Lotti, V. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 4923-4926 (1986)
- 42) Beinfeld, M. C., Meyer, D. K., Eskay, R. L., Jensen, R. T. and Brownstein, M. J., *Brain Res.* 212, 51-57 (1981)
- 43) Minta, A., Kao, J. P. Y. and Tsine, R. Y. *Biol. Chem.* 264, 8171-8178 (1989)
- 44) 長野哲雄：フェルマシア，30(8) 879-881 (1994)
- 45) Garthwaite, J., Charles, S. L. and Chess-Williams, R., *Nature* 336, 385-388 (1988)
- 46) Akaike, A., Tamura, Y., Yokota, T., Shimohama, S. and Limura, J., *Brain Res.* 644, 181-187 (1994)
- 47) Shimohama, S., Ogawa, N., Tamura, T., Akaike, A., Tsukahara, T., Iwata, H. and Kimura, J., *Brain Res.* 632, 296-302
- 48) Shimohama, S., Tamura, Y., Akaike, A., Tsukahara, T., Ohara, O., Watanabe, S. and Kimura, J., *Neurosci. Lett.* 164, 55-58 (1993)
- 49) Akaike, A., Kaneko, S., Tamura, Y., Nakata, N., Shiomi, H., Ushikubi, F. and Narumiya, S., *Brain Res.* 663, 237-243 (1994)
- 50) Amano, T., Ujihara, H., Matsubayashi, H., Sasa, M., Yokota, T., Tamura, Y. and Akaike, A., *Brain Res.* 655, 61-69 (1994)