

論文内容要旨

[目的] カテコールアミン (CA) の生合成および遊離の異常は、パーキンソン病、統合失調症 (精神分裂病) およびうつ病などの神経障害や、本態性高血圧などの循環器系疾患を引き起こす要因と考えられている。そこで、CA 遊離の分子機構を解明することは、CA 遊離異常が関連する神経疾患の治療薬および治療法の開発に極めて有用である。一方、マイトトキシシン (MTX)、パリトキシシン (PTX) およびグラヤノトキシシン (GTX) などの天然有毒物質は、それぞれ Ca^{2+} チャネルや Na^{+} チャネルに作用することが知られているが、これらの天然有毒物質の副腎髄質細胞および中枢神経細胞における CA 遊離作用の性質に関する報告はほとんど知られていない。また、V-1 は哺乳類脳の生後発達期に発現が一過性に増大し、出生後 28 日目までは成熟個体と同程度のレベルまで減少することが報告されているタンパク質で、この V-1 タンパク質を安定的に過剰発現させた PC12D 株細胞では、CA 生合成酵素 (チロシン水酸化酵素、ドーパ脱炭酸酵素、ドーパミン β 水酸化酵素) の mRNA 発現が協調的に促進され、その結果ドーパミン (DA) およびノルエピネフリン (NE) の産生が顕著に増大している。さらに、生体内 CA 細胞中では、副腎髄質クロマフィン細胞や交感神経細胞などの NE 細胞において比較的高い V-1 タンパク質の発現を示している。

そこで、本研究では、内分泌細胞のモデル系である培養ウシ副腎髄質細胞および中枢神経系のモデル細胞である培養ラット脳幹神経細胞を用いてこれら天然物質の CA 遊離作用の性質について検討を行った。さらに、CA 生合成亢進の病態時における CA 遊離機構の性質について検討するため、CA 生合成制御タンパク質 V-1 を安定的に過剰発現させて CA 生合成を亢進させた PC12D 株細胞をその病態モデル細胞とし、天然有毒物質の CA 遊離作用について検討を行った。

[結果・考察] 1. MTX, PTX および GTX で培養副腎髄質細胞を処置し、その CA 遊離作用を検討した結果、MTX の作用が最も強く、対照的に GTX は用いた有毒物質の中で最も作用が弱かった。また、MTX は外液中の Ca^{2+} 依存的に CA 遊離を引き起こすことも確認された。ウシ副腎髄質には、主にエピネフリン (EP) を含む EP 細胞と NE を含む NE 細胞が存在している。High K^{+} (脱分極) 刺激により副腎髄質から EP および NE 遊離が生じるが、それらの遊離量の比率は、約 1:0.3 (EP:NE) で NE と比較して EP が圧倒的に多かった。これはウシ副腎髄質中の EP と NE 細胞数比とほぼ一致している。一方、MTX (0.1 ~ 2 nM) の場合は約 (1:0.15) で、NE 遊離に対してさらに EP 遊離を増加させた。これらの結果は MTX が EP 細胞により選択的に作用する可能性を示しており、MTX の細胞に対する親和性が EP と NE 細胞では異なるものかもしれない。しかし、PTX や GTX ではこのような作用は認められなかった。

2. MTX は脳幹神経細胞に Ca^{2+} 流入を引き起こし、 $[\text{H}]$ norepinephrine を遊離した。CA 遊離を引き起こす MTX の濃度は、 Ca^{2+} 流入を引き起こす濃度と同程度の濃度であった。MTX は外液に Ca^{2+} が存在しない状態では $[\text{H}]$ norepinephrine を遊離しなかった。また、この MTX による Ca^{2+} 流入は種々の Ca^{2+} チャネル拮抗薬によっても阻害された。MTX による Ca^{2+} 流入は tetrodotoxin によって影響を受けず、また外液中に Na^{+} が存在しない場合でもこの流入は観察された。この結果から、MTX による Ca^{2+} 流入は外液

中 Na^+ による膜の脱分極の結果、引き起こされるものではないことが示唆された。この知見は、 high-K^+ による Ca^{2+} 流入は薬物刺激後、数分で一定になる一方、MTX による Ca^{2+} 流入はさらに長い時間持続する現象と一致する。ジヒドロピリジン系薬物である 10^{-6} M の nifedipine は high-K^+ と MTX 刺激による Ca^{2+} 流入を約 10% しか抑制しなかったが、 10^{-5} M の濃度では、この抑制効果を約 50% まで増大した。また、MTX 誘導性の CA 遊離の経時的变化は、脳幹神経細胞と副腎髄質細胞で異なった。すなわち、脳幹神経細胞では MTX 処置による持続的な CA 遊離の増加が認められたが、副腎髄質細胞では CA 遊離が処置後 2 分で最大となり、その後減少した。この知見は、脳幹神経細胞と副腎髄質細胞では、電位依存性 Ca^{2+} チャネルに依存した CA 遊離機構に相違があることを示唆している。

3. 培養ウシ副腎髄質細胞および PC12D 細胞に対する GTX の CA 遊離作用を比較し、その作用を検討した。GTX はウシ副腎髄質細胞から NE, DA および EP の遊離作用を示した。また、GTX と同様に Na^+ チャネルの活性化作用を有すると考えられているベラトリジンも NE, DA および EP の遊離作用を示した。しかし、GTX は PC12D 細胞では DA および NE の遊離を惹起しなかった。ウシ副腎髄質細胞において GTX は Na^+ チャネルを活性化することにより細胞内への Na^+ 流入を起こし、細胞膜脱分極、 Ca^{2+} チャネル開口、 Ca^{2+} 流入の一連の過程を経て、CA を遊離すると解釈される。一方、whole-cell patch-clamp 法を用いた電気生理学的な解釈は、PC12D 細胞においては、電位依存性 Na^+ チャネルの発現は非常に少ないかほとんど発現していないことが示されている。したがって、GTX が PC12D 細胞で CA 遊離を発現しなかった一つの理由としては GTX の作用点である電位依存性 Na^+ チャネルの発現が非常に少ないためと考えられる。

4. V-1 を安定的に過剰発現させて CA 生合成を亢進させた PC12D 細胞を CA 生合成亢進の病態におけるモデル細胞として、MTX または PTX 誘導性の CA 遊離について検討したところ、安定的 V-1 過剰発現株細胞では、ベクターコントロール株細胞と比較して、これら天然有毒物質による CA 遊離が亢進していた。また、自発的な CA 遊離も亢進していた。また、CapZ はアクチン集合を制御するアクチンフィラメントの barbed end にキャップする F-actin-binding proteins の一つである。V-1 は in vitro の実験系で CapZ- α および β により構成されるヘテロダイマーと結合することで、アクチン集合の核形成と F-actin の barbed end でのアクチン集合の両方を阻害することが明らかにされている。PC12D 細胞における V-1 の過剰発現ではアクチンフィラメントのバンドル構造の形成促進が観察された (未発表データ)。これらの知見は V-1 が Ca^{2+} 流入依存的に CapZ の活性を調節し、アクチンフィラメントの形成を制御し、それによって CA 遊離を促進することを示唆している。アクチンフィラメントの barbed end をキャップする薬物であるサイトカラシン D の作用を検討したところ、PC12D 細胞においては MTX の Ca^{2+} 流入による DA 遊離を増強し、V-1 過剰発現株細胞においては MTX および high K^+ 刺激による DA 遊離を増強した。さらに、PC12D 細胞において MTX 刺激に $\text{Ca}^{2+}/\text{CaMK II}$ のリン酸化の促進が確認され、同時に MTX 刺激により V-1 と CapZ の相互作用の促進が確認された。

以上の結果から、MTX, PTX および GTX の天然有毒物質には、CA 遊離作用の強度に違いがあり、これらは内分泌および中枢神経系におけるイオンチャネルを介する CA 遊離機構の解明に有用であり、特

に MTX については Ca^{2+} チャネルによる CA 遊離制御の分子メカニズム解明のためにも有用と考えられた。また、PC12D 細胞において、 Ca^{2+} 流入により Ca^{2+} /CaMK II のリン酸化が促進され、V-1 と CapZ の相互作用が増加し、その結果アクチンフィラメントの形成が制御され、それによって CA 遊離が促進されるという V-1 と CA 遊離機構の関連が示唆された。このような V-1 の CA 生合成および遊離制御における機能を解明していけば、CA 生合成および遊離異常が関連する疾患の発症機序の解明や治療法の発見に貢献できるものと期待される。

審査結果の要旨

カテコールアミン (CA) 遊離の分子機構を解明することは、CA 遊離異常が関連する神経疾患の治療薬および治療法の開発に極めて有用である。しかし、CA 遊離制御の分子メカニズムについては不明な点が多い。一方、マイトトキシシン (MTX)、パリトキシシン (PTX) およびグラヤノトキシシン (GTX) などの天然有毒物質は、イオンチャンネルに作用することが知られているが、これらの天然有毒物質の副腎髄質細胞および中枢神経細胞における CA 遊離作用の薬理的性質に関する報告はほとんど見当たらない。そこで、本研究では、内分泌細胞のモデル系であるウシ副腎髄質細胞および中枢神経細胞のモデル系であるラット脳幹神経細胞を用いて、これら天然物質の CA 遊離作用の性質について検討を行った。さらに、CA 生合成亢進の病態時における CA 遊離機構の性質を明らかにするため、CA 生合成制御タンパク質 V-1 を安定的に過剰発現させて CA 生合成を亢進させた PC12D 株細胞を用いて、天然有毒物質の CA 遊離作用について検討を行った。

MTX, PTX および GTX で副腎髄質細胞を処置し、その CA 遊離作用を検討した結果、MTX の作用が最強であった。この MTX の作用を脳幹神経細胞を用いて検討したところ、MTX は細胞内に流入する Ca^{2+} を増加させた。この作用はテトロドトキシシンでほとんど抑制されなかったが、電位感受性 Ca^{2+} チャンネル拮抗薬では著明に阻害されることが明らかとなった。また、MTX 誘導性の CA 遊離の経時的变化は、脳幹神経細胞と副腎髄質細胞で異なっていた。すなわち、脳幹神経細胞では MTX 処置により、持続的な CA 遊離の増加が認められたが、副腎髄質細胞では処置後 2 分で CA 遊離が最大となり、その後減少した。一方、GTX を副腎髄質細胞および PC12D 細胞に投与したところ、興味深いことに副腎髄質細胞では CA 遊離が観察されたが、PC12D 細胞ではそれが認められなかった。この相違は、GTX の作用点である電位感受性 Na^{+} チャンネルの発現量の差によると推察された。CA 生合成の亢進を示す V-1 安定的過剰発現株細胞において、MTX および PTX 誘導性の CA 遊離について検討したところ、ベクターコントロール細胞と比較して細胞内 CA 含量が増大し、またこれら天然有毒物質による CA 遊離が亢進していた。この結果は、CA 生合成増強因子である V-1 が、CA 遊離促進因子としても機能することを示唆するものである。

以上の研究成果により、MTX, PTX および GTX の天然有毒物質は、CA 遊離作用において薬理的性質に顕著な違いがあることが明確となった。また、内分泌系および中枢神経系におけるイオンチャンネルを介する CA 遊離機構を解明するうえで、これらの有毒物質は有用であり、特に MTX は Ca^{2+} 流入による CA 遊離制御の分子メカニズム解明にも、極めて有用な薬理的 tool となることが明らかにされた。

よって、本論文は博士 (薬学) の学位論文として合格と認める。