

NMDA受容体グリシン結合部位拮抗薬の脳保護作用に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/16582

氏名	大谷 憲一
生年月日	
本籍	大阪府
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博乙第254号
学位授与の日付	2002年9月30日
学位授与の要件	論文博士(学位規則第4条第2項)
学位授与の題目	NMDA受容体グリシン結合部位拮抗薬の脳保護作用に関する研究
論文審査委員(主査)	米田 幸雄(研究科・教授)
論文審査委員(副査)	辻 彰(薬学部・教授) 横井 毅(医学系研究科・教授) 山田 清文(薬学部・教授) 谷浦 秀夫(研究科・助教授)

学位論文要旨

Abstract

A newly discovered compound, SM-31900, was shown to be a systemically active antagonist with high affinity for the *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor glycine-binding site. The effects of NMDA receptor glycine-binding site antagonists were examined in a focal and a global cerebral ischemia model. Each model has different pathological features. The focal cerebral ischemia model, in which ischemia is induced by middle cerebral artery occlusion (MCAo) in spontaneously hypertensive rats (SHRs), was used to investigate the therapeutic time window of SM-31900. When administered 30 min after MCAo as a 1.5 mg/kg bolus followed by 6.0 mg/kg/h continuous infusion until 24 hr after MCAo, SM-31900 significantly reduced the infarct volume by 40%. Delaying the initiation of SM-31900 treatment from 30 to 60 min reduced the extent of the neuroprotective effect from 40% to 20%, which was still significant. The effects of a NMDA receptor glycine-binding site antagonist, SM-18400, on the mortality rate, deterioration of neurological signs, and formation of brain edema were studied in the global ischemia model, in which ischemia is induced by permanent

occlusion of the bilateral carotid arteries using SHRs. This compound dramatically improved these indexes of ischemic injury, suggesting that NMDA receptors participate in the progression of pathological states.

This study supports the use of the NMDA receptor glycine-binding site as a therapeutic target for cerebral ischemia.

脳卒中は死亡率が高いことに加え、後遺症を残す点で深刻な疾患である。脳卒中の中でも血管閉塞が原因となる病態は、虚血性脳障害と呼ばれている。この障害の治療ターゲットの一つは、発症数時間以内での薬物治療である。この時期には、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸が細胞外に大量に放出・蓄積される。グルタミン酸は、その受容体の一つである *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体を過剰に活性化することで、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を介し神経細胞死を引き起こす。このことから、虚血性脳障害の治療薬として NMDA 受容体拮抗薬の応用が考えられてきた。しかしながら、NMDA 受容体のグルタミン酸結合部位ならびにチャネル部位拮抗薬は、精神障害、学習記憶障害、神経細胞空胞化が一原因となり、臨床応用には至っていない。NMDA 受容体を抑制する他のアプローチは、その活性化に必須であるグリシンの結合部位を阻害することである。NMDA 受容体グリシン結合部位拮抗薬には、上記副作用が少ないとの指摘がある。そこで、虚血性脳障害治療薬の開発を目的として、NMDA 受容体グリシン結合部位拮抗薬の探索・合成研究を開始した。これまでに報告された同部位拮抗薬の多くは脳移行性が乏しいため、臨床応用は困難であるとの指摘がなされている。そこで、良好な脳移行性を有する化合物の探索に注力し、末梢投与で有効な新規 NMDA 受容体グリシン結合部位拮抗薬を見出した。

本論文では、まず、それらの代表的化合物である SM-31900 の *in vitro* ならびに *in vivo* における薬理学的特性を報告した。SM-31900 は、NMDA 受容体グリシン結合部位の放射性リガンドである [3H]glycine ならびに [3H]5,7-dichlorokynurenic acid のラット膜標品での結合活性を強力に阻害した (K_i 値: それぞれ、 11 ± 2 nM, 1.0 ± 0.1 nM)。一方、SM-31900 は、NMDA 受容体のグルタミン酸結合部位、同チャネル部位、non-NMDA グルタミン受容体を含めその他多くの受容体・イオンチャネルには、ほとんど結合親和性を示さなかった。このことから、SM-31900 は NMDA 受容体グリシン結合部位に選択的に結合することが示唆された。また、SM-31900 は、NMDA 受容体の活性化状態を反映する [3H]MK-801 (NMDA 受容体チャネル部位リガンド) 結合を濃度依存的かつ完全に抑制した。この実験結果から、SM-31900 が NMDA 受容体の antagonist であることを明らかにした。次に、内因性の興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸による神経細胞死に対する作用を調べた。SM-31900 は神経細胞死を強力に抑制し (50%有効濃度 EC_{50} 値: $0.11 \mu M$)、その抑制作用は同時に比較した同効他剤より優れたものであった (EC_{50} 値、5,7-dichlorokynurenic acid: $26 \mu M$; 7-chlorokynurenic acid: $61 \mu M$; L-689,560: $0.87 \mu M$)。さらに、SM-31900 はマウス NMDA 誘発けいれんを静脈内投与によって強力に抑制した (50%有効用量: 2.3 mg/kg)。一方、上記同効他剤には、いずれも静脈内投与では抗けいれん作用が認められなかった。SM-31900 は、末梢投与によっても中枢抑制作用を発揮できる点で、臨床応用の可能性のある化合物である。

次に、性質の異なる 2 種類の脳虚血モデル（局所脳虚血モデル・前脳虚血モデル）での脳障害に対する NMDA 受容体グリシン結合部位拮抗薬の治療効果について検討した。いずれの病態に対しても未だに十分有効な治療法あるいは治療薬の開発には至っていない。したがって、これらのモデルでの NMDA 受容体グリシン結合部位拮抗薬の治療効果を調べ、臨床応用の可能性を探ることは非常に重要であると考えた。

局所脳虚血モデルには、ラットを用いた中大脳動脈閉塞モデルを採用した。中大脳動脈の閉塞は、臨床で最も頻度の高い血管閉塞状態である。ラット中大脳動脈閉塞モデルでの病理所見は細胞死の結果としての脳梗塞であり、臨床所見と一致する。そこで、脳梗塞を指標に NMDA 受容体グリシン結合部位拮抗薬の治療効果を調べた。薬剤の適切な治療効果の判定には、梗塞巣体積の再現性の良い評価系が不可欠である。脳虚血に対する感受性はラットの系統により異なることから、最初に複数のラット系統間での梗塞巣の大きさ・バラツキを検討し、高血圧自然発症ラットを用いた再現性の良い評価系を確立した。本モデルにおいて、SM-31900 の脳梗塞巣縮小作用を検討した。SM-31900 の治療有効時間を調べる目的で、投与開始時間の異なる 3 つの独立した試験を行った。すなわち、Experiment I では虚血 5 分後に、experiment II では 30 分後に、また、experiment III では 60 分後に薬物の投与を開始した。いずれの試験においても虚血 24 時間後まで薬物を持続的に投与した。各実験において、投与量の異なる SM-31900 処置群を 3 群と vehicle 処置群の合計 4 群を設定した。各実験での SM-31900 の投与量ならびに脳梗塞巣縮小率を Table 1 に示した。Experiment I での SM-31900 (0.38 mg/kg + 1.5 mg/kg/h) 処置群 ならびに (0.75 mg/kg + 3.0 mg/kg/h) 処置群での脳梗塞巣縮小率は、それぞれ、37%、34%で、非常に強力なものであった。また、両群で脳梗塞巣縮小率は、ほぼ同等であった。これは、虚血 5 分後から SM-31900 を投与した場合には、その神経保護効果は前者の投与量にて最大に達することを意味している。投与開始時間を 5 分 (experiment I) から 30 分 (experiment II) へ遅延させた場合、SM-31900 (0.38 mg/kg + 1.5 mg/kg/h) 処置群の梗塞縮小率は 37%から 25%へ低下した (Table 1)。しかしながら、experiment I と II の SM-31900 (0.75 mg/kg + 3.0 mg/kg/h) 処置群における梗塞縮小作用は、それぞれ 34%、37%でほぼ同等であった。すなわち、投与開始時間が虚血後 30 分以内であれば、薬物の投与量を上げることで脳保護効果の減弱を代償できることを示している。Experiment III においても、SM-31900 (1.5 mg/kg + 6.0 mg/kg/h) 処置群で有意な梗塞縮小作用 (縮小率：20%) が認められた。SM-31900 は少なくとも 1 時間の治療有効時間を有しており、臨床応用の可能性が示唆された。

さらに、前脳虚血モデルでの虚血障害に対する NMDA 受容体グリシン結合部位拮抗薬の治療効果について調べた。本実験には、NMDA 受容体グリシン結合部位拮抗薬として SM-18400 を用いた。前脳虚血モデルには、高血圧自然発症ラットを用いた両側総頸動脈の永久結紮モデルを採用した。この前脳虚血モデルに特徴的な病理所見は脳浮腫である。脳浮腫は、脳機能障害・個体死を引き起こす点で、臨床上大きな問題となっている。そこで、本モデルで認められる死亡率・神経症状・脳浮腫に対する NMDA 受容体グリシン結合部位拮抗薬の作用を調べた。薬物処置は、虚血負荷直後ならびに 2 時間後に静脈内投与 (15mg/kg あるいは 30mg/kg) に行なった。その結果、薬剤処置により用量依存的な死亡率低下作用が認められ、この抑制作用は、虚血負荷 3 日目においても有意なものであった (Fig. 1)。2 つの SM-18400 処置群間で、虚血 6 時間後までの死亡率に差は認められなかったが、SM-18400 (30 mg/kg) 処置群の神経症状は SM-18400 (15 mg/kg) 処置群のそれに比較して明らかに改善されていた。

次に、薬剤の作用点をより明確にするために、脳浮腫に対する NMDA 受容体グリシン結合部位拮抗薬の

治療効果について検討した。脳浮腫は、虚血 3 時間後における脳水分含量を指標として評価した。本モデルでは脳部位により血流低下の度合いが異なることが報告されている。脳浮腫の程度は、その部位での脳血流低下の程度にほぼ一致していると考えられることから、脳を血流低下の程度を基準に 3 つの部分、すなわち、終脳、間中脳、小脳に分割し水分含量を算出した。手術 3 時間後における終脳、間中脳、ならびに小脳の脳水分含量を Fig. 2 に示した。Vehicle 処置群の終脳ならびに間中脳における水分含量は、偽手術群に比較して有意に高かった。一方、小脳においては脳水分含量の増加は認められなかった。SM-18400 は、終脳ならびに間中脳での脳浮腫を用量依存的かつ有意に抑制した。本検討により、NMDA 受容体グリシン結合部位拮抗薬が前脳虚血モデルで認められる脳浮腫亢進・神経症状悪化・個体死に対し治療効果を示すことを明らかにした。また、これらの結果から、本前脳虚血モデルでは、NMDA 受容体活性化、脳浮腫亢進、神経症状の悪化、個体死という一連の進行過程のあることが示唆された。なお、本前脳虚血モデルにおける NMDA 受容体の関与の報告は、著者によるものが初めてである。

以上、著者は、末梢投与で有効な新規 NMDA 受容体グリシン結合部位拮抗薬を見出すとともに、本剤が性質の異なる虚血性脳障害に対し治療効果を有することを明らかにした。局所脳虚血モデルにおける検討では、SM-31900 の治療有効時間について検討し本剤が局所脳虚血で認められる脳障害の治療薬として有望であることを示した。また、前脳虚血モデルの一つである高血圧自然発症ラット-両側総頸動脈結紮モデルの虚血病態（脳浮腫・神経症状・死亡率）を NMDA 受容体グリシン結合部位拮抗薬が改善することを初めて明らかにした。

Table 1

Percentage of infarct volume reduction in each SM-31900-treated group

Dosage of SM-31900				
bolus +	0.19 mg/kg +	0.38 mg/kg +	0.75 mg/kg +	1.5 mg/kg +
continuous infusion	0.75 mg/kg/h	1.5 mg/kg/h	3.0 mg/kg/h	6.0 mg/kg/h
Experiment I	14%	37%*	34%*	-
Experiment II	-	25%*	37%**	40%**
Experiment III	-	12%	17%	20%*

Each value is presented as the percentage of infarct volume reduction in each SM-31900-treated group when the infarct volume of each vehicle-treated group is defined as 100%.

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, compared with the value in the vehicle-treated group by Williams' or Shirley-Williams' multiple comparison test after Bartlett's test

-, not tested

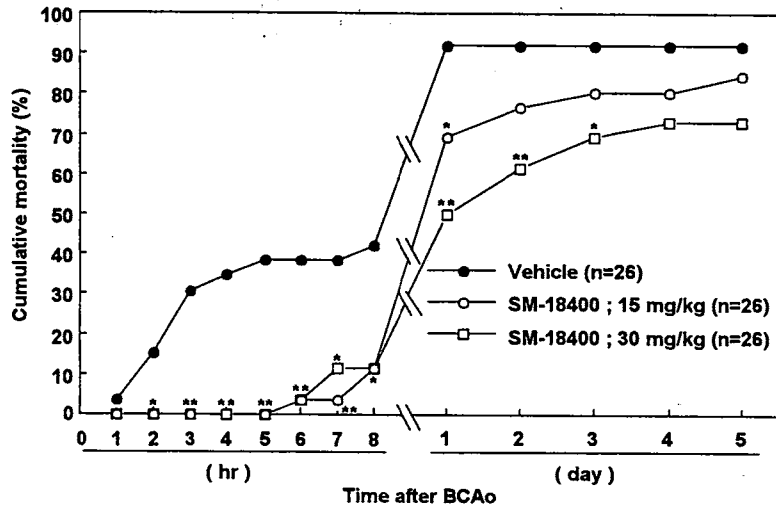


Fig. 1. Effects of SM-18400 on the cumulative mortality rate in SHRs subjected to BCS. SM-18400 or vehicle was administered immediately and 2 h after BCS. Statistical significance was determined by the χ^2 test: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

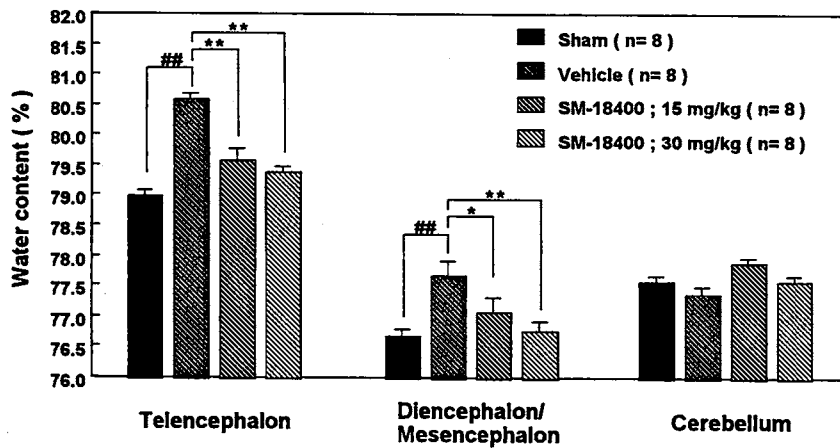


Fig. 2. Effects of SM-18400 on brain water content in the telencephalon, diencephalon/mesencephalon, and cerebellum 3 h after BCS in SHRs. SM-18400 or vehicle was administered immediately and 2 h after BCS. Values are the mean \pm S.E.M. of the brain water content of 8 animals for each group. The difference between the sham-operated and vehicle group was determined by the Student's unpaired t -test ($##P < 0.01$) and the differences among the vehicle-treated group and the SM-18400-treated groups were analyzed using Williams' multiple comparison test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

学位論文審査結果の要旨

脳卒中は死亡率が高いことに加え、後遺症を残す点で深刻な疾患である。脳卒中の中でも血管閉塞が原因となる病態は、虚血性脳障害と呼ばれている。この障害の治療ターゲットの一つは、発症数時間以内での薬物治療である。この時期には、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸が細胞外に大量に放出・蓄積される。グルタミン酸は、その受容体の一つである *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体を過剰に活性化することで、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を介し神経細胞死を引き起こす。このことから、虚血性脳障害の治療薬として NMDA 受容体拮抗薬の応用が考えられてきた。しかしながら、従来の NMDA 受容体拮抗薬は、精神障害、学習記憶障害、神経細胞空胞化が一因となり、臨床応用には至っていない。NMDA 受容体を抑制する他のアプローチは、その活性化に必須であるグリシンの結合部位を阻害することである。NMDA 受容体グリシン結合部位拮抗薬には、上記副作用が少ないとの指摘がある。そこで、虚血性脳障害治療薬の開発を目的として、NMDA 受容体グリシン結合部位拮抗薬の探索・合成研究を開始した。これまでに報告された同部位拮抗薬の多くは脳移行性が乏しいため、臨床応用は困難であるとの指摘がなされている。そこで、良好な脳移行性を有する化合物の探索に注力し、末梢投与で有用な新規 NMDA 受容体グリシン結合部位拮抗薬を探索した。

本論文では、まず、それらの代表的化合物である SM-31900 の *in vitro-in vivo* 薬理学的特性を報告した。SM-31900 は、NMDA 受容体グリシン結合部位の放射性リガンドである [^3H] glycine ならびに [^3H] 5,7-dichlorokynurenic acid のラット膜標品での結合活性を強力に阻害した。一方、SM-31900 は、NMDA 受容体のグルタミン酸結合部位、同チャネル部位、non-NMDA グルタミン受容体等には、ほとんど結合親和性を示さず、NMDA 受容体グリシン結合部位に選択性を示すことが明らかとなった。また、SM-31900 は、NMDA 受容体の活性化状態を反映する [^3H] MK-801 結合を完全に抑制したことから、NMDA 受容体の antagonist であることが明らかとなった。さらに、神経細胞培養系においてグルタミン酸による神経細胞死を強力に抑制するだけでなく、マウス NMDA 誘発けいれんを静脈内投与によって強力に阻止したので、SM-31900 が中枢移行性の良好な選択的 NMDA 受容体グリシン結合部位拮抗薬であることは明白である。

次に、性質の異なる 2 種類の脳虚血モデル（局所脳虚血モデル・前脳虚血モデル）での脳障害に対する NMDA 受容体グリシン結合部位拮抗薬の治療効果について検討した。局所脳虚血モデルには、臨床で最も頻度の高い中大脳動脈閉塞により作成されるラットモデルを採用した。治療効果を虚血 24 時間後に形成される脳梗塞巣を指標として評価したところ、SM-31900 は虚血 5 分後から 24 時間後までの静脈内持続投与（0.38mg/kg 急速静注 + 1.5mg/kg/h 持続静注）によって最大で約 40% と強力な梗塞巣縮小作用を示した。また、虚血性脳障害の臨床では、病態発症から治療開始までに時間を要することから、治療剤にはある程度の治療有効時間が必要とされる。そこで、投与開始を虚血 30 分後、1 時間後と遅らせた場合の効果について検討した。投与開始の遅延により、梗塞縮小率は小さくなるものの、虚血 30 分後からの投与では用量増加により縮小率は再び 40% に達した。このことは、投与開始時間が虚血負荷 30 分以内であれば、投与量を上げることで脳保護効果の減弱を代償できることを示している。SM-31900 は、虚血 1 時間後からの投与においても有意な脳梗塞巣縮小作用を示した。SM-31900 は少なくとも 1 時間の治療有効時間を有しており、臨床応用の可能性が示唆された。

さらに、前脳虚血モデルでの虚血障害に対する NMDA 受容体グリシン結合部位拮抗薬の治療効果について調べた。本実験には、本部位拮抗薬として SM-18400 を用いた。前脳虚血モデルには、高血圧自然発症ラットを用いた両側総頸動脈の永久結紮モデルを採用した。この前脳虚血モデルに特徴的な病理所見は脳浮腫である。脳浮腫は、脳機能障害・個体死を引き起こす点で、臨床上大きな問題となっている。そこで、本モデルで認められる死亡率・神経症状・脳浮腫に対する NMDA 受容体グリシン結合部位拮抗薬の作用を調べた。薬物処置は、虚血直後ならびに 2 時間後に静脈内投与（30mg/kg）にて行った。その結果、虚血 5 時間後での死亡率は溶媒投与群で 38% であったのに対し、薬物処置群では死亡例は認められなかった。この死亡率の抑制作用は、虚血 3 日後においても有意なものであった。神経症状についても、虚血後 24 時間まで、薬物投与群で有意な改善作用が認められた。次に、薬剤の作用点をより明確にするために、脳浮腫に対する治療効果について検討した。溶媒投与群にて虚血 3 時間後までに上昇する脳水分含量は、薬物投与によりほぼ完全に抑制された。本検討により、NMDA 受容体グリシン結合部位拮抗薬が前脳虚血モデルで認められる脳浮腫亢進・神経症状悪化・個体死に対し治療効果を示すことが明らかとなった。なお、本前脳虚血モデルにおける NMDA 受容体の関与の報告は、今回のものが世界で初めてである。

以上の研究成果は、末梢投与で有効な新規 NMDA 受容体グリシン結合部位拮抗薬を見出すとともに、本剤が性質の異なる虚血性脳障害に対して治療効果を有することを明らかにした点で、虚血性脳障害の治療ターゲットとして、NMDA 受容体グリシン結合部位の妥当性を提示する貴重な内容であるので、本論文は博士（薬学）に値すると判断する。