

氏 名	イーゴル アルベス イハ Higor Alves Iha
学位の種類	博士(薬科学)
学位記番号	博薬科第34号
学位授与の日付	平成30年3月10日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Pharmacological analysis of the mechanisms underlying seizure induction mediated by nicotinic acetylcholine receptors (ニコチン性アセチルコリン受容体を介するけいれん発作発現メカニズムの薬理解析)
論文審査委員	(主査) 教授 福永 理己郎 (副査) 教授 大野 行弘 (副査) 教授 谷口 雅彦

論文内容の要旨

けいれん発作は脳の一時的な興奮によって引き起こされ、強直性発作または強直間代性発作を発症する。けいれん発作は、脳傷害、脳代謝異常、薬物毒性などの脳障害によって2次的に誘発される「症候性」発作と、原因が特定されず発症する「特発性」発作に分類することができる。ニコチン性アセチルコリン (nACh) 受容体は、ニューロンの興奮性および神経伝達物質放出を制御する5量体カチオンチャンネルであり、精神・運動機能、認知機能、自律神経機能などの調節や、運動障害やてんかんを含む様々な疾患の発症調節に重要な役割を果たしている。具体的には、全般性強直-間代発作や部分発作を呈する特発性てんかん(例えば、常染色体優性夜間前頭葉てんかん等)、およびニコチンの急性中毒により誘発されるけいれん発作の発症にnACh受容体は関与している。しかし、nACh受容体をするけいれん発作の発症メカニズムは依然として不明である。一方、脳神経活動の変化に鋭敏に反応するバイオマーカーとしてFosタンパク質の発現があり、Fosタンパク質発現を指標とした免疫組織化学的分析が、脳障害

や薬物作用に関連する脳領域を探索するために有用であることが示されている。そこで本研究では、nACh 受容体を介するけいれん発作の発現メカニズムを明らかにする目的で、行動薬理学的および Fos 免疫組織化学的研究を行った。また、一部の実験では、Fos タンパク質発現解析法を用いて、錐体外路系運動障害に対する NMDA 受容体グリシン結合部位刺激薬の作用様式を解析した。

nACh 受容体を介するけいれん発作の発現メカニズムでは、脳内の nACh 受容体を刺激するため、マウスおよびラットにニコチンを腹腔内投与した。その結果、1~4 mg/kg (i.p.) のニコチン投与は用量依存的に運動興奮症状を引き起こし、3 および 4 mg/kg の投与量でけいれん発作を誘発した。次に、4 mg/kg のニコチンによるけいれん発現に対する各種 nACh 受容体拮抗薬の影響を評価した。その結果、サブタイプ非選択的な nACh 受容体拮抗薬であるメカミルアミン (MEC) および $\alpha 7$ nACh 受容体拮抗薬であるメチルリカコニチンによってニコチン誘発けいれんは顕著に抑制されたが、 $\alpha 4 \beta 2$ nACh 受容体拮抗薬であるジヒドロ- β -エリトロイジンの抑制作用は弱かった。

さらに、ニコチン誘発けいれん発作の発現に関わる脳内部位を探索する目的で、神経興奮のバイオマーカーである Fos タンパク質の発現解析を行った。ニコチン (4 mg/kg, i.p.) 投与 2 時間後に摘出した脳を用いて Fos 陽性細胞数を計測した結果、梨状葉皮質、扁桃核、内側手綱核、視床紐傍核、視床下部前部および孤束核において、部位特異的な Fos 発現の上昇を認められ、この Fos 発現上昇も MEC により有意に抑制された。次に、ラットを用いてこれら脳部位の電気破壊実験を行った結果、扁桃核を電気破壊した動物では、ニコチン誘発けいれん発作が抑制されたが、梨状葉皮質、内側手綱核および視床の電気破壊はニコチン誘発けいれんの発現に影響を及ぼさなかった。さらに、扁桃核へのニコチンを微量注入 (100 あるいは 300 μ g/片側) することによっても、けいれん発作が誘発された。本研究の結果から、ニコチンが主に $\alpha 7$ nACh 受容体を介して扁桃核ニューロンを活性化することによりけいれん発作を誘発することが強く示唆された。

さらに、Fos 発現の免疫組織化学的解析法を用いて、NMDA 受容体グリシン結合部位刺激薬の錐体外路系運動障害に対する作用を評価した。その結果、NMDA 受容体グリシン結合作動薬の D-サイクロセリンが、抗精神病薬ハロペリドールによる錐体外路系運動障害 (ブラジキネジア) を軽減し、かつ、錐体外路系運動中枢の線条体においてハロペリドール誘発 Fos 発現を抑制することを見出した。一方、D-サイクロセリンによる Fos 発現の抑制は、精神機能をつかさどる側坐核シェル領域では認められず、

D-サイクロセリンの作用部位選択性が確認された。

本研究を通じて、神経興奮のバイオマーカーである Fos タンパク質の発現解析がけいれん発作の発現部位や薬物の作用部位を特定する上で極めて有用な手法であることが確認された。さらに、今回の研究結果より、ヒトのけいれん発作発症に重要な役割を果たしている nACh 受容体に関して、主として $\alpha 7$ nACh 受容体が扁桃核ニューロンを興奮させ、けいれん発作を惹起することが示された。これらの知見をもとに、今後新たな抗てんかん薬の開発が進展する可能性が期待される。

論文審査の結果の要旨

けいれん発作は脳の一時的な興奮によって引き起こされ、強直性発作または強直間代性発作を発症する。けいれん発作は、脳傷害、脳代謝異常、薬物毒性などの脳障害によって2次的に誘発される「症候性」発作と、原因が特定されず発症する「特発性」発作に分類される。ニコチン性アセチルコリン (nACh) 受容体は、ニューロンの興奮性および神経伝達物質放出を制御する5量体カチオンチャネルであり、精神・運動機能、認知機能、自律神経機能などの調節や、運動障害やてんかんを含む様々な疾患の発症に重要な役割を果たしている。特に、全般性強直-間代発作や部分発作を呈する特発性てんかん(常染色体優性夜間前頭葉てんかん等)、およびニコチンの急性中毒により誘発されるけいれん発作の発症に nACh 受容体が関与することが知られている。しかし、nACh 受容体を介するけいれん発作の発症メカニズムについては依然として不明な点が多い。一方、脳神経活動の変化に鋭敏に反応するバイオマーカーとして Fos タンパク質の発現が知られており、Fos タンパク質発現を指標とした免疫組織化学的分析が、脳障害や薬物作用に関連する脳領域の探索において有用であることが知られている。

以上の背景のもと、Higor Alves Iha 君は nACh 受容体を介するけいれん発作の発現メカニズムを明らかにする目的で、行動薬理学的および Fos 免疫組織化学的研究を行った。また、錐体外路系運動障害に対する NMDA 受容体グリシン結合部位刺激薬の作用様式について、Fos タンパク質発現解析法による研究を行った。

まず、nACh 受容体を介するけいれん発作をマウスおよびラットに誘発するために、ニコチンの腹腔内投与について検討した。その結果、1~4 mg/kg (i.p.) のニコチン投与が用量依存的に運動興奮症状を引き起こし、3 および 4 mg/kg の投与量でけいれん発作を誘発することを示した。次に、4 mg/kg のニコチンによるけいれん発現に対する各種 nACh 受容体拮抗薬の影響を評価し、サブタイプ非選択的な nACh 受容体拮抗薬であるメカミルアミン (MEC) および $\alpha 7$ nACh 受容体拮抗薬であるメチルリカコニチンがニコチン誘発けいれんを顕著に抑制するのに対し、 $\alpha 4 \beta 2$ nACh 受容体拮抗薬であるジヒドロ- β -エリトロイジンの抑制作用は弱いことを見出した。

そこで次に、ニコチン誘発けいれん発作の発現に関わる脳内部位を探索するために、神経興奮のバイオマーカーである Fos タンパク質の発現解析を行った。その結果、ニコチン (4 mg/kg, i.p.) 投与 2 時間後に摘出した脳の梨状葉皮質、扁桃核、内側手綱核、

視床紐傍核、視床下部前部および孤束核において、Fos の部位特異的な発現上昇が認められること、これらの発現上昇は MEC により有意に抑制されることを見出した。また、ラットを用いてこれら脳部位の電気破壊実験を行った結果、扁桃核の電気破壊によってニコチン誘発けいれん発作が抑制されるのに対し、梨状葉皮質、内側手綱核および視床の電気破壊はニコチン誘発けいれんの発現に影響を及ぼさないことが示された。さらに、扁桃核へのニコチンの微量注入（100 あるいは 300 μ g/片側）によって、けいれん発作が誘発されることも見出した。これらの結果は、ニコチンが主に α 7nACh 受容体を介して扁桃核ニューロンを活性化することによりけいれん発作を誘発することを強く示唆するものである。

他方、Iha 君は、Fos 発現の免疫組織化学的解析法を用いて NMDA 受容体グリシン結合部位刺激薬の錐体外路系運動障害に対する作用を評価した。その結果、NMDA 受容体グリシン結合作動薬の D-サイクロセリンが、抗精神病薬ハロペリドールによる錐体外路系運動障害（ブラジキネジア）を軽減し、かつ、錐体外路系運動中枢の線条体においてハロペリドール誘発 Fos 発現を抑制することを見出した。これに対し、側坐核シェル領域では D-サイクロセリンによる Fos の発現抑制は認められず、D-サイクロセリンの作用部位選択性が確認された。

Higor Alves Iha 君は本研究により、神経興奮のバイオマーカーである Fos タンパク質の発現解析がけいれん発作の発現部位や薬物の作用部位を特定するうえで極めて有用な手法であることを立証し、さらに、ニコチン誘発性けいれん発作発症において、主として α 7nACh 受容体を介して扁桃核ニューロンが興奮することによってけいれん発作が惹起されることを明らかにした。本研究の成果は、ニコチン誘発性けいれん発作の発現メカニズムを解明するための重要な知見を提供し、新たな抗てんかん薬の開発を促進する可能性が期待される。

以上により、上記の論文は、博士(薬科学)論文として適当と判断する。