

## アルツハイマー病治療に用いられるアセチルコリンエステラーゼ阻害薬の 神経保護作用機序に関する研究

高鳥悠記

### Mechanisms of Neuroprotective Effects of Therapeutic Acetylcholinesterase Inhibitors Used in Treatment of Alzheimer's Disease

Yuki TAKATORI

Department of Pharmacology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University,  
46-29 Yoshida Shimoadachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

(Received May 21, 2006)

Donepezil, galanthamine, and tacrine are therapeutic acetylcholinesterase (AChE) inhibitors used for the treatment of Alzheimer's disease. The aim of this paper is to review recent findings on their neuroprotective properties and the mechanisms of neuroprotection against glutamate neurotoxicity in rat cortical neurons. First, the hallmark of neurotoxicity induced by two different glutamate treatment conditions was examined, revealing that acute glutamate treatment (1 mM, 10 min) induces necrotic neuronal death and that moderate glutamate treatment (100  $\mu$ M, 24 hr) induces apoptotic neuronal death. Next, we showed that therapeutic AChE inhibitors protect cortical neurons from glutamate neurotoxicity in a time- and concentration-dependent manner. We examined the mechanism of this neuroprotective effect and found that the neuroprotective effects against both acute and moderate glutamate treatments are mediated through nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs), or more specifically, the effects of donepezil and galanthamine are mediated through  $\alpha$ 4- and  $\alpha$ 7-nAChR. We also showed that donepezil and galanthamine protect cortical neurons against acute glutamate treatment-induced neurotoxicity at steps before, and that tacrine protects at steps after, nitric oxide radical formation. On the other hand, the neuroprotective effects of donepezil and galanthamine, but not of tacrine, against neurotoxicity induced by moderate glutamate treatment were mediated through the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. These findings unveiled the hitherto unknown neuroprotective effects of therapeutic AChE inhibitors and provided valuable insights into its neuroprotective mechanisms. They may very likely form the basis for a novel treatment strategy against Alzheimer's disease.

**Key words**—acetylcholinesterase; nicotinic acetylcholine receptor; neurotoxicity; Alzheimer's disease; cortical culture; glutamate

#### 1. はじめに

アルツハイマー病は初老期以降に発症する認知症の1つであり、中核症状として認知・学習機能の低下がみられ、進行性の経過をたどる。症例が報告されてから約100年経た現在においても、発症の機序や根本的な治療方法は解明されていない。高齢化社会を迎えた日本社会にとって、アルツハイマー病の発症・進行機序の解明、治療方法の確立は社会的に

重要な課題であるといえる。アルツハイマー病の代表的な病理学的特徴としては、アミロイド $\beta$ タンパク ( $A\beta$ ) を主成分とする老人斑の形成と神経原繊維変化及び神経細胞の脱落が挙げられ、アルツハイマー病は神経変性疾患としての側面を持っている。<sup>1,2)</sup> また、アルツハイマー病患者の死後脳では、コリン作動性神経の起始核の萎縮、マイネルト核から大脳皮質に投射するアセチルコリン (ACh) 作動性神経細胞の減少、皮質におけるアセチルコリントランスフェラーゼ活性の低下、ACh・ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) 発現量の低下など、コリン作動性神経に関連する障害が明らかにされている。<sup>3,4)</sup> コリン作動性神経系が認知・学習機能に関与することから、AChを補充することによ

京都大学大学院薬学研究科薬品作用解析学分野 (〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町 46-29)

現住所：同志社女子大学薬学部薬理学教室 (〒610-0395 京都府京田辺市興戸南銚立 97-1)

e-mail: ytakator@dw.doshisha.ac.jp

本総説は、平成17年度日本薬学会近畿支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

り症状を緩和する試みが行われ、アセチルコリンエステラーゼ (AChE) 阻害作用を持つドネペジルを始めとする治療薬の誕生へと繋がった。

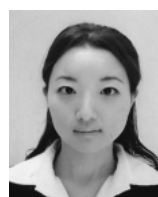
これら AChE 阻害薬は認知機能障害の進行を抑制するのに有効であるが、近年 AChE 阻害薬の神経保護作用の存在を示す知見が得られるなど、AChE 阻害活性に加えて、複数の異なる機序がこれらの薬物の治療効果に関与する可能性が指摘されてきた。前述のように、アルツハイマー病は神経変性疾患であり、AChE 阻害薬の治療効果の一部はこの神経保護作用による可能性が考えられるが、これまでその保護作用の検討と作用機序の解析は十分に行われてきておらず、いまだ解明されていないところが多い。また、現在使用されている AChE 阻害薬は対症療法薬であり、アルツハイマー病の根治には新たな治療戦略の構築が必要である。そのためには、既に臨床で効果が確認されているアルツハイマー病治療薬の作用機序を解明し、そこを端緒として新規アルツハイマー病治療薬開発の手掛かりを得ることは非常に有効であると考えられる。本研究では、これまでアルツハイマー病治療薬として臨床で用いられてきた、ドネペジル、ガランタミン、タクリンの 3 種の AChE 阻害薬に着目し、その作用機序の解析を行った。これら 3 種の AChE 阻害薬の構造式及び IC<sub>50</sub> 値を Table 1 に示す。<sup>5)</sup> 本稿では、これら 3 種の AChE 阻害薬 (ドネペジル、ガランタミン、タクリン) を中枢性 AChE 阻害薬と呼び、その作用と保護作用機序について述べる。

## 2. グルタミン酸神経毒性に対する中枢性 AChE 阻害薬の作用の検討

神経変性疾患においては、グルタミン酸を始めとする多くの内源性化合物によって神経細胞死が引き起こされることが知られている。グルタミン酸は中枢神経系における代表的な神経伝達物質であり、生理的条件下で興奮性神経伝達物質として働くが、脳虚血や神経疾患などの病理的条件下では過剰遊離したグルタミン酸が神経毒として働き、神経脱落を誘発することが知られている。<sup>6,7)</sup> アルツハイマー病との関連では、神経細胞の脱落の原因であるとされている A $\beta$  の神経毒性にグルタミン酸が関与していることが報告されている。このことを示す代表的な知見として、培養大脳皮質細胞において、細胞を A $\beta$  で前処置することによりグルタミン酸神経毒性が増

強されることや、培養細胞株において NOS 阻害薬あるいは NMDA 受容体遮断薬により A $\beta$  神経毒性が減弱されることが挙げられる。<sup>8,9)</sup> グルタミン酸が中枢神経系に広範に分布する興奮性神経伝達物質であり、アルツハイマー病脳における神経細胞の脱落に重要な役割を果たしていることを踏まえると、グルタミン酸神経毒性に対する AChE 阻害薬の保護作用の解析から、アルツハイマー病脳における AChE 阻害薬の働きの一端を明らかにできると考えられる。近年、大脳皮質などの神経細胞を用いたグルタミン酸神経毒性を指標とした研究は著しい進展を見せており、本研究室においても神経疾患における神経細胞死の評価系として初代培養大脳皮質細胞におけるグルタミン酸神経毒性を確立した。そこで、筆者はラット胎仔由来初代培養大脳皮質細胞におけるグルタミン酸を指標とした神経毒性をアルツハイマー病脳における神経細胞死のモデルとして解析を行うこととした。

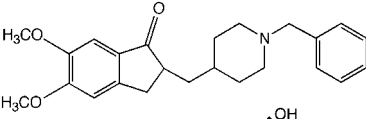
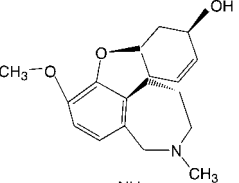
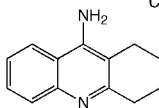
アルツハイマー病患者の死後脳でみられる神経細胞死にはネクローシス性とアポトーシス性の両神経細胞死が関与することが知られている。<sup>10-12)</sup> Kerrらによって、ネクローシスは形態学的に細胞質の全体的な崩壊や細胞内小器官の拡張によって分類され、制御機構の関与しない受動的な細胞死であるとされた。<sup>13,14)</sup> 一方、アポトーシスは核の凝集や断片化、細胞体の退縮を特徴として分類され、ネクローシスとは対照的に様々な遺伝子発現などによって制御された細胞死であるとされている。<sup>15,16)</sup> また、グルタミン酸は投与条件によりネクローシスとアポトーシスの両者を誘発することが報告されている。すなわち、グルタミン酸は、低濃度ではアポトーシスを誘導するのに対して、高濃度ではネクローシスを惹起することを示唆する知見が提出されている。<sup>17)</sup> そこでまず筆者は、ラット胎仔由来初代培養大脳皮質細胞を用いて、高濃度短時間のグルタミン酸処置 (急性グルタミン酸処置 : 1 mM, 10 分) によるネクローシス性、低濃度長時間のグルタミン酸



高島悠記

同志社女子大学薬学部薬理学教室助手。  
1976 年京都市生まれ。京都大学薬学部卒業。京都大学大学院薬学研究科博士課程修了 (指導教官 赤池昭紀教授)。  
2005 年より現職 (岡部進教授)。2006 年日本薬学会近畿支部奨励賞受賞。

Table 1. Comparison of AChE Inhibitors Used for Treatment of Alzheimer's Disease

Drug	Chemical structure	IC <sub>50</sub> (nM)
Donepezil		6.7 ± 0.35
Galanthamine		1200 ± 33
Tacrine		77 ± 1.4

IC<sub>50</sub> values for AChE in the rat cerebral cortex are taken from Kosasa et al., 1990.

処置（慢性グルタミン酸処置：100 μM，24 時間）によるアポトーシス性の神経細胞死の検出を行った。続いて、それぞれのグルタミン酸処置により誘発される神経毒性に対する中枢性 AChE 阻害薬の保護作用及び作用機序を検討した。

### 3. 急性及び慢性グルタミン酸処置によって誘発される神経細胞死の特徴

急性及び慢性グルタミン酸処置によって誘発される神経細胞死を形態学的及び生化学的な両観点より検討した。急性グルタミン酸処置を行った際の神経細胞の形態的变化を、ホフマン・モジュレーション・コントラストを装着した顕微鏡下で観察したところ、ネクローシスに特徴的な細胞の膨潤がみられた。次に、ヘキスト染色により核の形態変化を観察したところ、アポトーシスに特徴的な核の断片化などはみられなかった (Fig. 1(B))。アポトーシスの実行にはタンパク質の *de novo* 合成やカスパーゼの働きが重要であることが知られている。そこで、タンパク質合成阻害薬 cycloheximide (CHX: 1 μg/ml), RNA 合成阻害薬 actinomycin D (Act.D: 1 μg/ml) 又は caspase-3 阻害薬 DEVD (1 μM) を用いてグルタミン酸神経毒性に対する作用を検討した。これらの阻害薬で 24 時間前処置及び急性グルタミン酸と同時処置を行ったが、いずれの前処置によっても保護作用はみられなかった (Fig. 1(C))。これらの結果から、急性グルタミン酸処置によって誘発される神経細胞死は主にネクローシスを介したものであることが示された。同様に、慢性グルタミン酸処

置による神経細胞死の検出を行った。慢性グルタミン酸処置をした細胞をヘキスト染色し、核の形態変化を観察したところ、核クロマチンの凝集や断片化などアポトーシス様の核形態変化がみられた (Fig. 1(E))。また、CHX, Act.D (1 μg/ml) 又は DEVD (1 μM) で前処置及び慢性グルタミン酸と同時処置を行ったところ、いずれの処置によっても保護作用がみられた (Fig. 1(F))。低濃度グルタミン酸刺激は、細胞内へのカルシウム流入や NO の生成により、DNA 損傷やミトコンドリアの脱分極などを介して、カスパーゼカスケードによってアポトーシスが引き起こされると推定される。<sup>18,19)</sup> 本研究におけるこれらの結果を考え合わせると、形態学的及び生化学的な両観点において、慢性グルタミン酸処置により誘発される神経細胞死はアポトーシス性のものを含むことを示唆している (Fig. 1)。

### 4. 中枢性 AChE 阻害薬による神経保護作用の検討

先の条件検討を踏まえ、われわれは急性及び慢性グルタミン酸処置によって惹起される神経細胞死に対する中枢性 AChE 阻害薬の神経保護作用の検討を行った。まず、初代培養大脳皮質細胞を中枢性 AChE 阻害薬とグルタミン酸で同時処置したところ、急性及び慢性のいずれのグルタミン酸処置に対しても保護作用は観察されなかった。そこで、大脳皮質細胞を中枢性 AChE 阻害薬 (10 μM) で 0–24 時間前処置した後にグルタミン酸に曝露したところ、急性及び慢性両グルタミン酸処置に対して前処

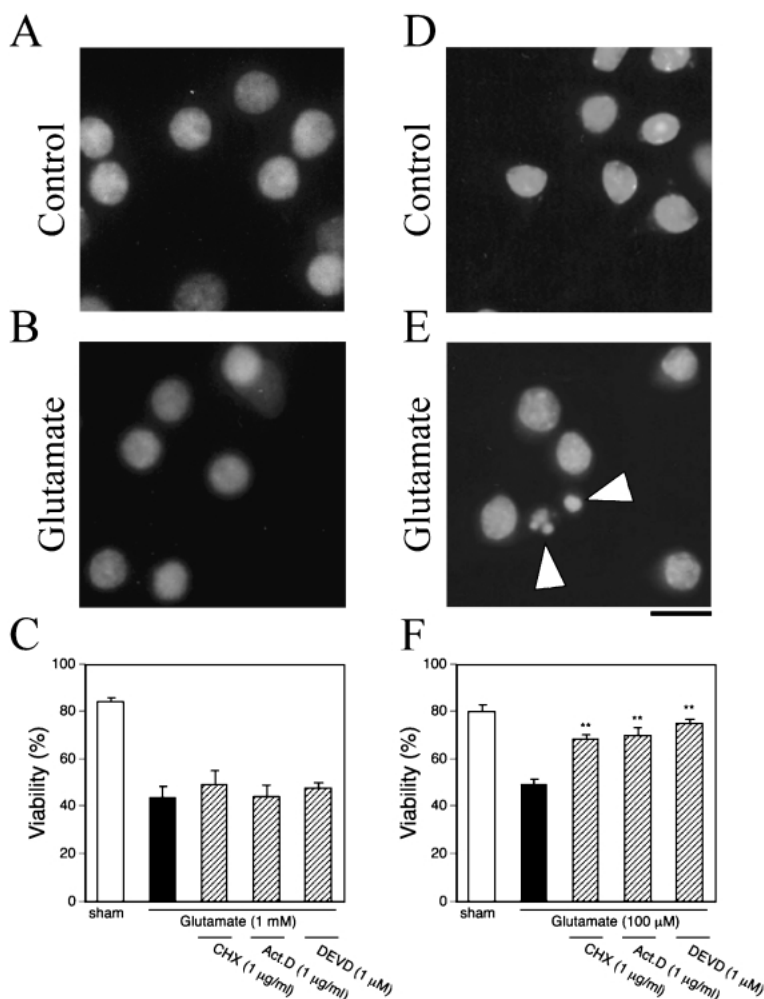


Fig. 1. Characterization of Necrotic and Apoptotic Neuronal Death Induced by Glutamate in Cortical Neurons

A-D: Effects of glutamate treatment on the nuclear morphology. Culture fields were photographed after Hoechst 33258 staining followed by formalin fixation. A and D: untreated cells. B and E: cells treated with 1 mM glutamate for 10 min and 100  $\mu$ M glutamate for 24 hr, respectively. Arrowheads in E shows nuclear fragmentation. C and F: Effects of CHX, Act.D and DEVD on the viability of cells treated with 1 mM glutamate for 10 min and 100  $\mu$ M glutamate for 24 hr, respectively. Cortical cultures were treated with CHX, Act. D or DEVD for 24 hr prior to glutamate treatment and were then stained with trypan blue. Cell viability is represented by the number of non-stained cell out of all cells (stained and non-stained cells) are shown in percentile. All the tested drugs significantly protected the cells from neurotoxicity induced by 100  $\mu$ M glutamate for 24 hr (F), but not from those induced by 1 mM glutamate for 10 min (C). \*\* $p < 0.01$  compared with glutamate alone. Data represent the means  $\pm$  S.E.M. of  $n = 5$  independent observations.

置時間依存的に保護作用が観察された (Fig. 2 (A)). したがって、以下の実験においてグルタミン酸の前処置時間は 24 時間とした。図には急性グルタミン酸処置に対する中枢性 AChE 阻害薬の保護作用と前処置時間との関係を示す。次に、中枢性 AChE 阻害薬の濃度と保護作用の関係を 24 時間の前処置を行う条件において検討した。中枢性 AChE 阻害薬の濃度を 0.001—10  $\mu$ M まで変化させたところ、0.01 又は 0.1  $\mu$ M から 10  $\mu$ M の範囲で急性及び慢性の両グルタミン酸処置に対して濃度依存的に有意な保護作用が観察された (Fig. 2(B)). 図には急性グルタミン酸処置に対する中枢性 AChE 阻害薬

の保護作用と濃度との関係を示す。なお、慢性グルタミン酸処置においても同様の結果が得られている。これらの結果より、中枢性 AChE 阻害薬はグルタミン酸との同時処置ではなく前処置を行うことによって保護作用を示すこと、またいずれの AChE 阻害薬においても IC<sub>50</sub> 値 (Table 1) から予測されるよりはるかに高い濃度域で濃度依存的に保護作用を発現することから、中枢性 AChE 阻害薬が AChE 阻害以外の作用機序によって保護作用を発現することが示唆された。ドネペジル、ガランタミン、タクリンに加え、AChE 阻害活性の非常に高い physostigmine、第 4 級アンモニウム化合物である

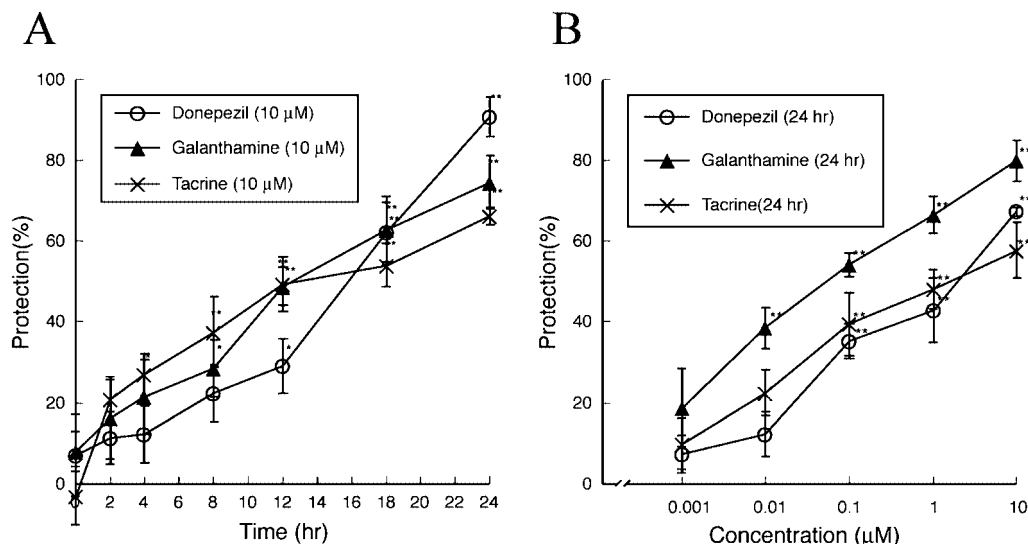


Fig. 2. Time- and Concentration-dependent Neuroprotective Effects of AChE Inhibitors against Glutamate Neurotoxicity  
 A: Cells were incubated for the duration shown with 10 μM AChE inhibitors prior to treatment with 1 mM glutamate for 10 min. B: Cells were pretreated with AChE inhibitors (0.001–10 μM) for 24 hr prior to treatment with 1 mM glutamate for 10 min. \*\**p*<0.01 compared with glutamate alone. Data represent the means ± S.E.M. of *n*=5 independent observations.

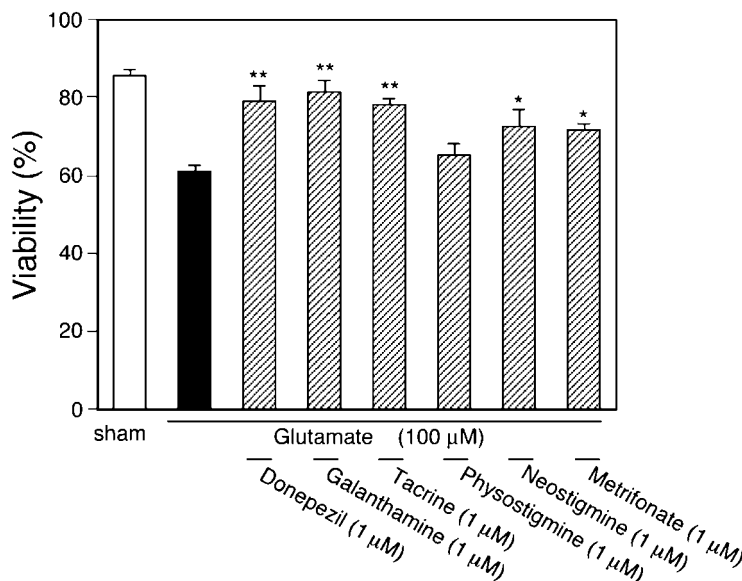


Fig. 3. Effects of Various AChE Inhibitors on Glutamate Neurotoxicity  
 Cells were treated with 1 μM AChE inhibitors for 24 hr prior to treatment with 100 μM glutamate for 24 hr. All AChE inhibitors except physostigmine significantly protected cortical cells against glutamate neurotoxicity. \**p*<0.05, \*\**p*<0.01 compared with glutamate alone. Data represent the means ± S.E.M. of *n*=5 independent observations.

neostigmine, pyridostigmine, 不可逆的 AChE 阻害薬の metrifone の保護作用を比較検討したところ、急性及び慢性のいずれのグルタミン酸処置に対しても physostigmine を除くすべての AChE 阻害薬で神経保護作用が観察され、AChE 阻害活性の値と保護作用の強度の間には相関がみられなかった (Fig. 3). 以上の結果から、ドネペジル、ガランタミン、

タクリンの 3 種の中枢性 AChE 阻害薬の神経保護作用は、AChE 阻害以外の機序によって発現する可能性が考えられる。<sup>20)</sup>

### 5. グルタミン酸神経毒性に対する中枢性 AChE 阻害薬の保護作用機序

そこで、グルタミン酸神経毒性に対する中枢性 AChE 阻害薬による保護作用の機序を明らかにする

ことを目標に解析を続けた。初代培養大脳皮質細胞においてグルタミン酸神経毒性に対してニコチンが、前処置することによってニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) を介して保護作用を発現することが明らかになっている。中枢性 AChE 阻害薬が前処置時間依存的に保護作用を発現したことから、AChE 阻害薬の保護作用へのアセチルコリン受容体 (AChR) の関与の可能性を検討した。nAChR 拮抗薬 mecamylamine (10  $\mu$ M) と中枢性 AChE 阻害薬で 24 時間前処置したあとに急性及び慢性グルタミン酸処置を行ったところ、mecamylamine 処置により AChE 阻害薬の保護作用はいずれも有意に抑制された。一方ムスカリン受容体 (mAChR) 拮抗薬 scopolamine と AChE 阻害薬で前処置した場合、中枢性 AChE 阻害薬の保護作用は影響を受けなかった (Table 2)。したがって、グルタミン酸神経毒性に対する中枢性 AChE 阻害薬の保護作用は nAChR を介していると考えられる。

次に、中枢性 AChE 阻害薬による保護作用が介する nAChR サブタイプの検討を行った。現在知られている 12 個の nAChR サブタイプのうち、脳内で発現している主要なサブタイプは  $\alpha$ 4 及び  $\alpha$ 7-nAChR である。まず、本研究室で用いているラット胎仔由来初代培養大脳皮質細胞における  $\alpha$ 4 及び  $\alpha$ 7-nAChR の主要構成サブユニットの発現を確認したところ、 $\alpha$ 4 及び  $\alpha$ 7-nAChR の構成サブユニットである  $\alpha$ 4 サブユニット及び  $\alpha$ 7 サブユニットのニコチン受容体 mRNA とタンパクが検出された。<sup>21)</sup> さらに、 $\alpha$ 4 及び  $\alpha$ 7-nAChR の特異的拮抗薬である dihydro- $\beta$ -erythroidine (DH $\beta$ E) と methyllycaconitine (MLA) を用いて、中枢性 AChE 阻害薬の神経保護作用におけるこれら神経型 nAChR サ

ブタイプの関与を検討した。DH $\beta$ E 又は MLA と中枢性 AChE 阻害薬で 24 時間前処置したあとに、急性又は慢性グルタミン酸処置を行ったところ、ドネペジル及びガランタミンの保護作用は有意に抑制されたのに対し、タクリンの保護作用は有意には抑制されなかった (Table 2)。以上の結果よりまず、グルタミン酸神経毒性に対する中枢性 AChE 阻害薬の保護作用は nAChR を介していることが示された。さらに、ドネペジル及びガランタミンの保護作用は  $\alpha$ 4 及び  $\alpha$ 7-nAChR を介しているのに対し、タクリンの保護作用については、別の nAChR を介するなど、 $\alpha$ 4 と  $\alpha$ 7-nAChR との関与は少ないことが考えられる。<sup>20,22)</sup>

**5-1. 急性グルタミン酸処置に対する中枢性 AChE 阻害薬の保護作用機序** 既に述べたように、急性及び慢性グルタミン酸処置ではそれぞれネクローシス性及びアポトーシス性の細胞死が誘発されている。そこで、ネクローシス性の神経細胞死、アポトーシス性の神経細胞死のそれぞれについて、中枢性 AChE 阻害薬がどのような機序で保護作用を発現するかについて検討を行った。

ネクローシス性のグルタミン酸神経毒性には N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体を介したカルシウム流入、またそれに引き続いて起こる Nitric Oxide Synthase (NOS)の活性化、Nitric Oxide (NO) の産生が重要な役割を果たしていると考えられている。そこで、中枢性 AChE 阻害薬の保護作用の作用点を明らかにする目的で、NMDA 受容体を介さず細胞内に直接カルシウム流入を引き起こすカルシウムイオノフォアのイオノマイシン、及び NO ドナーの S-ニトロソシステイン (SNOC) によって誘発される神経毒性に対する中枢性 AChE 阻害薬

Table 2. Effects of AChR Antagonists on AChE Inhibitors-induced Neuroprotection against Glutamate Neurotoxicity

		Donepezil (10 $\mu$ M)	Galanthamine (10 $\mu$ M)	Tacrine (10 $\mu$ M)
nAChR antagonist	Mecamylamine	+	+	+
$\alpha$ 4-nAChR antagonist	DH $\beta$ E	+	+	-
$\alpha$ 7-nAChR antagonist	MLA	+	+	-
mAChR antagonist	Scopolamine	-	-	-

Viability of the cells was compared between cortical neuron pretreated with 10  $\mu$ M AChE inhibitors and those pretreated with AChE inhibitors and acetylcholine receptor antagonists (mecamylamine and scopolamine: 10  $\mu$ M, DH $\beta$ E and MLA: 10 nM) prior to glutamate treatment. Viability of the cells was examined by trypan blue staining. #: quite effective (>50% inhibition of neuroprotective effect), +: effective (<50% inhibition), -: not effective.

の作用を検討した.

まず, イオノマイシン (3  $\mu\text{M}$ ) 又は SNOC (300  $\mu\text{M}$ ) の短時間投与により急性グルタミン酸処置と同程度の神経毒性が誘発されることを確認した. さらに, 中枢性 AChE 阻害薬はいずれもイオノマイシン誘発の神経毒性に対して保護作用を示した一方, SNOC 誘発の神経毒性に対してはタクリンのみが保護作用を示した. したがって, ドネペジル及びガランタミンの保護作用の作用点は, カルシウムの流入から NOS の段階にあり, タクリンの保護作用の作用点は NO ラジカル産生以降の段階にあると推定される (Fig. 4).

**5-2. 慢性グルタミン酸処置に対する中枢性 AChE 阻害薬の保護作用機序** 低濃度グルタミン酸慢性処置によって惹起されるアポトーシス性の神経細胞死に対して, ニコチンが  $\alpha 7$ -nAChR を介して保護作用を発現し, その保護作用機序には phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt シグナル経路が関与することが報告されている.<sup>23,24)</sup> グルタミン酸神経毒性に対するニコチンの保護作用が PI3K 経路における各種キナーゼ阻害薬で抑制されるという報告に加え, ニコチン処置により Akt のリン酸化と抗アポトーシスタンパク Bcl-2 の発現量の増加が報告されている (Fig. 5). ドネペジルとガランタミンの保護作用が  $\alpha 7$ -nAChR を介していることから, 中枢性 AChE 阻害薬が保護作用を発現する過程において PI3K-Akt シグナル経路が関与している

可能性を考え, PI3K シグナル経路を構成する各種キナーゼに対する特異的阻害薬を用いて検討を行った. 非受容体型チロシンキナーゼである Janus-Activated Kinase 2 (JAK2) 及び Fyn は,  $\alpha 7$ -nAChR と連関して PI3K を活性化する. そこで, JAK2 及び Fyn の阻害薬 AG490 及び PP2 を用いて検討を行った. 大脳皮質細胞を AG490 又は PP2 と中枢性 AChE 阻害薬で 24 時間前処置した後に慢性グルタミン酸処置を行った結果, ドネペジル及びガランタミンの保護作用は有意に抑制されたが, タクリンの保護作用は影響を受けなかった. 次に, PI3K の関与を検討するため, PI3K 阻害薬 LY294002 の中枢性 AChE 阻害薬に対する影響を調べたところ, ドネペジル及びガランタミンの保護作用は有意に抑制されたのに対し, タクリンの保護作用は影響を受けなかった. さらに, MAPK 経路への関与についても検討するため, MAPKK 阻害薬 PD98059 の中枢性 AChE 阻害薬に対する影響を調べた結果, ドネペジル, ガランタミン, タクリンの保護作用はいずれも影響を受けなかった. これらの各種キナーゼ阻害薬を用いた実験結果より, ドネペジル及びガランタミンの保護作用は PI3K シグナル経路を介して発現することが示唆された. また, PI3K シグナル経路は, タクリンの保護作用においては中心的な役割を果たしていないと考えられる (Table 3).

PI3K シグナル伝達経路における中枢性 AChE 阻害薬の関与をさらに検討するため, 中枢性 AChE

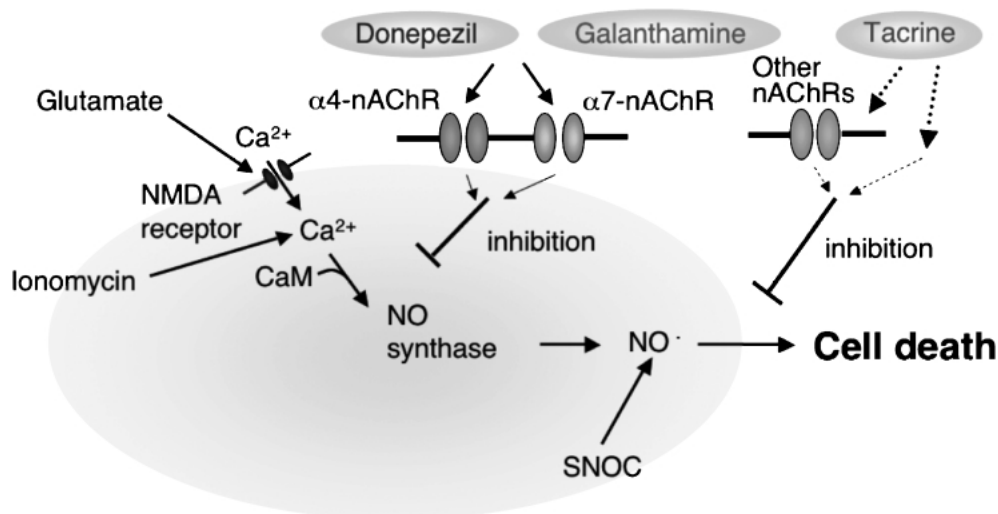


Fig. 4. A Schematic Model of the Neuroprotective Mechanism by AChE Inhibitors against Treatment with 1 mM Glutamate for 10 min

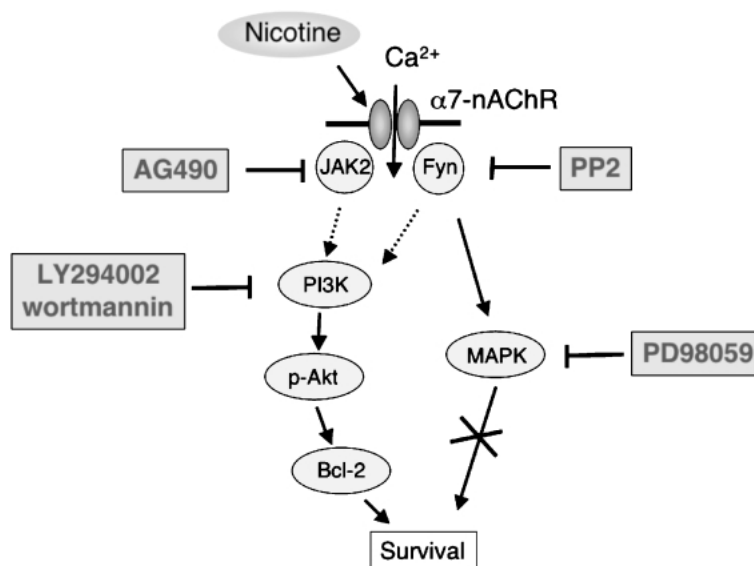


Fig. 5. A Schematic Model of the Mechanism of Neuroprotection Induced by Nicotinic Stimulation of  $\alpha 7$ -nAChR

Table 3. Effects of PI3K Inhibitors on AChE Inhibitors-induced Neuroprotection against Glutamate-induced Apoptosis

		Donepezil (10 $\mu$ M)	Galanthamine (10 $\mu$ M)	Tacrine (10 $\mu$ M)
Non-receptor tyrosine kinase inhibitor				
Fyn inhibitor	PP2	+	+	-
JAK2 inhibitor	AG490	+	+	-
PI3K inhibitor	LY294002	+	+	-
MAPKK inhibitor	PD98059	-	-	-

Viability of the cells was compared between cortical neuron pretreated with 10  $\mu$ M AChE inhibitors and those pretreated with AChE inhibitors and PI3K inhibitors (PP2, AG490 and LY294002: 10  $\mu$ M, PD98059: 50  $\mu$ M) prior to treatment with 100  $\mu$ M glutamate for 24 hr. Neurotoxicity induced by glutamate was examined by trypan blue staining. + : effective, - : not effective.

阻害薬で処置した大脳皮質細胞における Akt のリン酸化及び Bcl-2 発現量の変化を調べた。Akt は活性化型 PI3K によって細胞膜付近にリクルートされ、そこでリン酸化により活性化され、アポトーシス制御因子である Bcl-2 ファミリーのタンパク質や種々のカスパーゼを活性化し、アポトーシスを抑制することが知られている。中枢性 AChE 阻害薬で 1 時間処置した大脳皮質細胞における Akt のリン酸化をウェスタンブロット法により観察したところ、Akt の総量に変化はみられなかったものの、ドネペジル及びガランタミンで処置した細胞ではリン酸化 Akt の量に顕著な増加がみられた。一方、タクリンで処置した細胞では発現量の変化は観察されなかった。同様に、中枢性 AChE 阻害薬で 24 時間処置した大脳皮質細胞における Bcl-2 の発現量の変化を観

察したところ、ドネペジルとガランタミン処置により Bcl-2 発現量の増加がみられた一方、タクリン処置では変化は観察されなかった。<sup>22)</sup> 以上の結果を統合すると、慢性グルタミン酸処置に対する中枢性 AChE 阻害薬の保護作用は、 $\alpha 7$ -nAChR から JAK2 や Fyn などを介した PI3K の活性化につながり、リン酸化 Akt を活性化させることにより、Bcl-2 発現量の増加などのアポトーシス抑制プログラムを開始させることによって発現することが推測される<sup>22)</sup> (Fig. 6).

## 6. おわりに

本稿では、アルツハイマー病治療薬として現在認可されている 3 種の AChE 阻害薬、ドネペジル、ガランタミン、タクリンのグルタミン酸神経毒性に対する作用とその保護作用機序を述べた。まず、筆



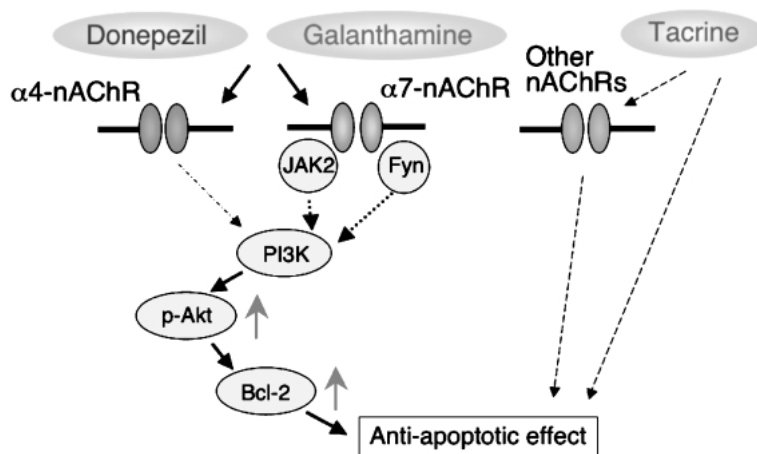


Fig. 6. A Schematic Model of the Neuroprotective Mechanism of AChE Inhibitors against Treatment with 100  $\mu$ M Glutamate for 24 hr

者らが用いたラット胎仔由来初代培養大脳皮質細胞は、急性及び慢性グルタミン酸処置によってそれぞれネクロシス性及びアポトーシス性の細胞死を惹起し、中枢性 AChE 阻害薬がこれらの両神経毒性に対して保護作用を発現することを示した。次に、中枢性 AChE 阻害薬がグルタミン酸との同時処置では保護作用を示さず、前処置時間及び濃度依存的に保護作用を発現することを示した。これは中枢性 AChE 阻害薬が AChE 阻害以外の作用機序によって保護作用を発現していることを強く示唆するものである。さらに、中枢性 AChE 阻害薬の保護作用が nAChR を介していること、特にドネペジルとガラタミンの保護作用が  $\alpha$ 4-,  $\alpha$ 7-nAChR を介していることを示した。最後に、急性及び慢性グルタミン酸処置に対する保護作用機序を解析し、高濃度短時間の急性グルタミン酸処置に対してはドネペジルとガラタミンがカルシウムの流入から NO 産生までの過程、タクリンが NO 産生以降の過程で保護作用を発現することを示した。低濃度長時間の慢性グルタミン酸処置に対する保護作用については、ドネペジル及びガラタミンの保護作用が PI3K-Akt 経路を介することを示した。本研究は、中枢性 AChE 阻害薬がグルタミン酸神経毒性に対して保護作用を発現することを示し、さらにその機序を明らかにしたことで、既存のアルツハイマー病治療薬の神経保護作用メカニズムを明らかにするとともに、神経細胞死を標的とした新規アルツハイマー病治療戦略の確立に大きく資するものであるといえる。最近、長期間の中枢性 AChE 阻害薬処置 (10  $\mu$ M, 4

日間) した大脳皮質細胞において、nAChR 発現量が増加し、この処置によりドネペジル、ガラタミンが 10 nM という低濃度から保護作用を示すことを報告した。<sup>21)</sup> 今後、長期間の中枢性 AChE 阻害薬処置による神経保護作用の感受性の上昇に関しても詳細に検討し、このような条件下でのさらなる保護作用機序を解明することも必要であると考えられる。

**謝辞** 本研究を遂行するにあたり、終始懇切な御指導と御鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科・赤池昭紀教授に謹んで感謝の意を表します。また、直接御指導を賜り、多くの有益な御助言を頂きました久米利明助手に心から感謝の意を表します。さらに本研究をまとめるにあたり、多くの有益な御助言を頂いた京都大学大学院薬学研究科・杉本八郎教授並びに木原武士講師に心から感謝の意を表します。また、終始有益な御助言を頂きました京都大学大学院薬学研究科・金子周司教授、香月博志助教授、新留徹広助教授、中川貴之助教授、京都大学大学院医学研究科・下濱 俊助教授並びに現安田女子大学・佐藤公道教授、現北海道大学大学院薬学研究院・南 雅文教授に深く感謝致します。さらに、共同研究者として本研究に御協力頂きました米澤 淳修士、杉本充弘修士をはじめとする京都大学大学院薬学研究科薬品作用解析学分野、創薬神経科学分野、生体機能解析学分野、医療薬理学分野の教室員一同に深く感謝致します。最後に、本研究の遂行に際し、ドネペジルを提供して頂きましたエーザイツくば研究所に御礼申し上げます。

## REFERENCES

- 1) Whitehouse P. J., Price D. L., Struble R. G., *Science*, **215**, 1237–1239 (1982).
- 2) Perry E. K., Morris C. M., Court J. A., Cheng A., Fairbairn A. F., McKeith I. G., Irving D., Brown A., Perry R. H., *Neuroscience*, **64**, 385–395 (1995).
- 3) Bartus R. T., Dean III R. L., Beer B., Lippa A. S., *Science*, **217**, 408–414 (1982).
- 4) Coyle J. T., Price D. L., DeLong M. R., *Science*, **219**, 1184–1190 (1983).
- 5) Kosasa T., Yamanishi Y., Ogura H., Yamatsu K., *Eur. J. Pharmacol.*, **183**, Abst: 1936 (1990).
- 6) Bresnick G. H., *Arch. Ophthalmol.*, **107**, 339–341 (1989).
- 7) Choi D. W., Maulucci-Gedde M., Kriegstein A., *J. Neurosci.*, **7**, 357–368 (1987).
- 8) Koh J. Y., Yang L. L., Cotman C. W., *Brain Res.*, **553**, 315–320 (1990).
- 9) Le W. D., Colom L. V., Xie W. J., Smith R. G., Alexianu M., Appel S. H., *Brain Res.*, **686**, 49–60 (1995).
- 10) Pearson R. C., Esiri M. M., Hiorns R. W., Wilcock G. K., Powell T. P., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, 4531–4534 (1985).
- 11) Fransis R. T., Sims N. R., Procter A. W., Bowen D. M., *J. Neurochem.*, **60**, 1589–1604 (1993).
- 12) Mattson M. P., *Natl. Rev. Mol. Cell Biol.*, **1**, 120–129 (2000).
- 13) Kerr J. F., Harmon B. V., *Curr. Commun. Cell Mol. Biol.*, **3**, 5–29 (1991).
- 14) Schwartz L. M., Smith S. W., Jones M. E., Osborne B. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 980–984 (1993).
- 15) Kerr J. F., Wyllie A. H., Currie A. R., *Br. J. Cancer*, **26**, 239–257 (1972).
- 16) Bursch W., Oberhammer F., Schulte-Harman R., *Trends Pharmacol. Sci.*, **13**, 245–251 (1992).
- 17) Bonfoco E., Krainc D., Ankarcona M., Nicotera P., Lipton S. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 7162–7166 (1995).
- 18) Leist M., Volbracht C., Kuhnle S., Fava E., Ferrando-May E., Nicotera P., *Mol. Med.*, **3**, 750–764 (1997).
- 19) Almeida A., Heales S. J., Bolanos J. P., Medina J. M., *Brain Res.*, **790**, 209–216 (1998).
- 20) Takada-Takatori Y., Kume T., Sugimoto M., Katsuki H., Sugimoto H., Akaike A., *Neuropharmacology* (in press).
- 21) Kume T., Sugimoto M., Takada Y., Yamaguchi T., Yonezawa A., Katsuki H., Sugimoto H., Akaike A., *Eur. J. Pharmacol.*, **527**, 77–85 (2005).
- 22) Takada Y., Yonezawa A., Kume T., Katsuki H., Kaneko S., Sugimoto H., Akaike A., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **306**, 772–777 (2003).
- 23) Kihara T., Shimohama S., Sawada H., Honda K., Nakamizo T., Shibasaki H., Kume T., Akaike A., *J. Biol. Chem.*, **276**, 13541–13546 (2001).
- 24) Shaw S., Bencherif M., Marrero M. B., *J. Biol. Chem.*, **277**, 44920–44924 (2002).