

## 脳血管性痴呆症の治療薬としての Ca 拮抗薬の可能性について

岩崎 克典、三島健一、江頭伸昭、藤原 道弘

福岡大学薬学部臨床疾患薬理学教室 814-0180 福岡市城南区七隈 8-19-1

Effects of various Ca channel blockers on the spatial memory disturbances induced by repeated cerebral ischemia in rats

Katsunroi Iwasaki, Kenichi Mishima, Nobuaki Egashira, Michihiro Fujiwara

Dementia and memory impairment, including the type caused by cerebrovascular disease, are important clinical conditions which are still waiting for successful remedy.

We investigated the effects of L-type voltage-dependent calcium channel (VDCC) blockers, nilvadipine and amlodipine, on the cerebral ischemia-induced impairment of spatial memory in 8-arm radial maze performance in rats. Neither nilvadipine (3.2 mg/kg, i.p.) nor amlodipine (3.2 mg/kg, i.p.) improved the single ischemia-induced impairment of spatial memory. However, nilvadipine significantly improved the repeated ischemia (10 min ischemia x 2, 1 h interval)-induced impairment of spatial memory, while amlodipine did not. Repeated cerebral ischemia not only impaired spatial memory, but also induced hippocampal apoptosis 7 days after the final occlusion. Furthermore, it also increased the expression of apoptosis-related early oncogene bax-, bad-, and cyp32-mRNA. Nilvadipine, but not amlodipine, suppressed both hippocampal apoptosis and cyp32 expression. These results suggest that central acting Ca antagonist like nilvadipine improved the disturbance in memory by suppressing the induction of apoptosis in the hippocampus and that it may be useful as a nootropic drug for cerebrovascular dementia.

はじめに

中枢神経機能を司っている脳の神経細胞は、血流障害によるエネルギー供給や酸素供給不足に対しては極めて脆弱で、脳梗塞などにより血流が障害されると、たちまち細胞内に一過性のカルシウムイオン ( $[Ca^{2+}]_i$ ) 流入が起こり、数段階のカスケード反応を経て神経細胞死に陥ることが知られている。この障害が海馬や大脳皮質などの学習・記憶に深く係わる脳部位をその責任領域とする血管で生じると、脳血管性痴呆症という重篤な事態に発展する。脳虚血による神経細胞死には、障害と同時に発現し急速に細胞を死に至らしめるネクローシスと遅発性で神経細胞の DNA が開裂することにより細胞としての機能を維持できなくなるアポトーシスと呼

ばれる2つのタイプがある。脳血管性痴呆症に係わるのは後者と言われている。最近、アポトーシスの発現に細胞内カルシウム (Ca) 動態が深く係わる事実が次々と明らかになり、細胞内Caのコントロールこそが細胞死から神経を守る最高の手段と考えられるようになった。そうなれば細胞内へCaが流入する入り口であるCaチャンネルを閉じる手段、すなわちCa拮抗薬が奏効する可能性がでてくる。もともとCa拮抗薬は、血管平滑筋細胞のCaチャンネルを阻害してCa<sup>2+</sup>の細胞内流入を阻止することにより血管を弛緩することから高血圧症における降圧薬として開発されたものだが、ジヒドロピリジン系のCa拮抗薬の一部はこれに加えて脳血管の拡張作用を有することが明らかになり、脳循環改善薬としても応用可能になった<sup>1)</sup>。さらに、このようなCa拮抗薬が、実際に脳内に入って神経細胞のCaチャンネルに作用してアポトーシスを抑制し、学習・記憶障害を改善することになれば、脳血管障害のみならず脳血管性痴呆症をも改善することができ、この領域での夢の薬物になる可能性もある。また、最近では細胞内Caが意識障害やアルツハイマー病にも深く係わることが指摘されており、この機序が解明されれば、Ca拮抗薬のさらなる適用が広がってくる。本稿ではCa拮抗薬の脳血管性痴呆症に対する改善作用の可能性について述べることにする。

#### 1. 繰り返し脳虚血法を用いた学習障害の誘発

動物を用いて人工的に脳血流を止めるためには、その供給路である椎骨動脈と総頸動脈を両側で計4本結紮しなければならない。これに関して筆者らが行っている方法を簡単に紹介すると、ハロタン麻酔下で、①椎骨動脈を電気焼灼切断し、②続いてラットを背位に固定し両側総頸動脈を露出し水圧式オクルーダーを装着する。③翌日、麻酔より完全に覚醒し行動上異常がないことを確認した後、無麻酔下で水圧式オクルーダーに水を満たしたシリンジを介して遠隔操作により総頸動脈を一定時間一定間隔で圧迫止血する (図1の右図)。

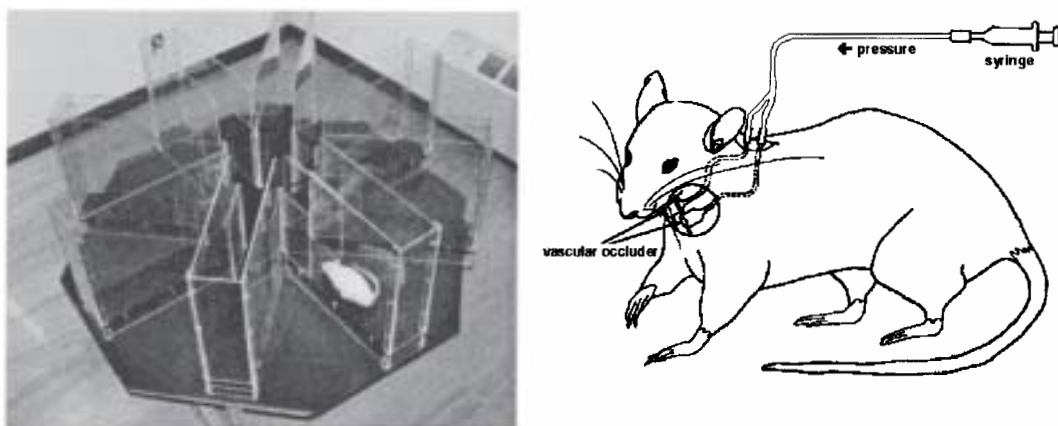


図1 高架式8方向放射状迷路装置 (左) と、椎骨動脈を電気焼灼した後、総計動脈に水圧式オクルーダーを装着したラットの模式図 (右)。シリンジからの水圧で両側総計動脈を遠隔操作で閉塞することができる。

行動実験を行う際は、まず、食餌制限をしたラットを用いて図1の左図のような8方向放射状迷路装置内で餌取りの訓練を行い、アーム先端の8個の餌を、一度進入したアームに入ることなく8回の選択で摂取できるようにする。これが出来るようになるということは、ラットの脳内に位置関係などの認知地図ができたものと考えられる<sup>2)</sup>。このラットを用いて、前述の方法で3～10分間の脳虚血処置を1時間の間隔で2回あるいは3回行うと、特に10分間虚血群で虚血処置の7日後に著明な空間記憶障害が発現した(図2)。ところで、脳虚血による行動実験の際に留意しなければならないことに片麻痺による歩行障害がある。脳の組織学的研究を行う場合は全く問題にならないが、行動を見る場合にはこれにより試行の遂行そのものが出来ないという事態に陥り行動研究は長い間進展できなかつた。しかし、これを短時間の脳虚血処置を一定の間隔を置いて繰り返すことにより、片麻痺が出現しない状態で、海馬などのいわゆる脆弱細胞に単回脳虚血よりさらに強い虚血侵襲を得ることができた

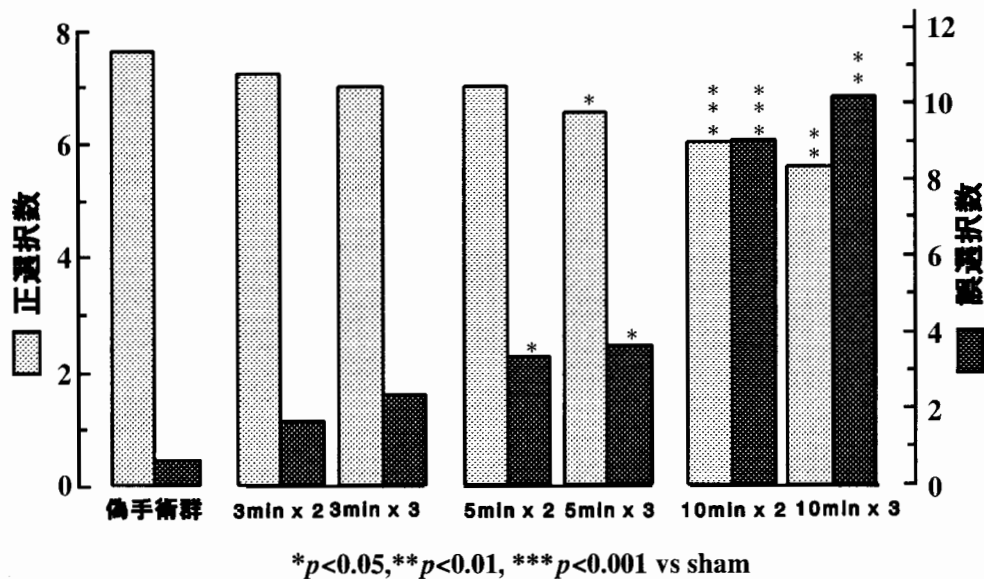


図2 8方向放射状迷路課題を用いた、短時間の繰り返し脳虚血による空間記憶障害の発現。それぞれの処置7日後の再生試行時の成績

## 2. 繰り返し脳虚血によるアポトーシスの発現

痴呆症状を呈するような重度の脳血管障害を考える場合、アポトーシスによる脳の神経脱落は無視できない。筆者らが考案した動物モデルでもこのような現象が生じているかを調べる必要があった。そこで、繰り返し脳虚血処置を行い行動観察を行った後に脳を摘出して脳の神経細胞死を観察してみると、海馬のCA1領域の神経細胞数の著明な減少がみられた。さらに、DNAの断片化を検出するTUNEL染色法を用いて詳細を探ると、それがアポトーシスであることが明らかになった(図3)。これを経時的に調べると、このアポトーシスは血流再開6時間ごろから始まり、その後も徐々に進行していくことが分かった。

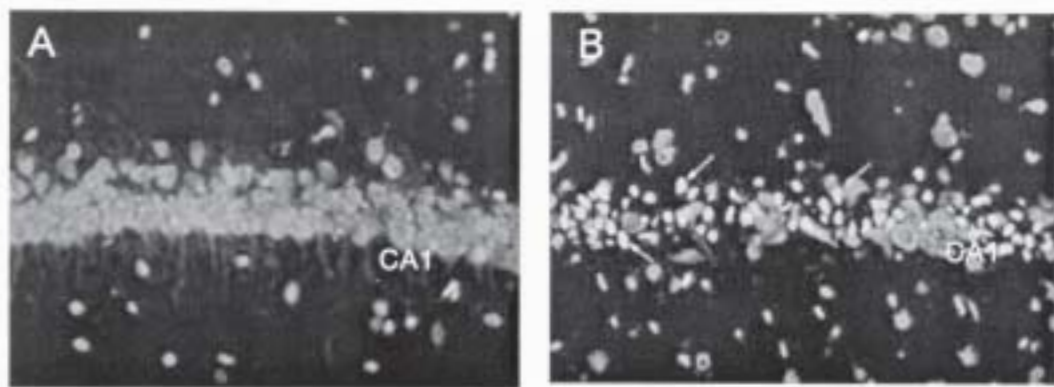


図3 繰り返し脳虚血（10分×2回）による海馬CA1領域のアポトーシスの発現。  
A：偽手術群、B：繰り返し脳虚血群

### 3. アポトーシス関連早期遺伝子の発現

脳虚血による神経細胞死は、一般的に神経膜上に存在するグルタミン酸受容体のサブタイプである NMDA 受容体を介して  $\text{Ca}^{2+}$  が細胞内に流れ込むことにより、細胞内で Ca 依存的なカスケード反応が起こり、最終的に細胞死に至ることが知られている<sup>3)</sup>。しかし、これは脳虚血の極めて初期に起こる現象であり、遅発性神経細胞死を説明するには若干無理があった。筆者らは繰り返し脳虚血の7日後に見られる空間記憶障害やアポトーシスが NMDA 受容体の拮抗薬である MK-801 よりも、同じくサブタイプの1つである AMPA 受容体の拮抗薬である YM-90K によって強く抑制されることから、AMPA 受容体が遅発性のアポトーシスに深く係わることを突き止め、虚血侵襲により AMPA 受容体を構成するユニットがコンフォメーション変化を生じて  $\text{Ca}^{2+}$  を通過させるようになることを示唆した<sup>4)</sup>。AMPA 受容体は、もともと  $\text{Na}^+$  を細胞内に流入させるチャンネルに共役することはよく知られ、これによる脱分極が引き続いて膜電位依存性の L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルを開口すると考えられる。こうして細胞内に流入してきた  $\text{Ca}^{2+}$  がある種の早期遺伝子に働きかけアポトーシスの引き金になるのではないかと考えることができる。筆者らの実験でも、繰り返し脳虚血によりアポトーシス促進系のシステインプロテアーゼである cpp32 の mRNA の発現が増加することを見いだしており<sup>5)</sup>、これが遅発性のアポトーシスを引き起こしたと考えた。このようなことから、少なくとも脳虚血による神経細胞内への Ca 流入を防ぐことができれば、細胞死から神経細胞を守ることは可能ではないだろうか。

### 4. 繰り返し脳虚血による学習障害に対する Ca 拮抗薬の作用

Ca 拮抗薬は高血圧症を始めとする循環障害治療の第一選択薬として繁用されているが、最近では、脳卒中の治療にも Ca 拮抗薬が用いられるようになった。筆者らはニモジピン、ニルバジピンおよびアムロジピンを用い、繰り返し脳虚血による空間記憶障害に及ぼす影響を調べた。

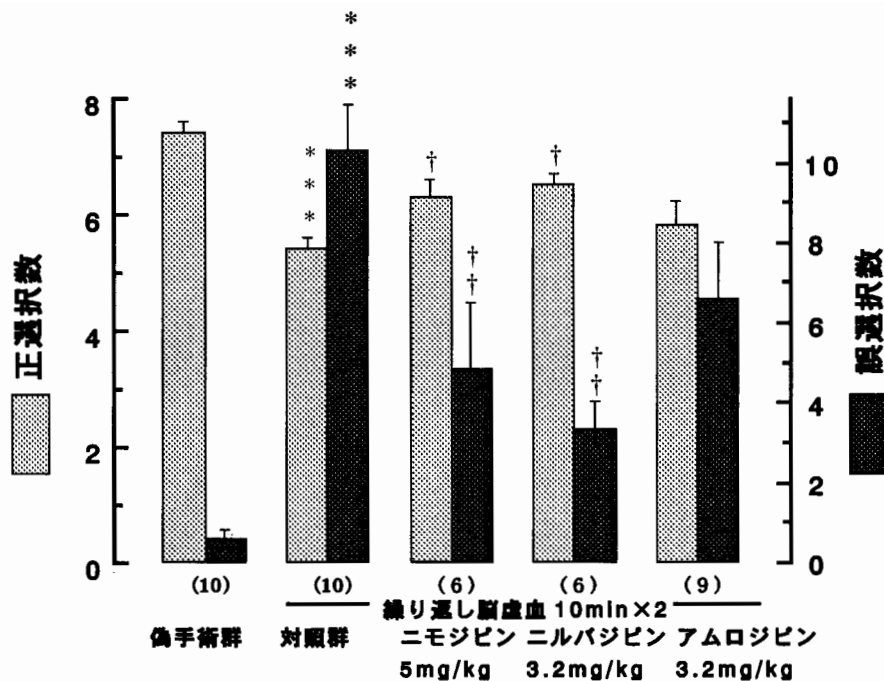


図4 繰り返し脳虚血による空間記憶障害に及ぼす各種 Ca 拮抗薬の作用

その結果、ニルバジピンおよびニモジピンの虚血処置直後投与（2回の虚血のそれぞれ直後投与）により空間認知障害の改善作用が認められ、その作用はニルバジピンが最も強いことを明らかにした。またアムロジピンには改善作用は認められなかった（図4）。ニルバジピンはその中枢移行性が高いことから高血圧症の治療効果に加えて脳血管障害に対する効果が期待されている薬物であり、自然発症高血圧ラットを用いた実験でも、中大脳動脈(MCA)閉塞による梗塞巣がニルバジピン投与により縮小することが明らかにされ<sup>7)</sup>、脳血管性痴呆症への応用も不可能ではないと考えられた。また、ニルバジピンは繰り返し脳虚血による海馬 CA1 領域のアポトーシスも抑制すること（図5）、また、海馬の部位でアポトーシスの発現に共役して発現する cyp32mRNA の発現をも抑制することも明らかになり、Ca 拮抗薬の脳血管性痴呆症への適応拡大の可能性が出てきた<sup>6)</sup>。

#### 5. アルツハイマー病動物モデルの空間記憶障害に対する Ca 拮抗薬の作用

ヨーロッパで1988～97年に Syst-Eur (Systolic Hypertension in Europe) 研究として Ca 拮抗薬（この場合はニトレンジピン）の脳血管性痴呆症に対する効果が広範囲に調べられたが、実際には脳血管性痴呆のみならず、アルツハイマー型の痴呆が抑えられたという報告がある<sup>8)</sup>。その機序として Ca チャネル阻害による神経保護作用や Ca ホメオスタシスを保つことによる炎症メディエーターや過酸化物質による細胞毒に対する抵抗性の増強、脳血流改善などが推定されている。筆者らはラットを用いて次のような実験を行ってみた。アルツハイマー病は閉経後の更年期女性に発症率が高いこと、アルツハイマー病の3大病理所見（老人斑、神経原線維変

化、神経脱落)のうち老人斑の構成成分である $\beta$ -アミロイドに神経毒性があることなどに着目し、あらかじめ雌ラットの卵巣を摘出し、血中のエストロゲン濃度を低下させた上で、脳室内に $\beta$ -アミロイドの1-42断片を1週間にわたって微量注入してみた。その結果、8方向放射状迷路課題において著明な空間記憶障害が発現することを見いだした。このことから、卵巣摘出と $\beta$ -アミロイドモデルは、アルツハイマー病の、特に更年期型の動物モデルとして利用できる可能性が出てきた。このモデルを用いていくつかの薬物を試してみたところ、古くから女性の末梢循環障害に用いられてきた当帰芍薬散という漢方方剤に加えて、Ca拮抗薬のニルバジピンが改善効果を有することが分かった(図6)。更年期女性は末梢循環障害に加えて脳循環障害を伴うことが多く、ニルバジピンが脳血流の改善により作用した可能性はあるものの、アルツハイマー病の痴呆症状に適用できる可能性は大きくなった。

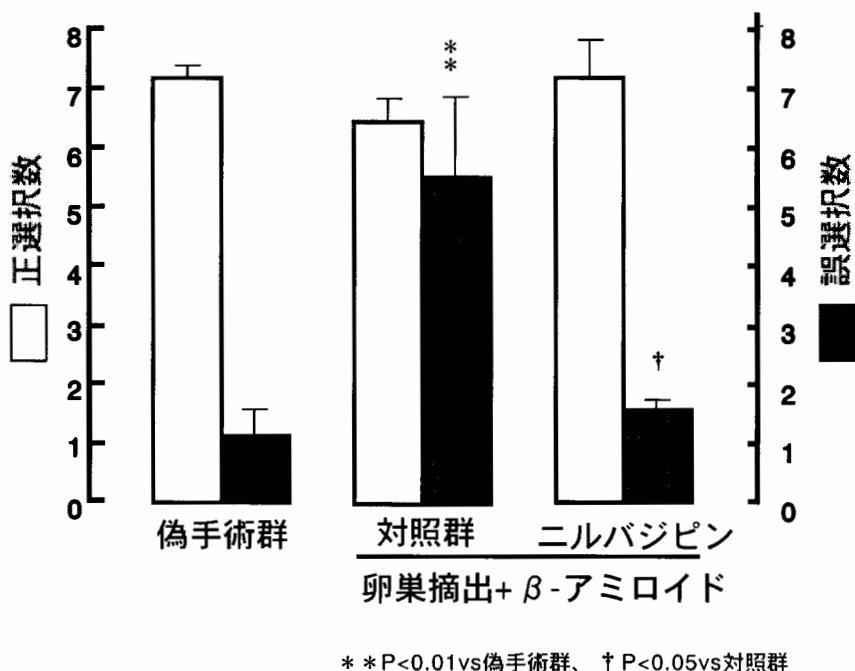


図6 卵巣摘出ラットの脳室内に $\beta$ -アミロイドを連続微量注入して発現する空間記憶障害に及ぼすニルバジピン(3.2mg/kg, i. p.)の作用

おわりに

脳血管性痴呆症にしてもアルツハイマー病による痴呆にしても、临床上は、記憶障害や認知障害など痴呆の中核症状を改善させることは困難を極めてるのが現状である。前臨床試験としての動物実験の成果が必ずしもそのまま治療効果に繋がるとは限らないが、痴呆の発症機序を探り、薬物の作用点・作用機序を明らかにするという点では大きな意味を持つ。特に、治療法が確立していない痴呆症に関しては、これがきっかけとなり治療薬の開発が進む場合が多い。Ca拮抗薬も、脳血管性痴呆症のリスクファクターの1つである高血圧症の治療という面では、

脳血管障害の発症・悪化を防ぐ重要な役割を担っているのは言うまでもないが、ニルバジピンのような Ca 拮抗薬が実際に脳の中に入って直接神経細胞に働きかけ、神経細胞死からの保護作用や精神症状の改善作用、さらには痴呆症状の軽減作用を発揮するということになれば、薬としては一石二鳥と考えることもできる。脳の神経細胞内の情報伝達系には Ca はなくてはならない存在であることは周知であり、Ca 動態の如何によって様々な病態が発現してくる。そういう意味でも、脳で働く Ca 拮抗薬は今後に大きな期待がもたれるところである。

## 文 献

- 1)Staessen, J.A., Wang,J.G., Thijs,L. : Cardiovascular protection and blood pressure reduction : a meta-analysis. *Lancet*, 358:1305-1315,2001
- 2)Chung, E-h., Iwasaki,K., Mishima,K. et al. : Repeated cerebral ischemia induced hippocampal cell death and impairments of spatial cognition in rats. *Life Sci.*, 72:609-619, 2002
- 3) Kirino, T. : Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res.* , 239: 57-69,1982
- 4)Iwasaki,K., Chung,E-h., Egashira,N. et al. : Non-NMDA mechanism in the inhibition of cellular apoptosis and memory impairment induced by repeated cerebral ischemia in rats. *Brain Res.*, 995:131-139, 2003
- 5) Irie,K., Mishima,K., Ishibashi,D. et al. : Involvement of bcl-family expression in the spatial memory impairment induced by repeated ischemia. *Life Sci.*, 72:621-629,2002
- 6)Iwasaki,K., Mishima,K., Egashira,N. et al. : Effect of nilvadipine on the cerebral ischemia-induced impairment of spatial memory and hippocampal apoptosis in rats. *JPharmacol.Sci.*, 93:188-196,2003
- 7) Kawamura,S., Shirakusa,M., Fukasawa,H. et al. : Attenuated neuropathology by nilvadipine after middle cerebral artery occlusion. *Stroke*, 22:51-55, 1991
- 8) Forette,F., Seux,M.-L., Staessen,J.A. et al. : Prevention of dementia in randomized double-blind placebo-controlled Systolic Hypertension in Europe (Syst-Eur) trial. *Lancet*, 352: 1347-1351, 1998