

bFGF 様作用を有する化合物の薬理効果とその作用メカニズム

2015年

村山 宣人

本論文は、以下の論文の内容を総括したものである。なお、報文内容の転載許可は、各出版社から取得済みである。

- 1) **Norihito Murayama**, Taisuke Kadoshima, Naohiro Takemoto, Shiho Kodama, Tetsuya Toba, Ryoko Ogino, Takafumi Noshita, Tetsushi Oka, Shinya Ueno, Mariko Kuroda, Yoshiari Shimmyo, Yasuhiro Morita and Teruyoshi Inoue. SUN11602, a novel aniline compound, mimics the neuroprotective mechanisms of basic fibroblast growth factor. ACS Chem Neurosci. 4: 266-276 (2013) [第 1, 2 章]
- 2) Ryoko Ogino*, **Norihito Murayama***, Takafumi Noshita, Naohiro Takemoto, Tetsuya Toba, Tetsushi Oka, Nobuhiro Narii, Sayaka Yoshida, Nobuhiro Ueno, Teruyoshi Inoue (*These authors contributed equally to this work). SUN11602 has basic fibroblast growth factor-like activity and attenuates neuronal damage and cognitive deficits in a rat model of Alzheimer's disease induced by amyloid β and excitatory amino acids. Brain Res. 1585: 159-166 (2014) [第 1, 3 章]
- 3) **Norihito Murayama**, Takafumi Noshita, Ryoko Ogino, Toyofumi Masuda, Taisuke Kadoshima, Tetsushi Oka, Nobuhiro Ueno, Naohiro Takemoto, Tetsuya Toba, Shinya Ueno, Wiebke Schulze, Yoshiyuki Igawa, Yasuhiro Morita, and Teruyoshi Inoue. SUN11602-induced hyperexpression of Calbindin D-28k is pivotal for the survival of hippocampal neurons under neurotoxic conditions. Brain Res. 1594: 71-81 (2015) [第 1, 2, 3 章]

目次

緒言	1
第1章 bFGF 様低分子化合物 SUN11602 の <i>in vitro</i> 薬理作用	2
第1節 緒言	2
(1) 塩基性線維芽細胞成長因子 (basic fibroblast growth factor : bFGF) とは	2
(2) bFGF の神経変性疾患への関与	2
(3) SUN11602	3
第2節 実験材料及び方法	4
(1) 細胞調製	4
(2) 化合物	4
(3) グルタミン酸誘発神経細胞傷害評価	4
(4) 神経軸索・突起伸長作用評価	5
(5) 細胞増殖作用評価	5
(6) 統計学的解析	5
第3節 実験結果	6
第1項 神経細胞保護作用	6
(1) グルタミン酸誘発初代培養神経細胞傷害に対する SUN11602 の保護作用	6
(2) タンパク質合成阻害剤による保護作用拮抗試験	7
第2項 神経軸索・突起伸長作用	7
(1) 初代培養神経細胞における SUN11602 の神経軸索・突起伸長作用	7
第3項 細胞増殖作用	9
(1) 細胞増殖作用に対する SUN11602 の効果	9
第4節 考察	10
第5節 小括	12
第2章 SUN11602 の作用メカニズム解析	13
第1節 緒言	13
(1) FGF 受容体のシグナル伝達様式	13
(2) 神経細胞保護タンパク質 (CalbindinD28k) の役割	13
第2節 実験材料及び方法	14
(1) 各種阻害剤による神経細胞保護作用拮抗試験	14

(2) FGF 受容体結合試験	14
(3) Western Blot／mRNA 解析と免疫組織学的検討	14
(4) 細胞内 Ca^{2+} 測定	15
第3節 実験結果	16
(1) FGF 受容体に対する作用	16
(2) FGF 受容体下流シグナルに対する作用	19
(3) CalbindinD28k 産生亢進作用	21
(4) CalbindinD28k knockout マウスでの神経保護作用メカニズム解析	21
第4節 考察	24
第5節 小括	26
第3章 SUN11602 の <i>in vivo</i> 薬理作用	27
第1節 緒言	27
(1) ラット神経傷害モデル概要	27
第2節 実験材料及び方法	29
(1) 凝集 $\text{A}\beta_{1-40}$ + イボテン酸海馬内注入モデル及び薬物投与	29
(2) 海馬領域神経細胞傷害評価	29
(3) Y 迷路学習試験	30
(4) モリス水迷路学習試験	30
(5) 統計学的解析	30
第3節 実験結果	31
(1) ラット神経傷害モデル構築	31
(2) ラット神経傷害モデルに対する SUN11602 の学習機能低下抑制作用	31
(3) ラット神経傷害モデルに対する SUN11602 の神経細胞保護作用	33
(4) CalbindinD28k KO マウス傷害モデルでの SUN11602 の保護作用	34
第4節 考察	36
第5節 小括	38
総括	39
謝辞	40
引用文献	41

なお、本文中及び図表中で用いた略号は以下のとおりである。

AD:	alzheimer's disease
BBB:	blood brain barrier
BDNF:	brain-derived neurotrophic factor
bFGF:	basic fibroblast growth factor
BHK21:	baby hamster kidney cells
BrdU:	5-bromo-2'-deoxyuridine
CalB:	calbindinD28k
CBF:	cerebral blood flow
DMSO:	dimethyl sulfoxide
DNA:	deoxyribonucleic acid
ELISA:	enzyme-linked immunosorbent assay
FBS:	fetal bovine serum
FGFR:	fibroblast growth factor receptor
GAPDH:	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
HBSS:	Hank's Balanced Salt Solution
LSGS:	low serum growth supplement
LTP:	long-term potentiation
NSL:	nuclear localization signal
PBS:	phosphate buffered saline
PF4:	platelet factor 4
PTBBS:	peripheral-type benzodiazepine-binding sites
SKN:	human uterine leiomyosarcoma
Tyr:	tyrosine

緒言

線維芽細胞成長因子 (fibroblast growth factor) は、線維芽細胞をはじめとする様々な細胞に作用し、形態形成、組織修復、再生、及び生体の恒常性を維持するための代謝調節に働く、多機能性の分泌タンパク質である^{1,4)}。現在、哺乳類で確認されている FGF ファミリーは 23 種類あり、この中で塩基性線維芽細胞成長因子 (basic FGF ; FGF-2、以下 bFGF と略す) は細胞増殖、血管新生亢進、神経細胞保護、神経軸索・突起伸長、及び神経幹細胞分化誘導等の作用 (生理活性) が強く、創傷治療薬として医薬品となっている⁵⁾。

近年、神経幹細胞の移植により失われた神経細胞の機能を回復する試みが盛んに行われているが、移植した神経幹細胞が生着し、神経細胞に分化し機能することより、移植された神経幹細胞が brain-derived neurotrophic factor (BDNF) 及び bFGF 等の神経栄養因子を分泌することが重要であることが報告されている⁶⁾。また、神経機能改善を目指すリハビリテーションにおいても、リハビリにより分泌される神経栄養因子の重要性が報告されている^{7,8)}。このように神経栄養因子の代表格である bFGF は神経変性疾患の治療薬に望まれる薬理プロファイルである神経分化作用 (神経細胞保護作用、神経軸索・突起伸長作用、神経幹細胞分化誘導作用等) を有する。しかしながら、bFGF は高分子タンパク質であるために血液-脳関門 (blood brain barrier : BBB) 透過性に限界があること、血圧低下作用による脳血流量 (cerebral blood flow : CBF) 低下につながる作用を有すること、細胞増殖作用に起因する炎症反応の亢進や腫瘍増殖等の懸念があること等、中枢神経系に作用させるには重大な欠点がある。したがって、これらの欠点を排した bFGF 様神経分化作用を有する低分子化合物を見出すことができれば、神経変性疾患に対して理想的な治療薬となると考えられる。

本研究では、bFGF 様神経分化作用を模倣する SUN11602 の薬効プロファイル及び作用メカニズムを解析すると共に、*in vivo* 神経傷害モデルを用いて薬理学的評価について研究を行った⁹⁻¹¹⁾。

FGF 受容体シグナルを活性化して bFGF 様の細胞分化作用をもたらすが細胞増殖活性を示さない低分子化合物群を取得し、その中から SUN11602 を選出した。今回の研究では、第 1 章) *in vitro* における bFGF 様神経分化作用 (神経細胞保護及び神経軸索・突起伸長)^{9,11)}、細胞増殖作用¹¹⁾、第 2 章) *in vitro* 作用メカニズム解析⁹⁾、及び第 3 章) *in vivo* 神経傷害モデルを用いて、SUN11602 の薬理作用と *in vivo* 作用メカニズム¹⁰⁾について解明した。本研究の知見は、SUN11602 等の bFGF 様作用を有する低分子化合物の中核疾患治療薬としての有用性を示すとともに、bFGF の作用メカニズムの一端を明らかにするものである。

第1章 bFGF 様低分子化合物 SUN11602 の *in vitro* 薬理作用

第1節 緒言

本章の目的は、bFGF の多岐にわたる薬理作用に着目して、bFGF の課題を解決する低分子化合物 SUN11602 の *in vitro* 薬効プロファイルを明らかにすることである。

(1) 塩基性線維芽細胞成長因子 (basic fibroblast growth factor : bFGF) とは

塩基性線維芽細胞成長因子 (basic fibroblast growth factor : FGF-2、以下 bFGF と略す) は、154 個のアミノ酸から成る分子量約 18 kDa のポリペプチドで、形態形成、組織修復・再生、及び生体の恒常性を維持するための代謝調節に作用する分泌タンパク質である。FGF 受容体は FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4 の 4 種類からなり、FGFR1、2、3 には選択的スプライシングによってそれぞれ b 型、c 型が存在する^{12,13)}。これら 7 種の FGF 受容体サブタイプは FGF ファミリー 23 種類のリガンドから特定の FGF サブセットと結合することで生理活性を発揮する。すなわち、標的細胞の表面に発現している FGF 受容体のサブタイプと、結合するリガンドの種類によって、その特異的な生理活性が規定されていると考えられる。Basic FGF は、c 型の受容体にしか結合できないため、特定の細胞種にしか作用することができないが、神経細胞及びグリア細胞には FGFR1c、FGFR3c が発現している^{12,13)}。

bFGF は神経細胞分化促進作用 (神経細胞保護作用、神経軸索・突起伸長作用、神経幹細胞分化誘導作用等) を有することから中枢疾患への適応が期待されるが、細胞増殖活性も有していることから、腫瘍化、炎症反応亢進や炎症部位でのグリア瘢痕増長の懸念がある。また、高分子タンパク質であるために BBB 透過性に限界があること、血圧低下作用による CBF 低下につながる作用を有することから¹⁴⁾、中枢神経系に対して適応させるには重大な欠点がある。加えて、精製したタンパク質は非常に不安定であり、ガラスやプラスチック等の容器内壁への非特異的吸着が大きいことから、製剤化における課題も多く、組換え体タンパク質に汎用される大腸菌を宿主とした生産系では、十分な生産量が得られないことから、コスト的な課題もある¹²⁾。

(2) bFGF の神経変性疾患への関与

脳梗塞及び脊髄損傷は根本的な治療法のない疾患であり、特に脳梗塞の治療においては、「血栓溶解薬」、その後の再発予防療法として「抗血栓薬」による治療が行われているものの、脳梗塞で失われる機能を治療する「脳保護薬」は存在しない。米国脳卒中学会の「脳卒中患者の初期管理のためのガイドライン¹⁵⁾」にも「神経保護剤で脳卒中患者の治療に役立つ効果が示された薬剤は存在しない」と記載されており、満足のゆく治療剤の登場が望まれている。2002 年に bFGF の脳梗塞における臨床試験結果が報告され、脳梗塞発症 6 時間以内の患者を対象とした Phase II/III 試験の後解析において、発症 5 時間以降の投与で顕著な有効性がみられ神経機能の悪化抑制及び梗塞巣の縮小も確認された¹⁴⁾。しかし、5 時間以前の投与においては、白血球増加、炎症の悪化及び血圧低下が認められ、

症状の悪化及び死亡率も増加した¹⁴⁾。従って、bFGF は虚血状況に応じて曖昧な結果を残した。

脊髄損傷は、直接的な外力による一次損傷と血管損傷による出血と虚血、浮腫、電解質異常、興奮性アミノ酸の放出や活性酸素等による神経細胞傷害（二次損傷）に分けられる。脊髄損傷モデルでの非臨床試験において bFGF は、神経細胞保護により、二次損傷の拡大を抑制し、軸索・突起再生を促進し、損傷後の機能回復を促進するとの報告¹⁶⁻¹⁸⁾がある一方、細胞増殖活性を有していることから、炎症反応を亢進させ、グリア瘢痕を増長することで傷害悪化を促進するとの報告もある¹⁹⁾。

(3) SUN11602

SUN11602 は FGF 受容体シグナルを活性化して bFGF 様の細胞分化作用をもたらすが細胞増殖活性を示さない、アスビオファーマで合成された低分子化合物⁹⁻¹¹⁾で、ラット及びイヌの bioavailability と半減期は、それぞれ 68% と 2.5 時間及び 81% と 4.2 時間で吸収は良好で、経口投与可能であり、マウスでの脳内移行性は 10~16%、血漿タンパク質結合率はイヌで 15%、サルで 14% と分布も良好である。また、SUN11602 は、細胞増殖活性を持たないので、白血球増加、炎症の悪化を引き起こす可能性が少なく、また、血圧低下作用も有しない。

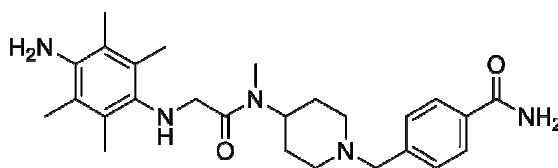
第2節 実験材料及び方法

(1) 細胞調製

本研究での動物実験はアスビオファーマ株式会社の実験動物のガイドラインに従い、各々の実験は、動物倫理委員会において承認を受けた上で実施した。Slc:Wistar 妊娠ラットは日本エスエルシー株式会社より入手した。動物は 12 時間毎の明暗周期（7 時から 19 時までが明期）の下で飼育され、餌と水は常に自由に摂取させた。妊娠 18 日目のラットより胎児を摘出し、海馬領域または大脳皮質領域を実体顕微鏡下で分取した後、Papain Dissociation System (Worthington Biochemical) を用いて神経細胞を分散した。神経細胞をそれぞれ 5×10^5 cells/mL となるよう 5% Nu-Serum (コスモバイオ)、2% B-27 (Life Technologies) を含む neurobasal (Life Technologies) に懸濁し、BioCoat™ Poly-D-Lysine 96 well プレート (コスモバイオ) の各 well に 100 μ L ずつ播種後、10% 二酸化炭素 - 90% 空気、37°C のインキュベーターを用いて培養した。培養 3 日目にグリア細胞の増殖を抑制する目的で、8 μ M AraC (ナカライテスク)、5% Nu-Serum、2% B-27 を含む 100 μ L の neurobasal を各 well に添加した。

(2) 化合物

SUN11602 (4-({4-[(4-Amino-2,3,5,6-tetramethylanilino)acetyl](methyl)amino]-1-piperidinyl}methyl)benzamide) は アスビオファーマ株式会社で合成した。



SUN11602 M.W. 451.6

(3) グルタミン酸誘発神経細胞傷害評価

上記 (1) で調製した初代培養海馬及び大脳皮質神経細胞の培養 9 日目にグルタミン酸溶液及び Hank's Balanced Salt Solution (HBSS (control) を各 well に 10 μ L ずつ添加し、培養 10 日目に生細胞活性を測定するため、MTT 溶液 (5 mg/mL ; ナカライテスク) を各 well に 10 μ L 添加後、インキュベーター内で 10 分間培養した後に、培養液を除去してプレートを室温にて 24 時間乾燥した。各 well に DMSO を 200 μ L を添加して還元された MTT を溶解し、プレートリーダーを用いて主波長 570 nm、副波長 690 nm で吸光度を測定した。主波長と副波長の吸光度の差を生細胞活性とした。

SUN11602 及び bFGF は目的濃度の 20 倍濃度の HBSS 溶液を作製し、培地 200 μ L に対し 10 μ L をグルタミン酸添加 24 時間前または同時に各 well に添加した。Control 群には HBSS を同量添加した。また、保護作用拮抗試験においては、SUN11602 及び bFGF 添加の 2 時間前に RNA 合成阻害剤である actinomycin D (1 μ g/mL HBSS 溶液 ; ナカライテスク) またはタンパク質合成阻害剤である cycloheximide (1 μ g/mL HBSS 溶液 ; ナカライテスク) を添加した。

(4) 神経軸索・突起伸長作用評価

初代培養海馬神経細胞を 5×10^4 cells/mL となるよう 5% Nu-Serum、2% B-27 含有 neurobasal に懸濁し、Poly-D-Lysine-coat 48 well プレート (BioCoat) に 0.5 mL ずつ播種後、10% 二酸化炭素-90% 空気、37°C インキュベーターで培養した。培養 3 日目に 8 μ M AraC、5% Nu-Serum、2% B-27 を含む 0.5 mL の neurobasal を各 well に添加してグリア細胞の増殖を抑制した。SUN11602 及び bFGF は目的濃度の 100 倍濃度の HBSS 溶液を作製し、培地 1 mL に対し 10 μ L を添加した。Control 群には HBSS を同量添加した。培養 5 日目に各 well より 0.5 mL の培地を除去し、4 μ M AraC、5% Nu-Serum、2% B-27 を含む 0.5 mL の neurobasal を各 well に添加した。続いて被験物質及び対照物質の添加を行った。培養 7 日目に培養液を吸引除去し、PBS 1 mL を添加し、3 分間静置する。この操作を 2 回繰り返した。PBS を吸引除去し、固定液 (2% パラフォルムアルデヒドと 4% ショ糖を含む 0.1 M リン酸緩衝液) 0.5 mL を添加 15 分間静置し、細胞を固定した。固定液を吸引除去し、PBS 1 mL を添加し、15 分間静置した。この操作を 4 回繰り返した。洗浄後、PBS を吸引除去し、MAP-2 抗体液 (1:5000. #ab5392 ; Abcam) 1 mL を添加し、終夜 4°C で抗体反応を行った。MAP-2 抗体液を吸引除去し、PBS 1 mL を添加し、15 分間静置した。この操作を 4 回繰り返した。洗浄後、PBS を吸引除去し、2 次抗体液 (Alexa Fluor 488 Goat anti-chicken IgG; 1:1000. #A11039 ; Abcam) 0.9 mL を添加し、60 分間静置した。2 次抗体を吸引除去し、PBS 1 mL を添加し、15 分間静置した。この操作を 3 回繰り返した。神経軸索・突起伸長及び細胞数の定量は、INCell Analyzer 1000 (Amersham Biosciences) を用いて測定し、細胞あたりの軸索・突起伸長を計測した。

(5) 細胞増殖作用評価

Human uterine leiomyosarcoma (SKN) 細胞及び Baby hamster kidney cells (BHK21) はヒューマンサイエンス研究資源バンク及び理研バイオリソースセンターから入手した。それぞれ 4×10^3 cells/200 μ L/well になるように、2% low serum growth supplement (LSGS ; Life technologies) 含有 106S 培地 (クラボウ) に懸濁し、BIOCOAT® Collagen I Cellware, 48-well プレートに播種後、5% 二酸化炭素-95% 空気、37°C のインキュベーターで培養した。培養 3 日後に、0.5% fetal bovine serum (FBS ; Life technologies) 含有の 106S 培地 450 μ L に培地交換し、SUN11602 及び bFGF を 50 μ L を添加した。Control 群には HBSS を同量添加した。その後 22 時間後に 110 μ M の BrdU を 50 μ L 添加し、更に 24 時間培養した。細胞増殖活性は Cell Proliferation ELISA BrdU (Cell Signaling Technology) キットを用いて、細胞内に取り込まれた BrdU をプレートリーダー (主波長 450 nm、副波長 690 nm) で吸光度を測定した。

(6) 統計学的解析

統計学的解析は、Dunnett's multiple comparison tests (EXSUS Ver. 7.6) により行い、 $p < 0.05$ 以下のデータを統計学的に有意差があると判断した。

第3節 実験結果

第1項 神経細胞保護作用

(1) グルタミン酸誘発初代培養神経細胞傷害に対する SUN11602 の保護作用

グルタミン酸は中枢神経系における興奮性神経伝達物質である一方で、過剰量では神経細胞傷害を引き起こす。このようなグルタミン酸による神経細胞傷害は、急性の神経傷害及び慢性の神経変性疾患のいずれにも関与すると考えられている²⁰⁾。

ラット初代培養海馬神経細胞において、bFGF はグルタミン酸によって誘発される細胞内 Ca^{2+} の上昇を抑制することで、神経細胞を保護することが報告されている²¹⁾。本試験でも、ラット初代培養大脳皮質神経細胞を用いた実験系において、bFGF (5, 10 ng/mL) はグルタミン酸添加の 1 日前に加えることによって神経細胞傷害を有意に抑制した。また、SUN11602 (0.1, 0.3, 1, 3 μM) も同様の処置をすることにより、グルタミン酸による神経細胞傷害を有意に抑制した (Fig. 1)。しかし、SUN11602 は bFGF と同様に、グルタミン酸との同時添加では神経細胞保護作用を示さなかった (Fig. 1)。

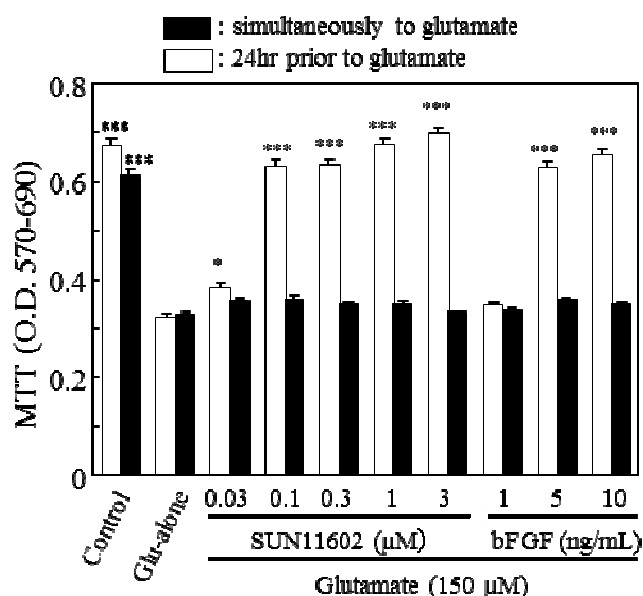


Fig. 1. Effects of SUN11602 and bFGF on glutamate-induced neurotoxicity in primary cultures of rat cerebrocortical neurons

Rat primary cortical neurons (9 day-old cultures) were stimulated with 150 μM glutamate, and SUN11602 (0.03, 0.1, 0.3, 1, and 3 μM) or bFGF (1, 5, and 10 ng/mL) was added to the culture, either simultaneously with (black bars) or 24 h prior to (white bars) glutamate. Neuronal damage was estimated by MTT assay performed 24 h after glutamate addition. Control: HBSS was added instead of glutamate, SUN11602, and bFGF. Glu-alone: glutamate was added to the culture, but HBSS was added instead of SUN11602 and bFGF. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. the corresponding Glu-alone group (Each bar represents the mean \pm SEM, $n=6$, Dunnett's multiple comparison test).

(2) タンパク質合成阻害剤による保護作用拮抗試験

SUN11602 の神経細胞保護作用には、傷害 24 時間前の添加が必要であり、また、bFGF の神経保護メカニズムには保護タンパク質の産生が密接に関与している^{22,23)}。そこで、SUN11602 及び bFGF の神経保護作用に *de novo* 合成が必要か否かを検討するため、RNA 合成阻害剤である actinomycin D 及びタンパク質合成阻害剤である cycloheximide の前処置による拮抗試験を実施した。その結果、bFGF と同様に、転写/翻訳を阻害すると SUN11602 の神経細胞保護作用は消失した (Fig. 2)。つまり、SUN11602 の神経細胞保護作用には、*de novo* 合成が不可欠であることが示唆された。

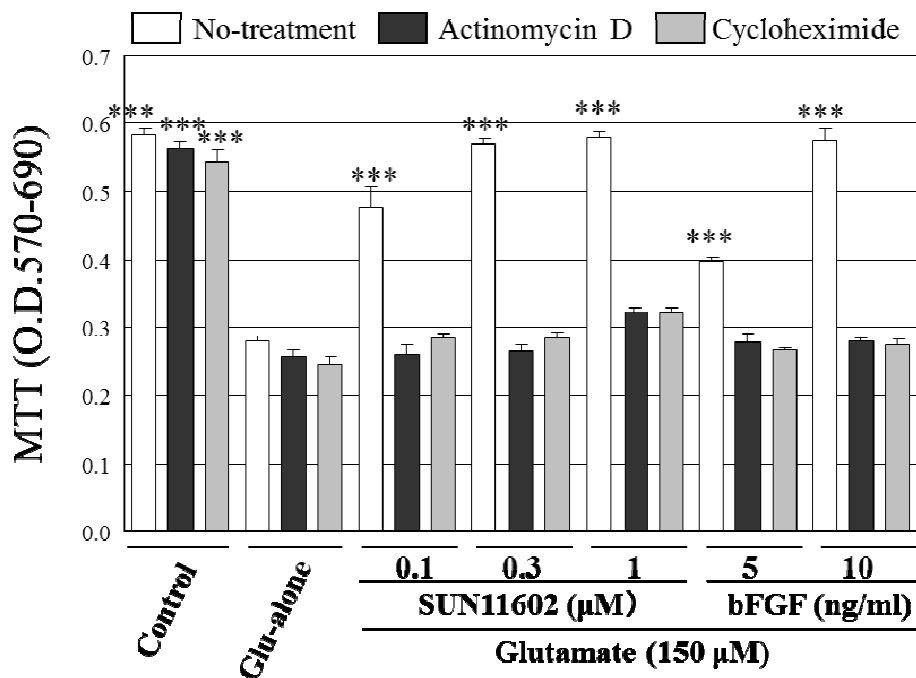


Fig. 2. Neuroprotective effects of SUN11602 and bFGF against glutamate-induced toxicity in primary cultures of rat cerebrocortical neurons

The open bars reveal that the effectiveness of SUN11602 and bFGF is ascribed to unimpaired protein synthesis, by which they can activate their neuroprotective mechanisms. Their neuroprotective effects were abolished by treatment with either actinomycin D (1 μg/mL, black bar) or cycloheximide (1 μg/mL, gray bar), which can interfere with transcription or translation, respectively. Actinomycin D or cycloheximide was first added to the cultures, and, 2 h later, SUN11602 or bFGF was added. After a 24-h incubation, neurons in the cultures were exposed to 150 μM of glutamate for another 24 h, and cell viability was determined by MTT assay. ***p < 0.001, compared to glutamate alone (means ± SEM, n = 6, Dunnett's multiple comparison test).

第2項 神経軸索・突起伸長作用

(1) 初代培養神経細胞における SUN11602 の神経軸索・突起伸長作用

ラット海馬神経細胞の初代培養系を用いて、神経細胞軸索・突起伸長に対する SUN11602 及び bFGF の作用を検討した。初代培養神経細胞は脆弱であり、神経軸索・突起伸長作用が神経細胞保護

作用に依存する可能性が考えられるので、IN Cell Analyzer 1000 を用いて神経細胞あたりの軸索・突起を計測する neurite outgrowth detection program により定量化した。

ラット海馬神経細胞を 7 日間培養することで、対照群においても神経細胞軸索・突起の伸長とネットワークの形成がみられたが、培養 3 及び 5 日目に SUN11602 (0.1, 0.3, 1 μ M) 又は bFGF (1 ng/mL) を培養液に添加することにより、培養 7 日目の神経細胞軸索・突起伸長は有意に促進された (Fig. 3)。

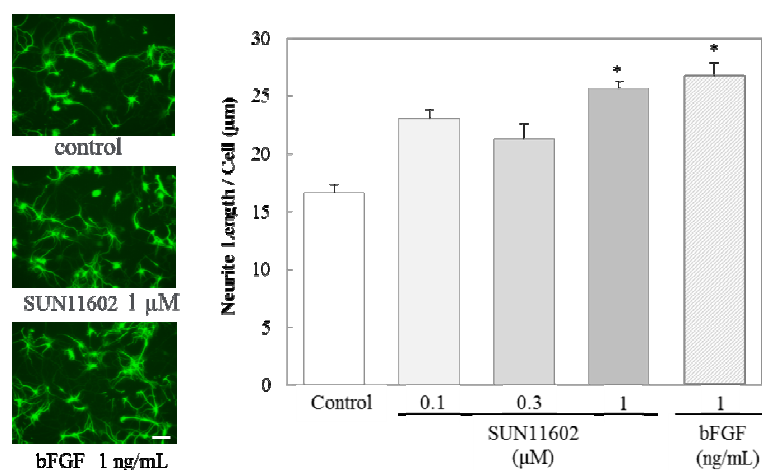


Fig. 3. Effects of SUN11602 and bFGF on neurite outgrowth in hippocampal neurons

Representative micrographs of the cells treated with control (top), 1 μ M SUN11602 (middle), and 1 ng/mL bFGF (bottom). The scale bar is 100 μ m. Mean neurite length per cell. * $p < 0.05$ vs. the control group (means \pm SEM, $n = 6$, Dunnett's multiple comparison test).

第3項 細胞増殖作用

(1) 細胞増殖作用に対する SUN11602 の効果

bFGF は神経保護作用、神経軸索・突起伸展作用等の神経分化作用の他に細胞増殖促進作用等を有することが知られている。SUN11602 が、bFGF と同様の細胞増殖促進作用を有するかどうかを検討するために、bFGF 製剤(トラフェルミン; 科研製薬株式会社)で細胞増殖活性が認められている BHK 細胞及び SKN 細胞を用いて²⁴⁾、bFGF の細胞増殖活性と比較した。細胞増殖には DNA の複製が必要で、複製 DNA に取り込まれたピリミジンアナログである BrdU 量を測定する方法は、細胞増殖の間接的パラメーターとして良く用いられる²⁵⁾。Basic FGF は BHK 細胞及び SKN 細胞の BrdU 取り込みを 1 ng/mL 以上の濃度で有意に亢進したが、SUN11602 は 100 μ M まで何ら作用を示さなかった (Fig. 4)。

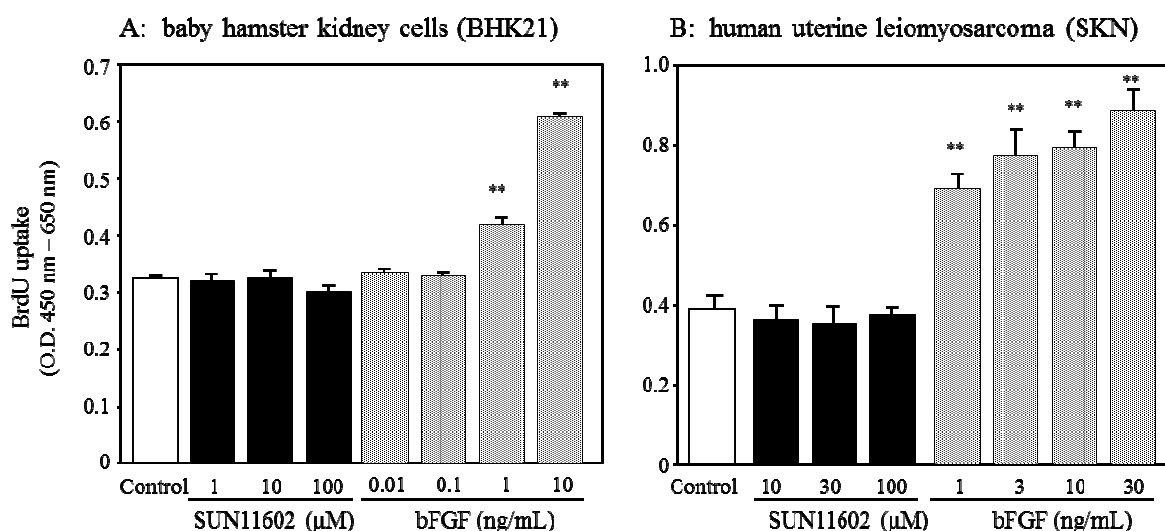


Fig. 4. Cell-proliferative activities of SUN11602 and bFGF in BHK21 and SKN cells

Cell-proliferative activity was measured using a BrdU incorporation assay. SUN11602 did not significantly increase BrdU uptake compared to that of the control in both cell lines (solid columns). By contrast, bFGF facilitated BrdU uptake into BHK21 and SKN cells at a concentration of 1 ng/mL or higher (stippled columns). Control groups were treated with the same volume of vehicle solution. ** $p < 0.01$, compared to the control group (mean \pm SEM, $n = 3$, Dunnett's multiple comparison test).

第4節 考察

本章では、低分子化合物である SUN11602 が、bFGF 様の細胞分化作用（神経細胞保護作用、神経細胞軸索・突起伸長作用）をもたらすが細胞増殖活性を示さないことを示した。bFGF は高分子タンパク質であるために血液-脳関門の透過性に限界があること、細胞増殖作用による炎症反応亢進や炎症部位でのグリア瘢痕増長の懸念が課題とされた。体内動態に優れた低分子化合物 SUN11602 は、これらの欠点を排し、中枢疾患に対して理想的な治療薬候補と考えられる。

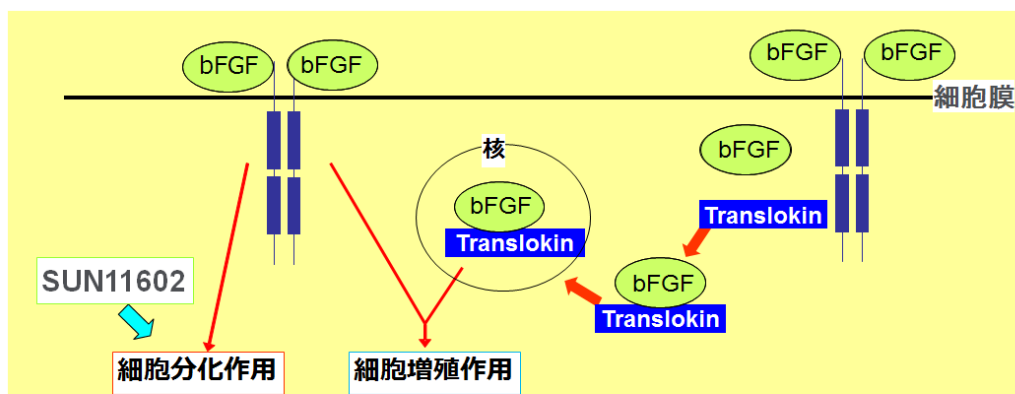
本章の第1項及び第2項では、SUN11602 がグルタミン酸による神経細胞傷害を抑制すること及び神経細胞軸索・突起伸長作用を有することを示した。この神経細胞保護作用メカニズムは、bFGF と同様で、1) 傷害因子との同時添加では保護作用を示さないこと、2) 転写阻害剤である actinomycin D 及び 3) タンパク質合成阻害剤である cycloheximide の前処置により保護作用が消失することから *de novo* 合成が必須である。同様の結果は、bFGF においても報告されており^{22,23)}、本研究の結果はこれらと一致する。神経細胞保護作用の FGF 受容体の下流シグナルや新規合成保護タンパク質については第2章に記載する。

神経組織傷害時の修復過程において、傷害部及びその周辺域における残存神経細胞の保護、破綻した神経細胞のネットワークの再構築のため bFGF の神経細胞保護作用及び神経軸索・突起伸長作用が重要な役割を果たすことが報告されている^{5,22,23)}。SUN11602 の bFGF 様の神経細胞分化作用は、この再構築に促進的に働くことが期待される。

本章の第3項では、FGF 受容体を発現している BHK 細胞及び SKN 細胞を用いて、SUN11602 及び bFGF の細胞増殖活性を比較検討した。既報²⁴⁾と同様に bFGF は細胞増殖作用を示すが、SUN11602 は細胞増殖作用を示さなかった。この結果は、bFGF の神経分化作用と細胞増殖促進作用のシグナル伝達回路が同一ではないこと、及び、SUN11602 の作用メカニズムは、神経分化作用のシグナル伝達を選択的に活性化することを示唆する。

Basic FGF の細胞増殖促進作用には、FGF 受容体からのシグナル伝達に加えて、bFGF 自身の細胞の核への移行が必要であるという報告がある²⁶⁻²⁹⁾。これらの報告によると、1) bFGF は核移行シグナル (nuclear localization signal : NLS) がなく、核内への移行は Translokine との相互作用が必要であること、2) Translokine との結合部位を変異させた bFGF 変異体は核内へ移行できないこと、3) Translokine との相互作用を消失した bFGF 変異体は、FGF 受容体に対する結合能、管腔形成能、FGF 受容体の下流シグナル伝達分子である p70S6 kinase リン酸化能に関して bFGF と相違がないものの、細胞増殖能は完全に消失すること、4) Translokine との相互作用を消失した bFGF 変異体の N 末端側に SV40 由来の NLS を付加すると、核内に移行し、細胞増殖活性が回復すること等が示されており bFGF の細胞増殖活性には、bFGF 自身の核内への移行が重要であると結論付けている²⁶⁻²⁹⁾。つまり、bFGF 様の細胞分化シグナルは細胞膜上の FGF 受容体リン酸化以降のシグナルだけで細胞分化作用を誘導するが、増殖作用に関しては、細胞膜上の FGF 受容体シグナルと細胞核内の細胞増殖シグナルが相互作用することで誘導される。従って、核内細胞増殖シグナルが活性化されるか否かにより、細胞分化作用と細胞増殖作用を分離することが可能と考えられている。

る。低分子化合物のプロトンドナーが5個以上の場合は、膜透過性は期待できないと報告されている³⁰⁻³²⁾。従って、プロトンドナーが5個あるSUN11602はあり良好な膜透過性は期待できず、SUN11602は核内移行が良好でなく、bFGFとは異なり、核内細胞増殖シグナルを活性化しないために細胞増殖促進作用を示さないのではないかと推測している。



	細胞分化作用		細胞増殖作用
	神経細胞保護作用	神経軸索伸長作用	
bFGF	○	○	○
SUN11602	○	○	×

第5節 小括

第1章においては、神経細胞保護及び軸索・突起伸長の細胞分化作用と細胞増殖に対する SUN11602 と bFGF の異同について明らかにした。すなわち、SUN11602 は bFGF と同様に新規タンパク質を合成することで神経細胞保護作用を示し、神経軸索・突起伸長作用を有するが、bFGF とは異なり細胞増殖を示さない化合物である。これは、SUN11602 は bFGF と同様に細胞膜上の FGF 受容体を活性化するが、bFGF と異なり核内細胞増殖シグナルを活性化しないため、bFGF 様細胞分化作用を示すが、細胞増殖作用は誘導しないと考えられ、bFGF の臨床試験適応における課題を克服できる可能性を示唆する重要な知見を得ることができた。

以上の知見は、bFGF の物性及び細胞増殖作用による超えられない課題を解決する低分子化合物 SUN11602 を見出し、中枢神経疾患を適応とした治療薬開発の可能性を示唆するものである。

第2章 SUN11602 の作用メカニズム解析

第1節 緒言

本章の目的は、SUN11602 の *in vitro* における薬理作用メカニズムを明らかにするとともに、bFGF とのシグナル伝達様式に関して異同を明らかにすることである。

(1) FGF 受容体のシグナル伝達様式

受容体の Tyrosine (Tyr) リン酸化は様々なシグナル伝達において重要な役割を果たす。FGF シグナルにおいてもリガンドが FGF 受容体に結合すると、受容体が二量体を形成し、細胞内ドメインの Tyr 残基をお互いにリン酸化 (pY653/654) する自己リン酸化を促し、その後ドメイン内の Tyr 残基 (pY583/585、pY463、pY730、pY766) が継続的にリン酸化される³³⁾。その後、細胞内の様々なタンパク質の活性化を引き起こし、特に、神経細胞の生存に関わる bFGF の細胞内シグナルカスケードとしては MEK/ERK 経路にてシグナルが伝達される^{34,35)}。

(2) 神経細胞保護タンパク質 (CalbindinD28k) の役割

Alzheimer's disease (AD) や Huntington's disease を中心とする神経変性疾患において、異常タンパク質蓄積等の様々な議論及び仮説があるものの、神経細胞内への過剰なカルシウム流入こそが、これらの病態における神経細胞傷害への決定的な引き金であるという認識は一致している^{36,37)}。この進行性の神経細胞傷害を抑制できれば、慢性神経変性死の進行阻止に繋がるという発想の下、25 年以上前から神経栄養因子が注目されてきた^{38,39)}。これら神経栄養因子の作用メカニズムの一つとしてカルシウム結合タンパク質の産生亢進作用に基づく細胞内カルシウム濃度の恒常性維持が挙げられる^{36,40)}。CalbindinD28k (CalB) はカルシウム結合タンパク質の一種として脳内に広く分布しており、細胞内カルシウム濃度の上昇に対して緩衝作用を示すことが報告されている^{41,42)}。例えば、CalB 強制発現細胞は、種々の傷害に対して耐性で、急激な細胞内カルシウム濃度の上昇を抑制する⁴³⁾。また、AD 患者脳を用いた組織学的検討では CalB 陽性神経細胞数が有意に減少しているが、A β 凝集塊周囲で生存している神経細胞は CalB 陽性細胞である^{44,45)}。また、ラットに A β 凝集塊を注入する実験において注入部位近傍で生存している神経細胞は CalB 発現細胞であり、一方、同じカルシウム結合タンパク質である Parvalbumin 陽性神経細胞は傷害を受ける⁴⁶⁾。すなわち、CalB は神経細胞を過剰なカルシウム流入の危険から護っているといえる。しかしながら、CalB は高分子タンパク質であるため、生体内への補充療法は薬剤上の制約が大きく、特に中枢神経系領域への適応は困難である。従って、CalB を産生亢進する経口投与可能な低分子化合物の神経細胞保護剤を見出すことが出来れば、AD を始めとする慢性神経変性疾患分野に応える画期的な医薬品を提供できると考えられる。

第2節 実験材料及び方法

(1) 各種阻害剤による神経細胞保護作用拮抗試験

ラット初代培養海馬神経細胞における SUN11602 及び bFGF の神経細胞保護作用メカニズムについて、FGF 受容体 Tyr kinase 特異的阻害剤である PD166866 (0.3 μ M ; アスビオファーマ株式会社で合成)、FGF 受容体等の二量体化を阻害する suramin (10 μ M ; Sigma-Aldrich) 及び FGF 受容体 antagonist である platelet factor 4 (PF4 100 ng/mL ; Sigma-Aldrich) を SUN11602 及び bFGF 添加 30 分前に添加し、SUN11602 及び bFGF の神経細胞保護作用に対する拮抗試験を行った。また、FGF 受容体下流シグナル解析として、MEK/ERK シグナルに対する作用を解析するため、MEK 阻害剤 PD98059 (0.3, 1, 3 μ M ; フナコシ) の 30 分前処置を実施した。

(2) FGF 受容体結合試験

FGF 受容体の Tyr キナーゼ活性化亢進により保護作用を示す SUN11602 が bFGF の受容体結合を阻害するか否かを調べるために、 $[^{125}\text{I}]$ -bFGF (日本ラジオアイソトープ) を用いて受容体結合試験を実施した。FGF 受容体 1 及び 3 を発現するラット初代培養海馬神経細胞または BHK21 細胞がほぼ confluent になった状態でアッセイを行った。細胞を無血清培地で洗浄した後、 $[^{125}\text{I}]$ -bFGF (2 ng/mL) を含む培養液を加え、続けて未標識 bFGF (0.1~100 ng/mL) 及び SUN11602 (0.1~100 μ M) を加え混合し、4°C で 3 時間インキュベートした。無血清培地で 2 回洗浄し遊離のラベル体を吸引除去した後、2 M NaCl/10 mM HEPES [pH 7.4] を加え 5 分間静置して、この液をカウントチューブに移した。この作業を 2 回繰り返し、回収した液を γ カウンターで測定した。

(3) Western Blot / mRNA 解析と免疫組織学的検討

- ① Western Blot 解析 : FGF 受容体下流シグナル解析として、MEK/ERK シグナルに対する作用を解析するため、SUN11602 及び bFGF 刺激による ERK1/2 のリン酸化を Western Blot により検討した。培養 8 日目のラット初代培養大脳皮質神経細胞に SUN11602 (10, 100 μ M) 及び bFGF (10 ng/mL) を添加し、20 分後に Laemmli バッファー (バイオラッド) で細胞を溶解し、12% の SDS ゲルで電気泳動後、ニトロセルローズ膜 (バイオラッド) に転写し、ERK1/2 及びリン酸化 ERK1/2 抗体 (1 : 1000 Cell Signaling Technology) で Western Blot 解析を行った。
- ② mRNA 解析 : SUN11602 及び bFGF の神経細胞保護作用には保護タンパク質である CalB の産生が必須である。そこで CalB の mRNA 産生を定量化した。培養 8 日目のラット初代培養海馬神経細胞に SUN11602 (3 μ M) 及び bFGF (10 ng/mL) を添加し、18 時間後に ISOGEN (日本ジーン社) で Total RNA を回収し、CalB mRNA (CALB1; Assay ID: Hs00191821_m1) 及び housekeeping gene として glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; Assay ID: 402869) を用いて RT-PCR を用いて CALB1 のコピー数を算出した。
- ③ 培養細胞における CalB 発現の免疫細胞化学的検討 : 培養 8 日目のラット及びマウス初代培養海馬神経細胞に SUN11602 (3 μ M) 及び bFGF (10 ng/mL) を添加し、48 時間後に 2%

paraformaldehyde、4% sucrose の 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) で細胞を固定し、CalB 抗体 (1:10000; CB-38, Swant) または FGF 受容体抗体 (1:1000; Santa Cruz) で免疫染色を行った。

- ④ CalB KO マウス及び wild type マウスの海馬領域の免疫組織学的検討：CalB KO 及び wild type マウス (C57BL/6J) はクレア社を通じて Jackson 社から購入した。動物は 12 時間毎の明暗周期 (7 時から 19 時までが明期) の下で飼育され、餌と水は常に自由に摂取させた。マウスは、ペントバルビタール麻酔下で、経心的にヘパリン含有生理食塩水を灌流し、心臓の拍動が弱まり始めたら、氷冷した 4% paraformaldehyde/1% sucrose in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) で灌流し、海馬領域を摘出後、20% sucrose in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) 中において 4°C で固定した。凍結切片を作製後、神経細胞層を Nissl's 染色で、CalB タンパク質を CalB 抗体 (1:1000) を用いて第 1 章第 2 節 (4) と同様に細胞免疫染色を行った。

(4) 細胞内 Ca^{2+} 測定

CalB KO 及び wild type マウスの 18 日目の胎児から、大脳皮質領域を実体顕微鏡下で分取した後、第 1 章第 2 節 (1) と同様に Papain Dissociation System を用いて神経細胞を分散した。神経細胞をそれぞれ 5×10^5 cells/mL となるよう 5% Nu-Serum、2% B-27 を含む neurobasal に懸濁し、35 mm の polyethyleneimine コートした Glass Base Dish (松浪硝子) に 2 mL 播種後、10% 二酸化炭素-90% 空気、37°C のインキュベーターを用いて培養した。培養 3 日目にグリア細胞の増殖を抑制する目的で、8 μM AraC、5% Nu-Serum、2% B-27 を含む 1 mL の neurobasal を各 well に添加した。SUN11602 (3 μM) 及び bFGF (10 ng/mL) は培養 8 日目に添加し、培養 9 日目に 0.2% DMSO、0.04% F-127 (Sigma-Aldorich) 含有 4 μM fluo3-AM (同人化学) /HEPES-buffered saline (120 mM NaCl, 5.0 mM KCl, 0.62 mM MgSO_4 , 1.8 mM CaCl_2 , 10 mM HEPES, 6.0 mM glucose, pH 7.4) で 37°C 60 分間培養した。その後、培養液は HEPES-buffered saline で置換し、グルタミン酸刺激前後の細胞内 Ca^{2+} をレーザー顕微鏡 (オリンパス) を用いて観察した。

第3節 実験結果

(1) FGF 受容体に対する作用

ラット初代培養海馬神経細胞における SUN11602 及び bFGF の神経細胞保護作用メカニズムについて、FGF 受容体 antagonist である PF4、FGF 受容体等の二量体化を阻害する suramin 及び FGF 受容体 Tyr kinase 特異的阻害剤である PD166866 前処置による拮抗試験を行った。PF4 (100 ng/mL)、suramin (10 μ M) 及び PD166866 (0.3 μ M) を SUN11602 及び bFGF 処置 30 分前に添加すると SUN11602 の神経細胞保護作用は、PF4 及び suramin では阻害されず (Fig. 5)、PD166866 により阻害された (Fig. 6)。一方、bFGF の神経細胞保護作用は、PF4、suramin 及び PD166866 により阻害された (Fig. 5, 6)。この結果から、SUN11602 は、bFGF agonist として作用せず、FGF 受容体の二量体化を介せずに、FGF 受容体の Tyr キナーゼ活性化を介して保護作用を示すことが示唆された。

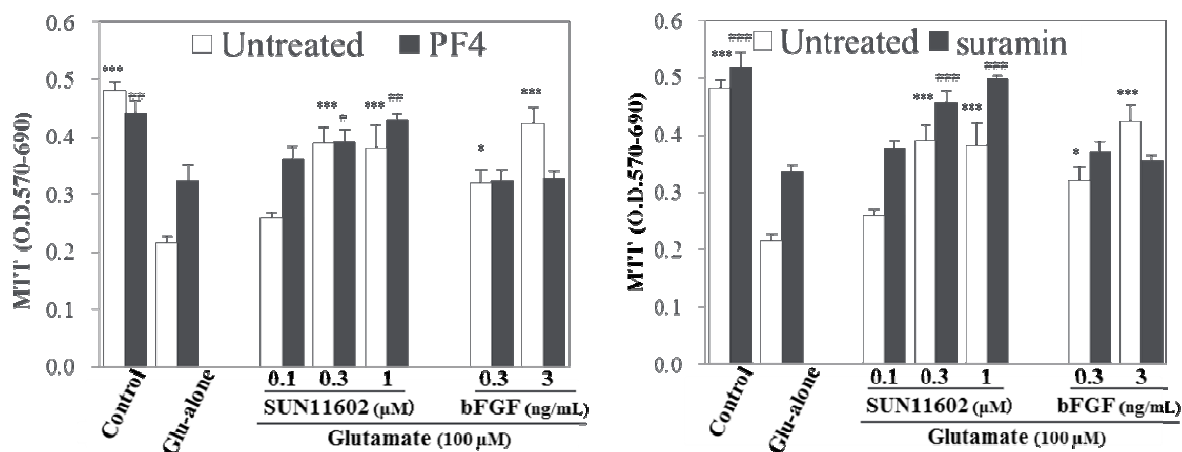


Fig. 5. Neuroprotective mechanism of SUN11602 and bFGF against glutamate-induced toxicity in primary cultures of hippocampal neurons

The antagonizing effects of PF4 and suramin against the neuroprotective activities of SUN11602 and bFGF.

Although both bFGF and SUN1602 promoted primary hippocampal neurons survival under toxic conditions in a concentration-dependent manner (open columns: untreated), pretreatment with PF4 (100 ng/mL) or suramin (10 μ M) abolished bFGF neuroprotective effects (solid columns: PF4 or suramin-treated). * $P < 0.05$, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ### $P < 0.001$, compared to glutamate alone (mean \pm SEM, $n=6$, one-way or two-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test).

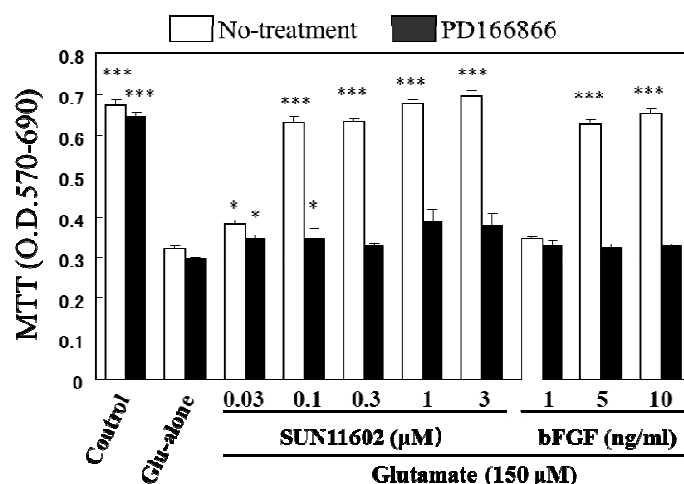


Fig. 6. The antagonizing effects of PD166866 against the neuroprotective activities of SUN11602 and bFGF

Although both bFGF and SUN11602 promoted primary hippocampal neurons survival under toxic conditions in a concentration-dependent manner (open columns: untreated), pretreatment with PD166866 (0.3 μM) abolished their neuroprotective effects (solid columns: PD166866-treated). This indicates that SUN11602- and bFGF-mediated neuroprotection occurs through activation/phosphorylation of FGF receptor. Control groups were treated with the same volume of vehicle solution. Glutamate-alone groups were exposed to 150 μM glutamate but were not treated with SUN11602, bFGF, or PD166866. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$, compared to glutamate alone (mean \pm SEM, $n=6$, one-way or two-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test).

本研究において SUN11602 の作用メカニズムを解析するにあたり、FGF 受容体 Tyr kinase 特異的阻害剤である PD166866 の特異性^{47,48)}を検討することは重要である。そこで、対象とする神経細胞保護因子を選択するため一次構造と高次構造の2つの相同性検索を行った⁴⁹⁾。FGF 受容体 Tyr kinase domain と一次構造の Identity が40% 以上ある受容体群及び FGF 受容体 Tyr kinase domain の PD166866 結合部位である ATP-binding pocket の高次構造が類似する受容体群で、そのリガンドに神経細胞保護作用が報告されている受容体として、Trk⁵⁰⁾、INSR^{51,52)}、EGFR⁵³⁾、PDGFR⁵⁴⁾、VEGFR⁵⁵⁾を選出した。それぞれのリガンドを用いて神経細胞保護作用が PD166866 で拮抗されるか否かを検討した。その結果、一次構造と高次構造の2つの相同性検索で唯一ヒットした VEGFR のリガンドである VEGF-A だけがPD166866によって若干阻害されたが、一次構造だけが相同性検索でヒットした NGF (TrkA)、BDNF (TrkB)、NT-3 (TrkC)、IGF-1 (INSR)、HB-EGF (EGFR)、PDGF-BB (PDGFR) の神経細胞保護作用はすべて PD166866 で拮抗されなかった (Fig. 7)。以上の結果より、神経細胞保護作用の観点から、FGF 受容体に対する PD166866 の特異性は確保されており、SUN11602 及び bFGF の保護作用が PD166866 処置により拮抗されたことから、SUN11602 及び bFGF の保護作用には FGF 受容体の Tyr キナーゼの活性化亢進が必須であることが示唆された。

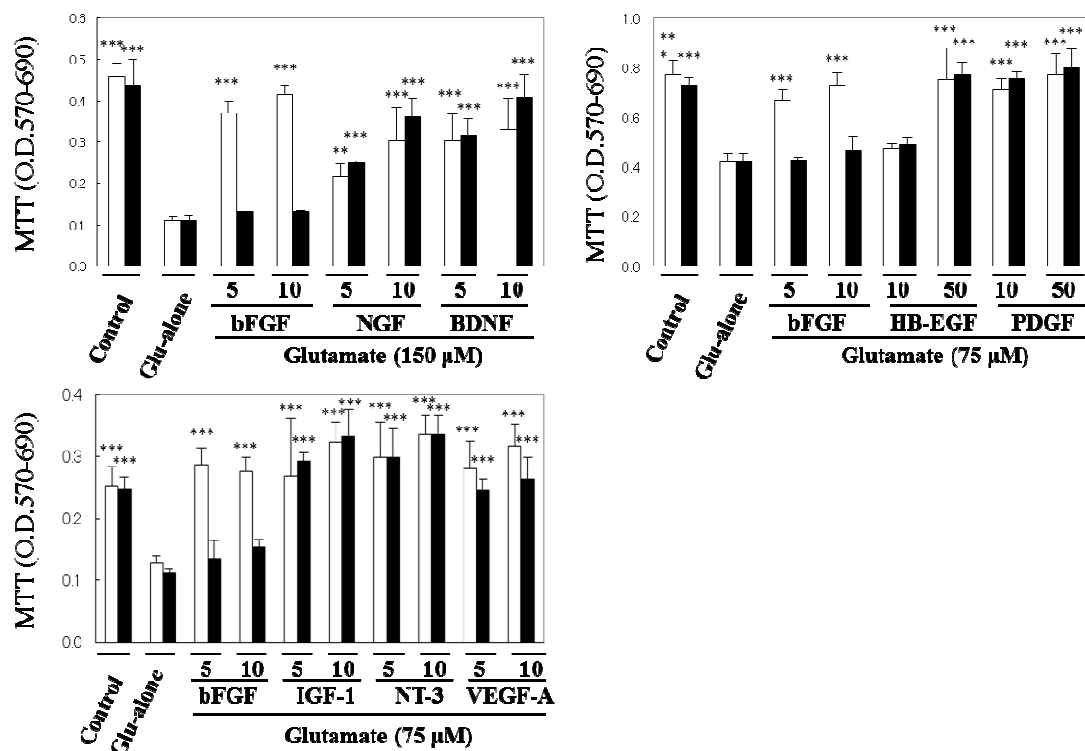


Fig. 7. The antagonizing effects of PD166866 against the neuroprotective activities of SUN11602 and bFGF

The other growth factors (nerve growth factor [NGF], brain-derived neurotrophic factor [BDNF], insulin-like growth factor-1 [IGF-1], neurotrophin-3 [NT-3], vascular endothelial growth factor-A [VEGF-A], heparin binding-EGF [HB-EGF], and platelet-derived growth factor [PDGF]) were investigated in order to discriminate the important factors in the intracellular signaling of SUN11602 and bFGF. Unlike bFGF, the bioactive effects of the other growth factors were not affected by PD166866 (0.3 μM). The neuroprotective mechanisms of SUN11602 and bFGF appear to differ from those of the other growth factors. The toxic concentrations of glutamate in the figures (150 μM or 75 μM) were employed compared to those that were suitable for the growth factors in order to show their neuroprotective effects clearly. **p < 0.01 and ***p < 0.001, compared to glutamate alone (means ± SEM, n = 6, Dunnett's multiple comparison test).

SUN11602 は bFGF agonist として作用しないことから、 $[^{125}\text{I}]$ -bFGF と FGF 受容体との結合に対する SUN11602 及び bFGF の阻害作用を検討した。In vitro で神経細胞傷害を評価した系で用いたラット初代培養海馬神経細胞及び bFGF による細胞増殖活性を評価したハムスター腎臓由来の BHK21 細胞を用いた。bFGF (0.1~100 ng/mL) は濃度依存的に $[^{125}\text{I}]$ -bFGF と FGF 受容体との結合を阻害したが、SUN11602 (~100 μM) は阻害しなかった (Fig. 8)。SUN11602 の結合様式は bFGF と同じではなく、FGF 受容体のリガンド結合部位に作用しないことが示唆された。

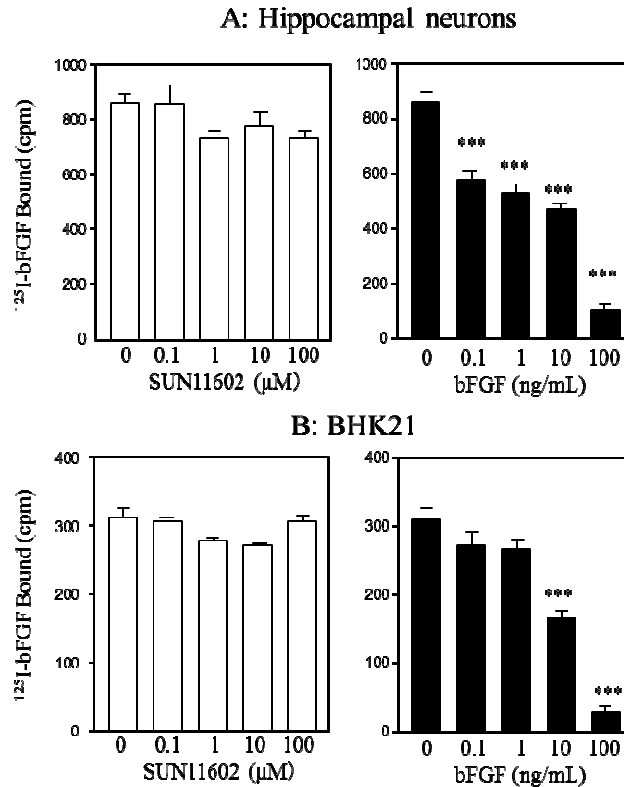


Fig. 8. Effects of SUN11602 and bFGF on the binding of [¹²⁵I]-labeled bFGF in primary cultures of hippocampal neurons and BHK21 cells that endogenously express FGFR

SUN11602 exerted no significant influence on [¹²⁵I]-labeled bFGF binding to FGFR in both primary cultured rat hippocampal neurons and BHK21 cells (left panels: open columns), while unlabeled bFGF competitively antagonized [¹²⁵I]-bFGF binding to FGFR in a concentration-dependent manner in both cell types (right panels: solid columns). ****p* < 0.001, compared to vehicle (mean ± SEM, *n* = 9, one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test).

(2) FGF 受容体下流シグナルに対する作用

神経細胞の生存に関わる bFGF の細胞内シグナルカスケードとしては MEK/ERK シグナル経路が知られている⁵⁵⁻⁶⁰。FGF 受容体下流シグナル解析として、MEK/ERK シグナルに対する作用を解析した結果、ラット初代大脳皮質神経細胞において、SUN11602 及び bFGF は ERK1/2 の細胞内含量を変化させずにリン酸 ERK1/2 量を亢進した (Fig. 9A)。また、SUN11602 及び bFGF の神経細胞保護作用は MEK 阻害剤 PD98059 の前処置により阻害された (Fig. 9B)。この結果は、SUN11602 は bFGF と同様に FGF 受容体の Tyr キナーゼを活性化し、MEK/ERK のリン酸化シグナルカスケードを介し細胞保護作用を発現することを示している。

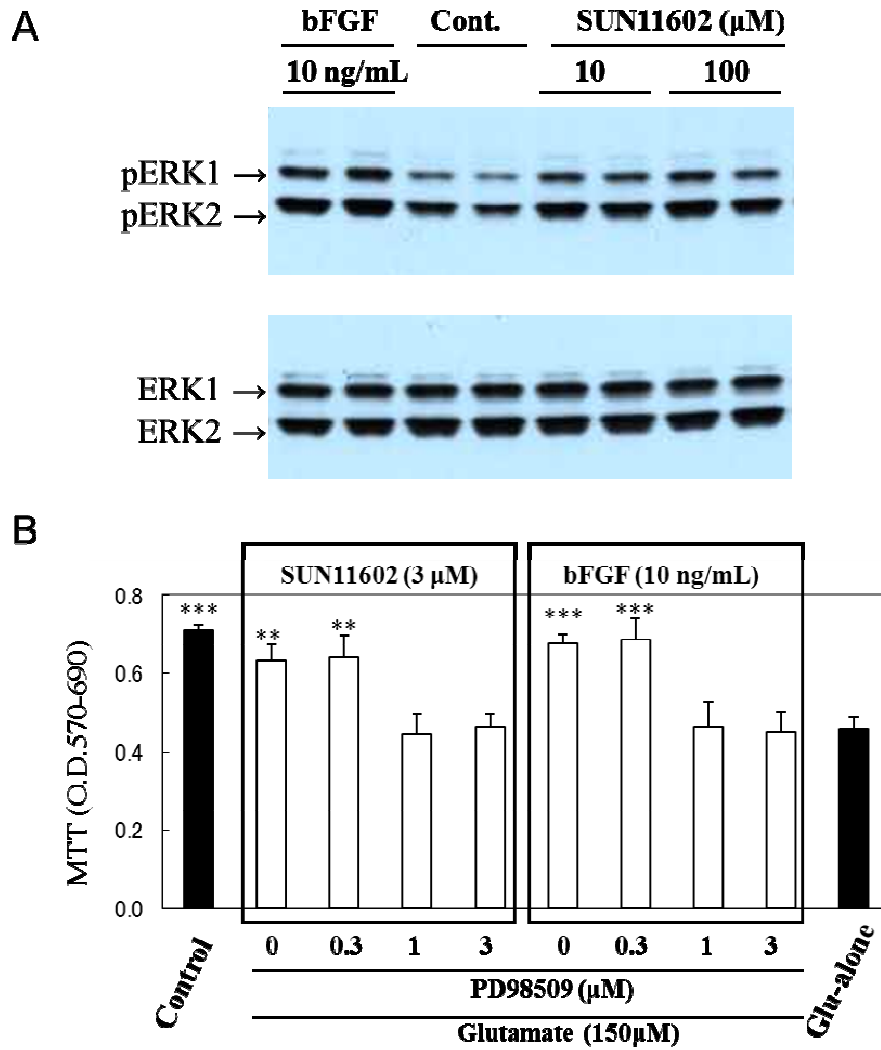


Fig. 9. Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase-1/2 (ERK-1/2), which is necessary for the neuroprotection by SUN11602 and bFGF against glutamate-induced toxicity in primary cultures of rat cerebrocortical neurons

A: Cultured cerebrocortical neurons express ERK1/2 proteins at a constant level in normal conditions (lower panel: ERK1, ERK2), whereas, after treatment with 10 or 100 μ M of SUN11602 and 10 ng/mL of bFGF for 20 min, both ERK1/2 proteins of the neurons were phosphorylated substantially (upper panel: pERK1, pERK2) in comparison to the control lysates. The whole-cell lysates of the cultured neurons were subjected to 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and immunodetected with an anti-phosphorylated-ERK1/2 antibody. B: Inhibition by PD98059 on the neuroprotective effects of SUN11602 and bFGF. Impairment of the ERK kinase/ERK pathway resulted in eliminating the effects of SUN11602 and bFGF, implying that signaling through the MEK/ERK pathway plays a pivotal role in activating the neuroprotective mechanisms. The cells pretreated with PD98059 for 30 min were incubated with SUN11602 or bFGF for 24 h. Thereafter, neurons in the cultures were exposed to 150 μ M glutamate for another 24 h, and cell viability was determined by the MTT assay. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, compared to the glutamate group (means \pm SEM, $n = 6$, Dunnett's multiple comparison test).

(3) CalbindinD28k 産生亢進作用

グルタミン酸は、神経細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させることで神経細胞傷害を誘発する²⁰⁾。SUN11602 または bFGF はタンパク質を産生することによりグルタミン酸誘発神経細胞傷害を抑制する。そこで、細胞内 Ca^{2+} 上昇に対し緩衝作用を有するカルシウム結合タンパク質の一種である CalB 産生に注目した。SUN11602 (3 μM) 及び bFGF (10 ng/mL) はラット初代培養海馬神経細胞の CalB の mRNA 及びタンパク質量の産生を亢進し、この mRNA 量亢進作用は FGF 受容体 Tyr キナーゼ特異的阻害剤である PD166866 で拮抗された (Fig. 10)。

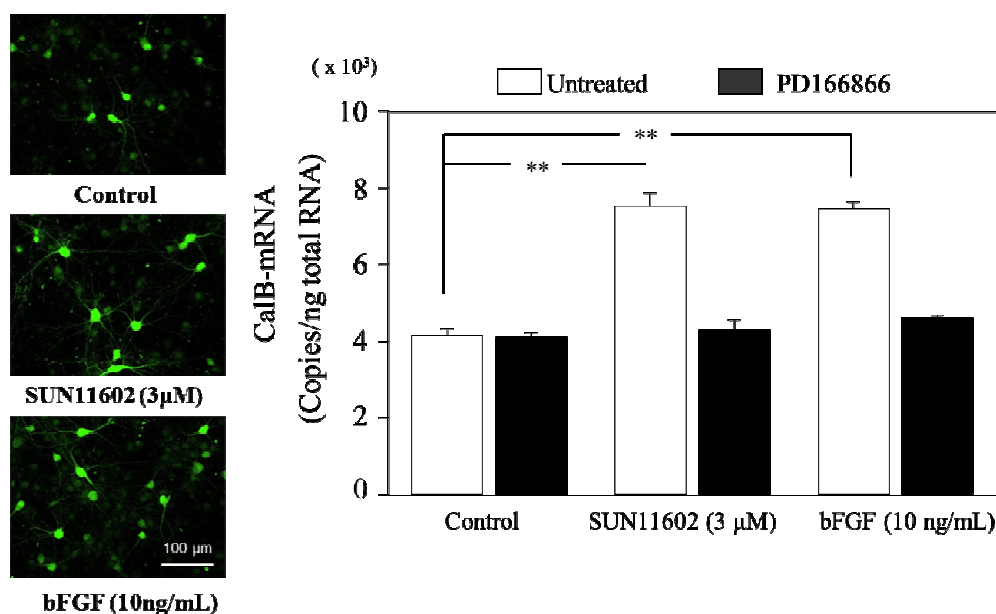


Fig. 10. Suppressive effects of PD166866 on SUN11602- and bFGF-induced increases in calbindin D-28k mRNA expression in primary cultures of hippocampal neurons

Left panels, calbindin D-28k immunoreactivity in hippocampal neurons was increased following stimulation with 3 μM SUN11602 or 10 ng/mL bFGF. Control groups were treated with the same volume of vehicle solution. Increased calbindin D-28k mRNA expression, which was induced by stimulation with either 3 μM SUN11602 or 10 ng/mL bFGF for 18 h (open columns: untreated), was mostly antagonized by pretreating cultures with 0.3 μM PD166866 (solid columns: PD166866-treated). ** $p < 0.01$, compared to control (mean \pm SEM, $n = 3$, one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test).

(4) CalbindinD28k knockout マウスでの神経保護作用メカニズム解析

SUN11602 及び bFGF により誘導される保護タンパク質が CalB か否かを明らかにするために CalB KO マウス由来の神経細胞を用いて検討した。最初に Fig. 11A に示すように CalB KO マウスと wild type (WT) の海馬神経細胞層の状態、CalB 発現状況、初代培養海馬神経細胞における FGF 受容体の発現量を検討した。その結果、CalB KO マウスの海馬領域の Nissl 染色像、FGF 受容体発現に関して、WT と相違は認められなかった。また、CalB KO マウスの海馬領域には CalB は発現し

ていなかった (Fig. 11A)。また、ラット初代培養神経細胞と同様に WT マウス初代培養神経細胞でも SUN11602 (3 μ M) 及び bFGF (10 ng/mL) は CalB の発現を上昇させた (Fig. 11B)。

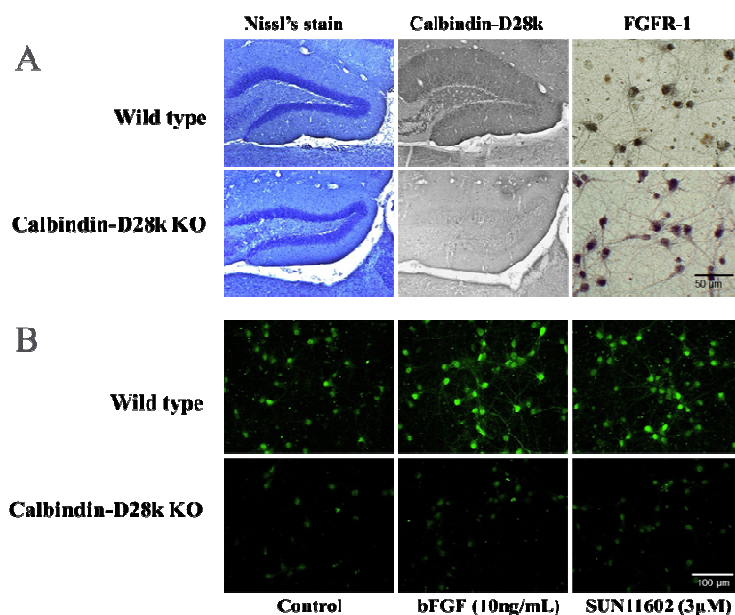


Fig. 11. Immunocytochemical characterization of brain neurons from wild-type (WT) and homozygous calbindin-D28k knockout (Calb^{-/-}) mice

A: The immunoreactivity to calbindin-D28k and fibroblast growth factor receptor-1 (FGFR-1) in neurons from WT and Calb^{-/-} mice. In order to confirm the gene deletion of Calbindin-D28k, typical brain tissue sections were employed for immunofluorescence staining. Primary cultures from the hippocampus of WT and Calb^{-/-} mice displayed that they contained neurons with immunoreactive FGFR-1. B: Increased levels of expression of Calbindin-D28k by bFGF and SUN11602 in primary cultures of hippocampal neurons from WT and Calb^{-/-} mice. Culture neurons that were grown on coverslips in the presence of 10 ng/mL bFGF or 3 μ M of SUN11602 for 48 h were fixed and immunostained with a Calbindin-D28k antibody. Calbindin D28k-immunoreactivity was mostly eliminated from the cultures of cerebrocortical neurons from Calb^{-/-} mice.

次に CalB KO と WT マウスより初代培養神経細胞を培養し、SUN11602 及び bFGF の神経細胞保護作用 (Fig. 12) 及び細胞内 Ca^{2+} 上昇に対する作用 (Fig. 13) を検討した。なお、CalB KO マウスの場合、内因性 CalB が存在せず、グルタミン酸に非常に脆弱なため WT でのグルタミン酸添加量 (100 μ M) の細胞傷害率 (約 50%) に相当するグルタミン酸添加量 (50 μ M) で検討した。CalB を欠損するマウス由来の初代神経細胞においては、WT マウスの場合とは異なり、SUN11602 及び bFGF はいずれもグルタミン酸誘発神経細胞内 Ca^{2+} 上昇及び神経細胞傷害を抑制しなかった (Fig. 12, 13)。なお、SUN11602 の高濃度 (1, 3 μ M) による傷害抑制は、化合物由来の抗酸化活性により MTT が還元されたものと判断している。以上の結果は、SUN11602 は bFGF と同様、細胞内 Ca^{2+} ホメオスタシスの維持に関与する CalB の産生を亢進することによりグルタミン酸誘発神経細胞傷害を抑制することを示唆する。

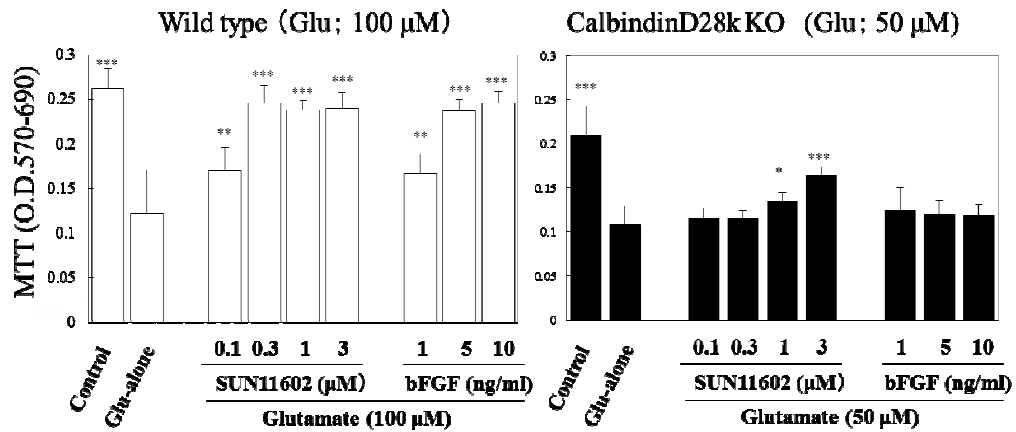


Fig. 12. Neuroprotective effects of SUN11602 and bFGF against glutamate-induced toxicity in primary cultures of cerebrocortical neurons from WT and Calb^{-/-} mice

Following the 24-h incubation with SUN11602 and bFGF, the cultures were exposed to either 100 μM or 50 μM of glutamate for another 24 h, and cell viability was then determined by a MTT assay. The toxic concentrations of glutamate (100 μM or 50 μM) were employed for which those concentrations were suitable for the cultures in order to react sensitively and appropriately. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, compared to the glutamate group (means \pm SEM, $n = 6$, Dunnett's multiple comparison test).

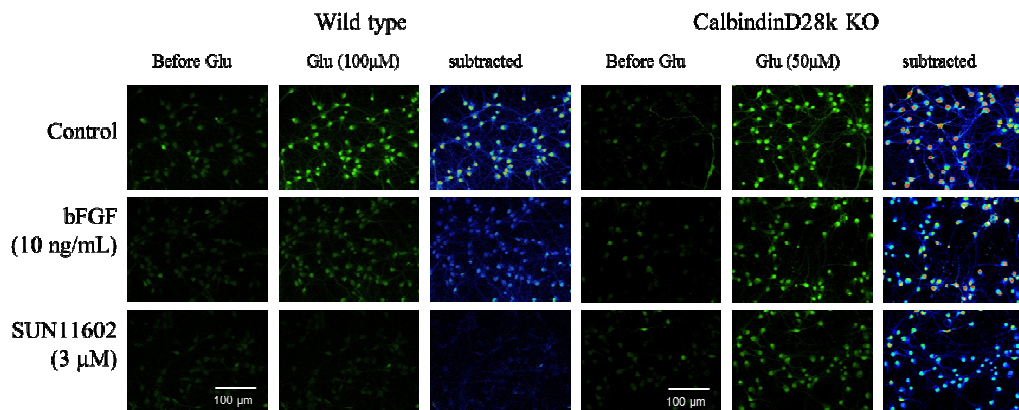


Fig. 13. Intracellular Ca²⁺ overload in primary cultures of cerebrocortical neurons from WT and Calb^{-/-} mice following a 5-min stimulation with glutamate (100 μM for WT, 50 μM for Calb^{-/-})

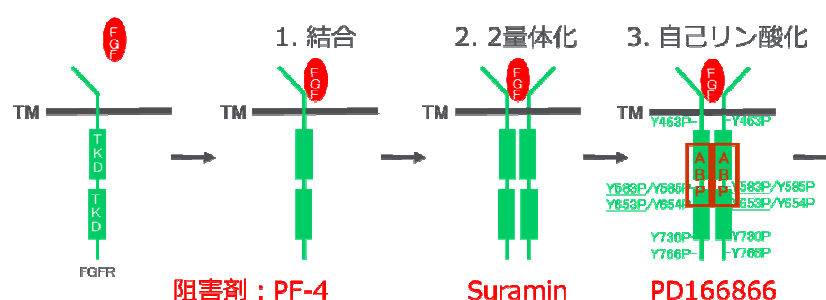
Basic FGF and SUN11602 were added to the cultures 1 day before glutamate stimulation. The fluctuations in the intracellular Ca²⁺ levels in the cultures were photographed with a laser confocal microscope with fluorescence indicators of free Ca²⁺ (fluo 3-AM). These data suggest, along with Fig. 11, that the physiological actions of bFGF and SUN11602 are closely associated with the regulators of intracellular Ca²⁺, especially Calbindin-D28k. All micrographs were taken under the same conditions and at the same magnification for comparison.

第4節 考察

第2章では、SUN11602 の FGF 受容体に対する作用及び神経細胞保護タンパク質を検討した結果、SUN11602 は FGF 受容体のリガンド結合部位には作用せず、FGF 受容体自己リン酸化に必須である受容体の二量体化を介せずに、FGF 受容体の Tyr キナーゼ活性化を亢進させた。その後、MEK/ERK のリン酸化シグナルカスケードを介し、細胞内カルシウム濃度の恒常性維持に係わるカルシウム結合タンパク質である CalB の産生を亢進することで、グルタミン酸誘発神経細胞傷害に対して保護作用を示すことが判明した。

本章の前半では、SUN11602 による FGF 受容体を介したシグナル伝達様式について検討した。Basic FGF は FGF 受容体に結合すると、受容体が二量体を形成し、細胞内ドメインの Tyr 残基をお互いにリン酸化 (pY653/654) する自己リン酸化を促し、その後ドメイン内の Tyr 残基 (pY583/585、pY463、pY730、pY766) が継続的にリン酸化されシグナル伝達が行われる^{61,62}。神経細胞の保護に関わる bFGF の細胞内シグナルカスケードとしては MEK/ERK 経路にてシグナルが伝達される⁶³⁻⁶⁷。そこで、各ステップの阻害剤として、PF-4⁶⁸、suramin⁶⁹ 及び PD166866 による SUN11602 の神経細胞保護作用の拮抗試験を行った。

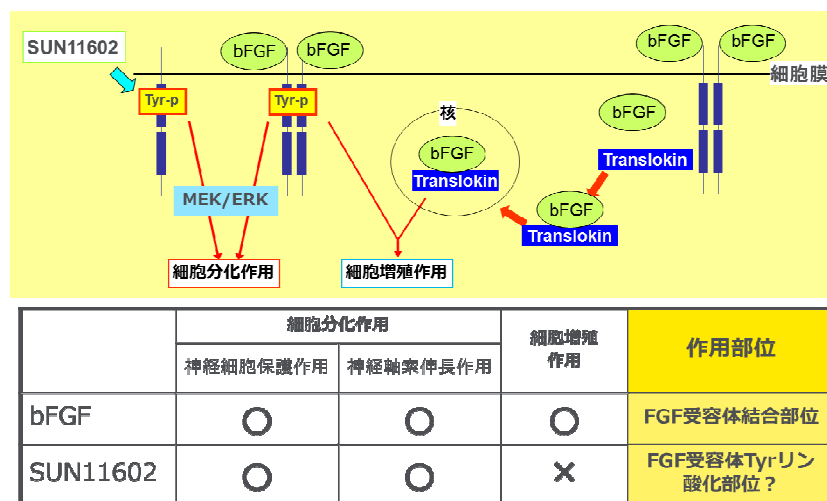
FGF受容体のシグナル伝達様式



PF-4	bFGFとFGF受容体の結合を阻害するantagonist
Suramin	膜上因子の流動性阻害剤
PD166866	FGF受容体Tyr kinase阻害剤 (FGFR ATP-binding pocket競合阻害)

SUN11602 は bFGF と異なり、FGF 受容体とのリガンド結合部位に作用せず、受容体の二量体化を介しなかった。また、^[125I]-bFGF を用いた結合試験においても PF-4 による阻害実験と整合する結果となった。SUN11602 の FGF 受容体への結合様式については不明であるが、SUN11602 が FGF 受容体リガンド結合部位に作用しないことが、細胞増殖作用を有せずに、bFGF 様の細胞分化作用のみを誘導する可能性も考えられる。また、FGF 受容体 Tyr キナーゼ阻害剤である PD166866 にて SUN11602 及び bFGF の神経細胞保護作用は阻害された。PD166866 の特異性評価については FGF 受容体 Tyr kinase 阻害剤と報告している論文^{48,49}では、細胞増殖活性及び血管新生活性を評価しており、神経細胞保護作用での精査が必要と考えた。神経細胞保護作用が報告されている因子及びアダプタータンパク質の受容体で Tyr kinase を有し、FGF 受容体 Tyr kinase domain と一次構造の Identity が 40% 以上ある受容体群、また、PD166866

の結合部位である ATP-binding pocket と高次構造が類似する受容体群から、Trk、INSR、EGFR、PDGFR、VEGFR を選出し、各リガンドによる神経細胞保護作用が PD166866 で阻害されるか否かを検討した。その結果、PD166866 の阻害作用は、FGF 受容体に限定されていた。以上の結果を基に、SUN11602 及び bFGF の保護作用には FGF 受容体の Tyr キナーゼ活性化が必須であると推定した。FGF 受容体活性化以降の細胞内シグナルカスケードとしては、神経細胞の生存に関わる MEK/ERK シグナル経路が活性化されることを、Western Blot 解析及び阻害剤にて検証した。現状の SUN11602 の作用メカニズムを下記の図にまとめた。



前章では、SUN11602 及び bFGF の神経細胞保護作用メカニズムは新規のタンパク質合成が必須であることを示した。本章後半では SUN11602 及び bFGF によって誘導される神経細胞保護タンパク質を CalB と同定した。

グルタミン酸は、神経細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させることで神経細胞傷害を誘発し、SUN11602 または bFGF は保護タンパク質を産生することによりグルタミン酸誘発神経細胞傷害を抑制する。そこで、細胞内 Ca^{2+} 上昇に対し緩衝作用を有するカルシウム結合タンパク質の一種である CalB 産生に注目した⁷⁰⁾。ラット初代培養神経細胞に対して SUN11602 及び bFGF は CalB 産生を亢進し、その亢進作用は保護作用と同様に PD166866 処置にて拮抗された。また、CalB KO マウス⁷¹⁾及び WT マウス由来の神経細胞を用いた検討により、ラットと同様に WT マウス由来の神経細胞において、SUN11602 及び bFGF は CalB 産生を亢進し、グルタミン酸誘発細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を抑制し神経細胞保護作用を示した。一方、CalB KO マウスの場合、細胞内 Ca^{2+} 上昇を抑制できず、神経細胞保護作用を示さなかった。つまり、SUN11602 は bFGF と同様に神経細胞内の CalB の産生を亢進することで細胞内カルシウム濃度の恒常性を維持し、急激な細胞内カルシウム濃度の上昇を抑制し、神経細胞保護作用を示していると考えられる。また、bFGF の保護タンパク質として、抗酸化酵素⁷²⁾や抗アポトーシスタンパク質⁷³⁾の産生亢進という報告もあるが、いずれの現象も細胞内 Ca^{2+} 上昇を抑制することで、抗酸化酵素であるカタラーゼの減少抑制や、抗アポトーシスタンパク質である Bcl-2 や Bax の減少抑制を介して細胞傷害を抑制することが可能と考えられる。

第5節 小括

第2章においては、SUN11602 の作用メカニズム解析の一環として、FGF 受容体への作用様式、シグナル伝達と神経細胞保護タンパク質 CalB の役割を検討した。SUN11602 は FGF 受容体のリガンド結合部位に作用しないこと、FGF 受容体自己リン酸化に必須である受容体の二量体化を介せずに、FGF 受容体の Tyr キナーゼ活性化を介して保護作用を示す。FGF 受容体以降のシグナルは、MEK/ERK のリン酸化シグナルカスケードを活性化し、細胞内カルシウム濃度の恒常性維持に係わるカルシウム結合タンパク質である CalB の産生を亢進することで、神経細胞保護作用を示すことが明らかとなった。

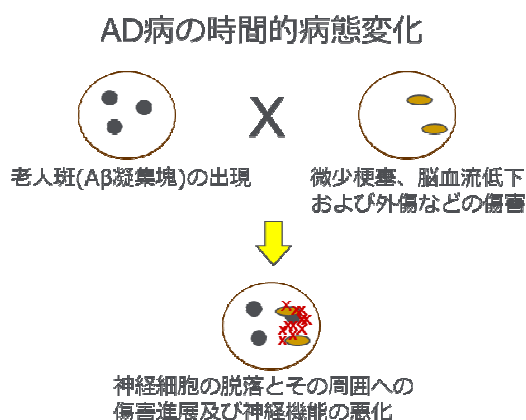
第3章 SUN11602 の *in vivo* 薬理作用

第1節 緒言

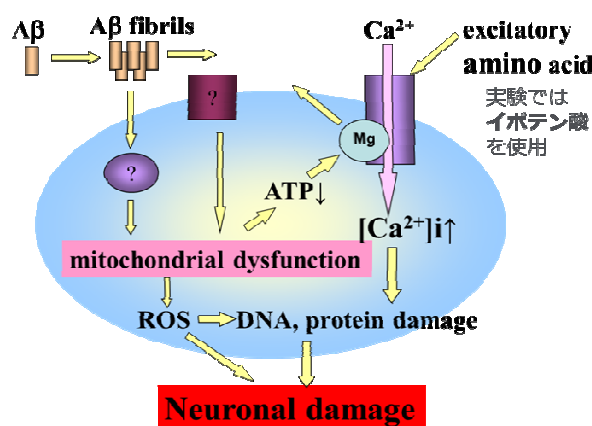
本章の目的は、SUN11602 の *in vivo* 神経傷害モデルを用いて薬理作用とその作用メカニズムを明らかにすることである。

(1) ラット神経傷害モデル概要

AD は 20～30 年かけて神経細胞が脱落し、神経機能が低下する慢性神経変性疾患であり、アミロイド沈着が神経細胞傷害に関与していると考えられている^{74,75)}。この時間的な病態変化を鑑み、既に沈着しているアミロイドの近傍でラクナ梗塞、脳血流低下、外傷等の何らかの傷害因子（グルタミン酸、hypoxia、hypoglycemia、炎症性サイトカイン等）が重なることにより傷害が進展し、周囲の神経細胞の脱落や神経機能の悪化が引き起こされる^{76,77)}。つまり、アミロイド沈着は、種々の傷害因子に対する神経細胞の脆弱性を高めていると考えられ、無毒性の A β 及びイボテン酸の組み合わせによる神経変性疾患モデルを構築した^{78,79)}。下記に傷害モデルの概念図を記す。



神経細胞内の状況を下記に示す。凝集 A β によりミトコンドリアの機能が低下し、細胞内 ATP が低下することにより NMDA 受容体の Mg チャネルの保持が困難になり、Mg が外れることで興奮性アミノ酸刺激による細胞内カルシウム流入が大きくなり、急激な細胞内 Ca²⁺ が上昇により、神経細胞傷害が誘発されることが考えられる⁸⁰⁾。



本概念で構築した傷害モデルは、Mg イオンと置換することによって神経細胞内の異常なカルシウム流入を防ぐことで AD 治療薬として上市されているメマンチンが奏効するモデルである⁷⁸⁾。

第2節 実験材料及び方法

(1) 凝集 $A\beta_{1-40}$ + イボテン酸海馬内注入モデル及び薬物投与

F344/DuCrj ラット (雄性) はチャールズリバー社、CalB KO マウス、WT マウス (C57BL/6J) はクレア社を通じて Jackson 社より入手し実験に供した。動物は 12 時間毎の明暗周期 (7 時から 19 時までが明期) の下で飼育され、餌と水は常に自由に摂取させた。行動実験等の動物を用いた作業はすべて 8 時 30 分から 16 時 30 分の間に行った。

ラット : 雄性 F344/DuCrj (Fischer) ラット (10 週齢) をペントバルビタール (40 mg/kg, i.p.; 東京化成工業) 麻酔下に脳定位固定装置に固定し、頭蓋骨露出後、ブレグマーマムダを水平にして両側海馬 (ブレグマより、後方 3.00 及び 4.50 mm、矢状逢合 (正中線) より左右それぞれ側方 2.00 及び 3.50 mm、ブレグマよりそれぞれ深さ 3.00 及び 3.50 mm の 4 箇所) に凝集 $A\beta_{1-40}$ ($A\beta_{1-40}$ (ペプチド研) を 2 μ M HCl/saline に溶解して 500 μ g/125 μ L 溶液を作製し、37°C で 4 日間インキュベートする) をインフュージョンポンプに接続した 10 μ L 用マイクロシリンジを介して、30 G の注射針にて 0.25 μ L/min の流速で 4 分間注入し (総量 : 4 μ g/1 μ L)、その後 2.5 分間留置させた。頭皮を縫合して術創を閉じ、2 日間正常飼育を行った後、同様に、同部位にイボテン酸 (0.3 μ g/0.5 μ L ; Sigma-Aldrich) を 0.125 μ L/min の流速で 4 分間注入し、2 分間留置させた。

マウス : CalB KO マウス及び WT マウス (8-9 週齢) をペントバルビタール (40 mg/kg, i.p.) 麻酔下に脳定位固定装置に固定し、頭蓋骨露出後、ブレグマーマムダを水平にして右側海馬 (ブレグマより、後方 2.00 mm、矢状逢合 (正中線) より右側 1.50 mm、ブレグマより深さ 1.00 mm) に凝集 $A\beta_{1-40}$ 及びイボテン酸をインフュージョンポンプに接続した 10 μ L 用マイクロシリンジを介して、34 G の注射針にて上記ラットと同様の処置を行った。

薬物投与 : SUN11602 (0.1, 0.3, 1, 3, 10 mg/kg)、bFGF (5, 25 ng/site) を、凝集 $A\beta_{1-40}$ 注入 24 時間後に SUN11602 は経口投与、bFGF は海馬内注入した。Vehicle 群には HBSS を同用法で投与した。

(2) 海馬領域神経細胞傷害評価

行動薬理実験終了後に、ラットをペントバルビタールにより安楽死させ、左側の海馬を分取して、-80°C に冷凍保存した。Demerle-Pallardy らの方法⁸¹⁾を用いて、グリオシスのマーカーである peripheral-type benzodiazepine-binding sites (PTBBS) 結合能を測定し、神経細胞傷害の程度を定量化した。分取した海馬を、重量比 40 倍の緩衝液 (50 mM Tris-HCl and 120 mM NaCl, pH 7.4.) を用いてホモジネートし、最終濃度として 2 nM の [3 H]-PK11195 ((1-(2-chlorophenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolinecarboxamide; 3163.5 GBq/mmol, NEN) を加え、25°C で 60 分間インキュベーションした。その後、直ちにグラスファイバー (GF/B ; Sigma-Aldrich) を用いて反応液をろ過し、5 mL の緩衝液にて 3 回洗浄し、グラスファイバーの放射活性を、液体シンチレーションカウンター (TRI-CARB 1900CA, Packard) を用いて測定した⁸²⁾。特異的結合は、全結合量から非特異的結合量を差し引くことにより算出した。さらに、Smith らの方法⁸³⁾を用いて蛋白濃度を測定し、蛋白量あたりの放射活性を fmol/mg protein 単位で算出した。

(3) Y 迷路学習試験

Y 迷路学習課題^{84, 85)}は、凝集 Aβ₁₋₄₀ 注入 32 日後より実施した。3 本の黒いアームを角度 120 度とした Y 迷路の一本のアームにラットを置き、8 分間自由に自発的交替行動 (spontaneous alternation) をさせ、3 本のアームに入る順序を記録した。ラットが各アームに進入した回数の合計を総エントリー数 (total arm entry) とし、この中で連続して異なる 3 つのアームを選択した回数を自発的交替行動率 (% alternation) として求めた。 $\% \text{ alternation} = \{\text{number of alternations} / (\text{total arm entries} - 2)\} \times 100$ 但し、総エントリー数が 11 以下のラットは実験群から削除した。

(4) モリス式水迷路学習試験

水迷路学習課題はモリスらの方法^{86, 87)}に従って実施した。水迷路装置は、直径 132 cm, 高さ 60 cm のステンレススチール製の円筒状水槽に深さ 45 cm までスキムミルクを溶かした乳白色の水 (温度 $24 \pm 2^\circ\text{C}$) を満たし、水槽を 4 等分したいずれかの四分円の中央の水面下 2 cm にアクリル製のプラットホーム (直径 10 cm) を設置し、実験期間中一定とした。水槽の周りには、ラットにとって視覚的手がかりとなるカレンダー、ケージ、コンピューター、白黒の図形等があり、実験期間を通じてこれらの配置は一定とした。

獲得試行は、凝集 Aβ₁₋₄₀ 注入 35 日後より実施し、ラットを 4 個所の出発点から無作為に水槽内に入水させ、ラットがプラットホームへ到達するまでの時間 (逃避潜時; escape latency) を測定した。ラットはプラットホーム上に 10 秒間放置した後ホームケージに戻した。ラットが 120 秒以内にプラットホームに到達できなかった場合は、ラットをプラットホームに移動させ 10 秒間放置し、逃避潜時は 120 秒とした。1 日 4 試行の訓練を 60 秒の試行間々隔で行い、これを連続して 4 日間実施した。

保持試行は、獲得試行終了 2 時間以降に、プラットホームを除去して再度 60 秒間水槽内を泳がせ、プラットホームのあった場所を横切る回数 (annulus crossings) を測定した。

なお、これらの水槽内でのラットの行動は video tracking system (VIOS-88, バイオメディカ) を用いて記録し、コンピューター (PC-9801, NEC) を用いて escape latency 及び annulus crossings 解析した。

(5) 統計解析

データは平均値±標準誤差で表示した。統計学的解析は、モリス式水迷路試験の獲得試行については二元配置分散分析、その他の測定については一元配置分散分析を行った後、sham 群と vehicle 群間で Student t 試験 (EXSUS Ver. 7.5.2) により行い、 $p < 0.05$ 以下のデータを統計学的に有意差があると判断した場合、実験系成立とした。評価群については Dunnett's multiple comparison tests (EXSUS Ver. 7.6) により行い、 $p < 0.05$ 以下のデータを統計学的に有意差があると判断した。

第3節 実験結果

(1) ラット神経傷害モデル構築

凝集 $A\beta_{1-40}$ 単独、グルタミン酸単独、または凝集 $A\beta_{1-40}$ とグルタミン酸の組合せによる神経細胞傷害誘発作用を検討した。凝集 $A\beta_{1-40}$ ($4\text{ }\mu\text{g}/1\text{ }\mu\text{L}$) 単独、またはイボテン酸 ($0.3\text{ }\mu\text{g}/0.5\text{ }\mu\text{L}$) 単独では、細胞傷害を起こさないことを確認し、無毒性量の凝集 $A\beta_{1-40}$ ($4\text{ }\mu\text{g}/1\text{ }\mu\text{L}$) を海馬領域に注入し、48 時間後に、無毒性量のイボテン酸 ($0.3\text{ }\mu\text{g}/0.5\text{ }\mu\text{L}$) を注入することにより相乗的に神経細胞傷害が生じる傷害モデルを作製し、傷害程度を Nissle's 染色による組織学的検討とグリオースのマーカーである PTBBS 結合能で定量的に測定した (Fig. 14)。なお、凝集 $A\beta_{1-40}$ とイボテン酸を同時添加しても傷害は誘導できなかった (Fig. 14)。本モデルをラット神経傷害モデルとし、SUN11602 及び bFGF の効果を検討した。

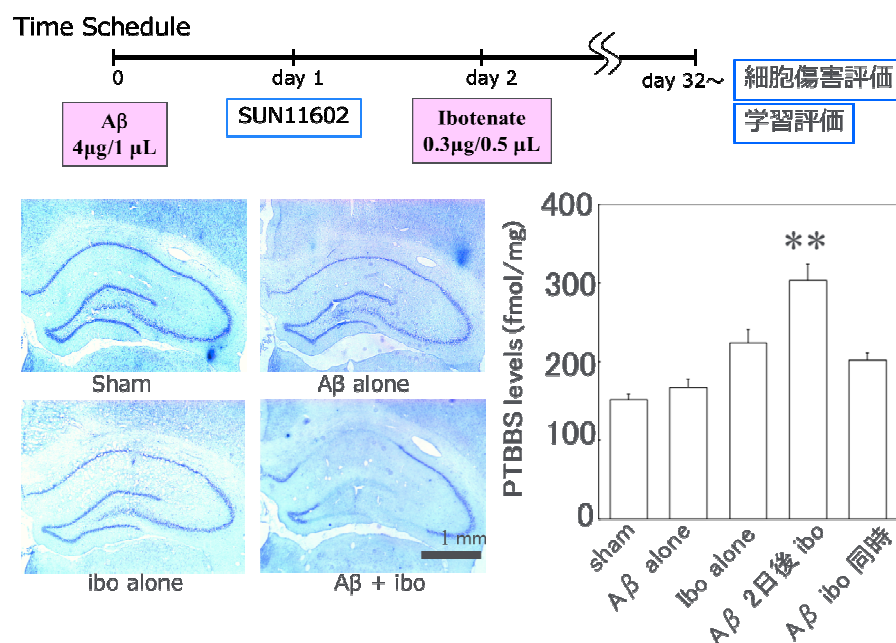


Fig. 14. Effects of intrahippocampal injections of $A\beta_{1-40}$ and ibotenate alone and in combination on neuronal damage in rats

On neuronal damage in the CA1 area of the right hippocampus in rats subjected to sequential injections of $A\beta_{1-40}$ and ibotenate into the hippocampus (Cresyl violet staining). Scale bar: 1 mm. Levels of the peripheral-type benzodiazepine-binding site in the left hippocampus 10 days after the injection of $A\beta_{1-40}$ were measured using [^3H] PK11195 as a specific radio-ligand. ** $P < 0.01$, compared to sham (mean \pm SEM, one-way or two-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test).

(2) ラット神経傷害モデルに対する SUN11602 の学習機能低下抑制作用

In vitro で bFGF 様の神経細胞保護作用及び軸索・突起伸長作用を有し、体内動態に優れた SUN11602 を経口投与することで生体内での神経細胞傷害を保護するか否かを本モデルにて検討した。最初に、Y 迷路及び水迷路学習試験にて神経細胞機能に対する SUN11602 の作用を検討した。

その結果、Y 迷路学習試験では凝集 $A\beta_{1-40}$ とイボテン酸のコンビネーションで自発的交替行動率が低下したが、SUN11602 (0.1, 1, 10 mg/kg) を凝集 $A\beta_{1-40}$ 注入の 24 時間後に経口投与することで、用量依存的に、1, 10 mg/kg では有意に短期学習障害 (空間的作業学習) が改善された (Fig. 15A)。また、総アームエントリー数は傷害ラットでも変化はなく、また SUN11602 投与による変化も認められなかった (Fig. 15B)。

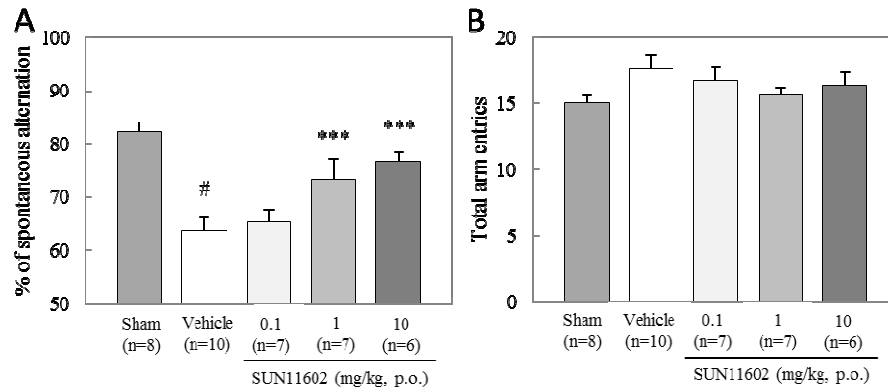


Fig. 15. Effects of SUN11602 on memory deficits in hippocampal-lesioned rats induced by sequential injections of $A\beta_{1-40}$ and ibotenate (Y-maze test)

(A) Percentage of spontaneous alterations. (B) Total arm entries. Each bar represents the mean \pm S.E.M. The rats that completed 11 arm entries or less during the test were excluded from the experiments. The number of rats used in the test is shown in parentheses. # $p < 0.05$ vs. the sham group; *** $p < 0.001$ vs. the vehicle group (Dunnett's multiple comparison test).

次に、海馬領域の学習機能として長期的空間学習を評価するためモリス式水迷路学習試験を実施した。その結果を Fig. 16 に示す。尚、各群での水泳速度に有意な差はなかった (data not shown)。Vehicle 群 (●) では、偽手術群 (○) に対し、いずれの測定日においても escape latency (逃避潜時) が有意に延長し、学習障害が誘導された (Fig. 16A)。SUN11602 (0.1mg/kg; ◆、1mg/kg; ▲、10 mg/kg; ■) を無毒性量の凝集 $A\beta_{1-40}$ 注入の 24 時間後に経口投与することで、1, 10 mg/kg 投与の場合、獲得試行 3 日目、4 日目の escape latency の延長が有意に抑制された (Fig.16A)。最終獲得試行終了の 2 時間後に行った保持試行においても、vehicle 群では、偽手術群 (sham 群) に対し、annulus crossing (プラットフォーム位置の横切り回数) が有意に低下したことから、学習障害が生じていた (Fig. 16B)。この annulus crossing の低下は、SUN11602 投与群で抑制され、SUN11602 が本モデルにおける学習障害を改善することが示唆された (Fig. 16B)。

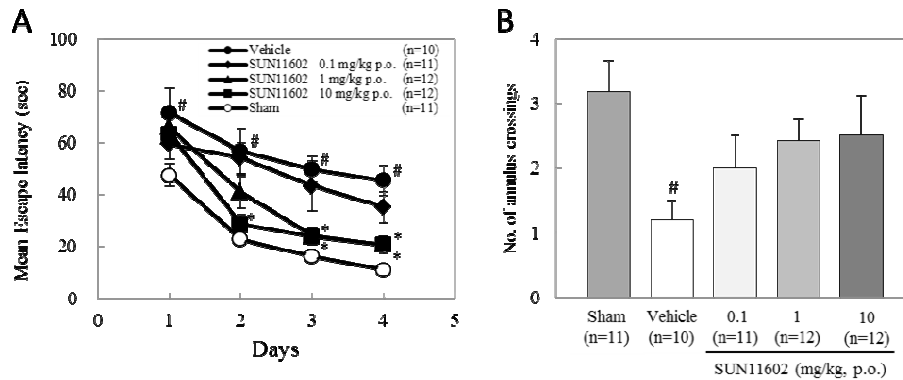


Fig. 16. Effects of SUN11602 on learning and memory deficits in hippocampal-lesioned rats induced by sequential injections of A β 1–40 and ibotenate (water maze task)

(A) Acquisition training was conducted over 4 consecutive days, as described in the Experimental Procedure, and MEL (the mean time required to escape onto the hidden platform) was measured as a marker of learning capacity. (B) A single probe trial was conducted 2 h after the final training session on day 38, and the number of crossings of the annulus, where the platform was located, was counted for 60 s and used as an index of memory retention. Data represent the mean \pm S.E.M. The number of rats used is indicated in parentheses. # p < 0.05 vs. the sham group (Student's t test); * p < 0.05 vs. the vehicle group (Dunnett's multiple comparison test).

(3) ラット神経傷害モデルに対する SUN11602 の神経細胞保護作用

神経細胞傷害後に集積するグリア細胞のマーカーである末梢性ベンゾジアゼピン結合部位 (PTBBS 結合) を測定することで神経細胞傷害を定量化した。学習評価終了後に海馬領域を摘出し、海馬領域の神経細胞傷害を測定した。その結果、凝集 A β 1–40 とイボテン酸のコンビネーションにより有意に神経細胞傷害が認められたが、SUN11602 (0.1, 1, 10 mg/kg) を凝集 A β 1–40 注入の 24 時間後に経口投与することで用量依存的に抑制し、1, 10 mg/kg では有意に傷害を抑制した (Fig. 17A)。また、Fig. 16A に示した水迷路学習試験での escape latency の合計時間を Y 軸に、神経細胞傷害である PTBBS 結合能を X 軸にしてプロットすると、海馬神経細胞傷害の程度と水迷路における escape latency の合計時間が相関した (相関係数: 0.73, Fig. 17B)。つまり SUN11602 の神経細胞保護作用により、学習機能の悪化を抑制することが示唆された。

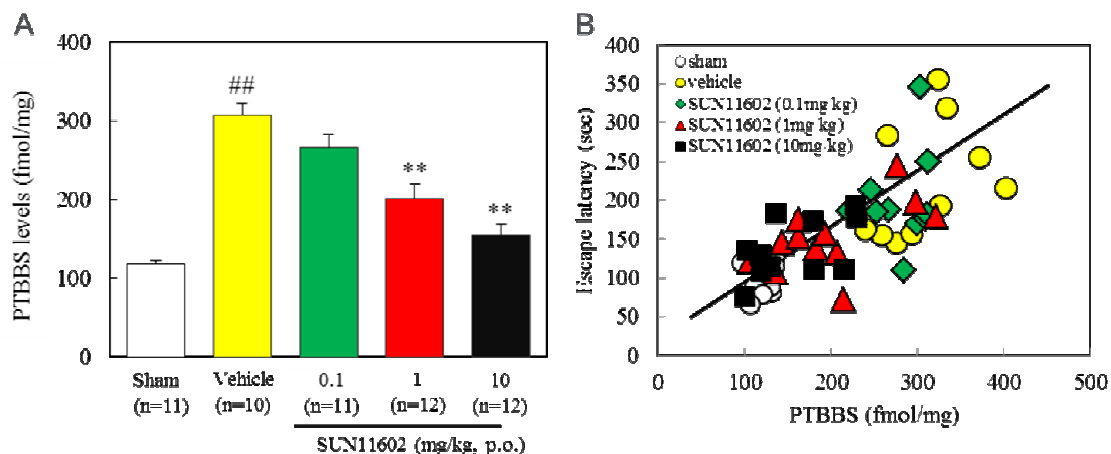


Fig. 17. Effect of SUN11602 on neuronal damage in hippocampal-lesioned rats induced by sequential injections of A β 1–40 and ibotenate

The number of PTBBS, as an index of gliosis, was measured in the hippocampus of rats after completion of the water maze task, as described in the Experimental Procedure. (a) Effect of SUN11602 on the numbers of PTBBS (mean \pm S.E.M.). ## $p < 0.01$ vs. the sham group (Student's t test); ** $p < 0.01$ vs. the vehicle group (Dunnett's multiple comparison test). The number of rats used is indicated in parentheses. (b) Correlation between PTBBS numbers and escape latency in the water maze task of each lesioned rat. Symbols show the data for each rat. The correlation coefficient (r) was 0.73.

(4) CalbindinD28k KO マウス傷害モデルでの SUN11602 の保護作用

第2章において、*in vitro* における SUN11602 及び bFGF の神経細胞保護作用のメカニズムとして、細胞内 Ca^{2+} ホメオスタシスの維持に関与する CalB の産生亢進に起因することを示した。そこで、*in vivo* モデルにおける SUN11602 の神経細胞保護作用が *in vitro* 同様に CalB 産生亢進に依存するものか否かを明らかにするため CalB KO マウスを使って検証した。その結果を Fig. 18 に示す。WT マウスでは、凝集 A β 1–40 とイボテン酸のコンビネーションによる神経細胞傷害が誘導され、経口投与した SUN11602 (1 mg/kg) 及び同海馬に微量注入した bFGF (25 ng) は有意に細胞傷害を抑制した (Fig. 18A, C)。一方、CalB KO マウスでは、WT マウスの場合とは異なり、SUN11602 及び bFGF は保護作用を示さなかった (Fig. 18B, D)。以上の結果は、SUN11602 の経口投与及び bFGF の海馬内注入で、海馬領域の CalB を産生亢進することで、凝集 A β 1–40 とイボテン酸のコンビネーションによる神経細胞傷害を抑制することを示した。

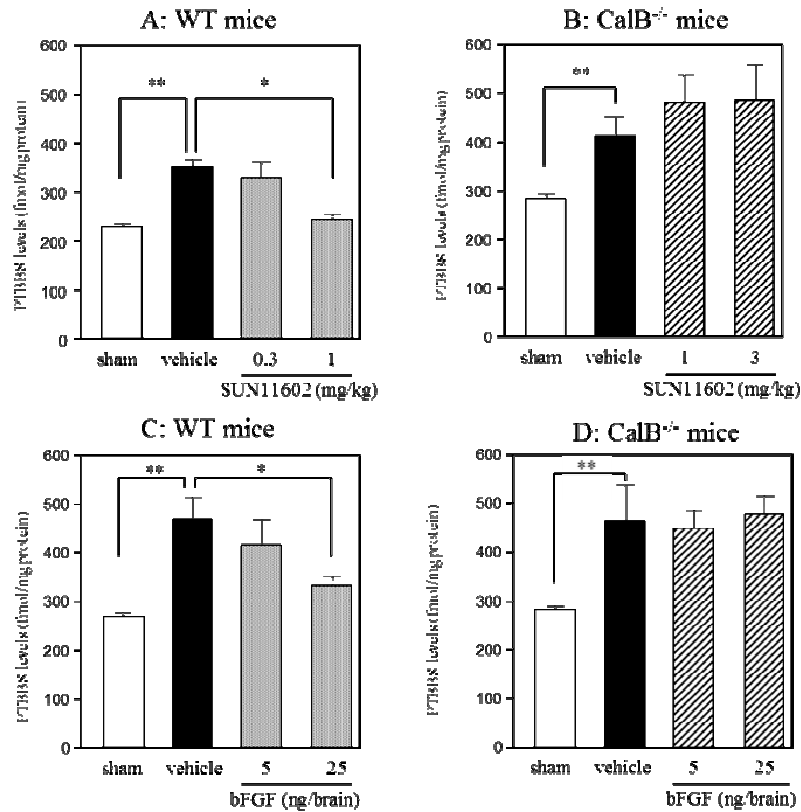


Fig. 18. Quantitative analysis of neural tissue damage by measurement of peripheral-type benzodiazepine-binding sites (PTBBS) in WT and CalB^{-/-} mice treated with A β 1-40 and ibotenate

According to the PTBBS analysis, hippocampal tissues of either WT or CalB^{-/-} mice were severely damaged by injection of A β 1-40 followed by ibotenate after a 48 h interval (A and D: solid columns/vehicle). When SUN11602 (oral administration) and bFGF (intrahippocampal injection) were administered at the mid-point of the 48 h interval, PTBBS values improved in WT mice, especially with higher doses (A and C: stippled columns). However, no corresponding improvements in PTBBS values were obtained in CalB^{-/-} mice (B and D: hatched line columns). The label “sham” denotes sham-operated mice. Each column represents mean \pm S.E.M.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, compared to the vehicle group (one-way ANOVA followed by t-test or Dunnett’s multiple comparison test).

第4節 考察

無傷害性量の凝集 $A\beta_{1-40}$ をラット海馬 CA1 領域に微量注入し、48 時間後に同部位に無傷害性量のイボテン酸を注入することによって、相乗的に神経細胞傷害を誘発するラット神経傷害モデルを作製し、SUN11602 の作用を評価した。その結果、凝集 $A\beta_{1-40}$ 及びイボテン酸の注入により海馬領域における PTBBS 結合部位（神経細胞傷害マーカー）が増加し、この増加は、凝集 $A\beta_{1-40}$ 注入 24 時間後に SUN11602 を経口投与することによって用量依存のかつ有意に抑制された。また、同モデル動物を用いて実施した行動学的評価（Y 迷路及び水迷路試験）の学習機能の低下は、SUN11602 を経口投与することにより用量依存的に改善した。CaIB 欠損マウスを用いて同様にマウス神経細胞傷害に対する SUN11602 及び bFGF の効果を検討したところ、WT マウスの場合とは異なり、SUN11602 及び bFGF は神経保護作用を示さなかった。

本章では *in vitro* で神経細胞保護作用が認められた SUN11602 の経口投与による *in vivo* モデルにおける神経細胞保護作用を検討した。慢性神経変性疾患である AD 等には確立されたモデルは存在せず、各研究所が仮説に基づくモデルを構築し、評価を実施している。すなわち、抗 AD 治療薬の開発にはモデル構築が成功の鍵を握るといえる。そこで、我々は、AD は凝集アミロイド沈着（老人斑）が関与していること、しかし、老人斑があっても神経機能障害を生じない高齢者の方々の存在すること、また、神経細胞の脱落が 20~30 年にかけて生じることを鑑み、この時間的な病態変化は、既に沈着しているアミロイドの近傍でラクナ梗塞、脳血流低下、外傷等の何らかの傷害因子（グルタミン酸、hypoxia、hypoglycemia、炎症性サイトカイン等）が重なることにより傷害が進展し、周囲の神経細胞の脱落や神経機能の悪化が引き起こされると想定した^{74,77)}。そこで、無毒性量の凝集 $A\beta_{1-40}$ を海馬領域に注入し、48 時間後に、無毒性量のイボテン酸を注入することにより相乗的に神経細胞傷害が生じる *in vivo* 神経傷害モデルを構築した^{78,79)}。また、本傷害モデルは、神経細胞内の異常なカルシウム流入を防ぐことで AD 治療薬として上市されているメマンチンが奏効するモデル⁷⁸⁾であることから AD 評価モデルとして位置づけている。

SUN11602 の用量設定は、ラットでの bioavailability が 68% であること、脳移行性（脳組織濃度/血漿中濃度）が 11% であることから、SUN11602 1 mg/kg の経口投与により脳組織濃度は約 2 μ M と想定される。*In vitro* の神経細胞保護作用が 0.1~3 μ M なので、*in vivo* モデルに対して SUN11602 を 0.1~10 mg/kg の経口投与を施した。

学習評価は Y 迷路及び水迷路学習試験を行った。Y 迷路は自発的な進路探索（自発的交替行動）において異なる 3 本のアームを連続して選択していく、すなわち、3 回目以降の選択をする際には少なくとも 2 回前までに選択したアームを記憶しておく必要があることから、作業学習を評価するものである。水迷路は、水中に入れられているストレスが罰刺激となり、プラットフォームへたどり着くと、泳がずに体を水面の上に保つことが可能となり、遊泳のモチベーションとなる。すなわち、報酬を目的とした空間記憶学習と考えられる。本モデルで生じる学習機能低下（Y 迷路、水迷路）に対して SUN11602 の経口投与は、用量依存的に抑制した。

学習悪化抑制作用が SUN11602 の神経細胞保護作用に起因するか否かを検討するためには、海馬領域の神経細胞保護作用を定量する必要がある。そこで、神経細胞が傷害を受け、傷害部位域に集積するグリア細胞を定量することとした。集積したグリア細胞の定量は、グリア細胞特異的に結合する peripheral-type benzodiazepine-binding sites (PTBBS) 結合量を測定した。その結果、SUN11602 経口投与により PTBBS 結合量は抑制され、海馬領域での集積グリア細胞数は抑制されたことから神経細胞傷害が抑制されたと結論される。また、水迷路での逃避潜時の合計と PTBBS 結合量が相関することから、SUN11602 の学習機能低下抑制作用は海馬領域の神経細胞傷害保護作用に起因することが示唆された。近年、AD 脳から抽出した可溶性 A β が、神経細胞傷害を惹起しない条件下で、学習・記憶に関与する long-term potentiation (LTP) やシナプス形を阻害することが示されている^{88,89)}。一方、bFGF は、海馬神経細胞の神経軸索・突起伸長や分岐形成を促進、及び長期増強を促進することが報告されている⁹⁰⁻⁹²⁾。これらの知見を考え合わせると、SUN11602 による学習・記憶機能の改善に神経細胞保護作用以外の神経軸索・突起伸長作用が関与している可能性も考えられる。

前章では、SUN11602 及び bFGF の *in vitro* 神経細胞保護作用メカニズムは新規のタンパク質として CalB の合成が必須であることを示した。本章後半では *in vivo* における SUN11602 の保護作用も CalB 発現上昇に起因することを CalB KO マウスを用いて証明した。CalB KO マウス及び WT マウスを用いた *in vivo* マウス傷害モデルにおいて、ラットと同様に凝集 A β_{1-40} とイボテン酸のコンビネーションによる神経細胞傷が誘導され、SUN11602 の経口投与及び bFGF の海馬内注入により神経細胞傷害が抑制された。つまり、凝集 A β_{1-40} により神経細胞の細胞内 ATP が低下し、Mg チャネルが外れ、NMDA 受容体の感受性が亢進しているところに、イボテン酸刺激により急速な細胞内カルシウムの上昇が生じ細胞が傷害を受ける。SUN11602 は bFGF と同様に神経細胞内の CalB の産生を亢進することで細胞内カルシウム濃度の恒常性を維持し、急激な細胞内カルシウム濃度の上昇を抑制し、神経細胞保護作用を示していると考えられる。

第5節 小括

第3章においては、ラット神経傷害モデルにおいて、SUN11602 は経口投与により、無毒性の凝集 $A\beta_{1-40}$ 及びイボテン酸によって惹起される神経細胞傷害から保護することで、学習機能障害を用量依存的に抑制した。SUN11602 の生体内での神経細胞保護作用は海馬神経細胞の CalB 産生亢進に起因することが示唆された。以上の知見は、SUN11602 は *in vitro* 評価と同様に、経口投与により細胞保護タンパク質である CalB の産生亢進を介して、神経細胞保護作用を有することを示唆するものである。

総括

本研究では、bFGF の多岐にわたる薬理作用に着目して、bFGF が超えられない臨床上の課題（高分子タンパク質のため血液-脳関門の透過性に限界があること、細胞増殖作用による炎症反応亢進や腫瘍化の懸念）を解決する低分子化合物 SUN11602 の *in vitro* 及び *in vivo* における薬理作用とその作用メカニズムを明らかにするとともに、bFGF との異同を解析した。

In vitro の作用メカニズム解析により、SUN11602 は FGF 受容体の Tyr キナーゼ活性化を介して、MEK/ERK のリン酸化シグナルカスケードを活性化し、細胞内カルシウム濃度の恒常性維持に係わるカルシウム結合タンパク質である CalB の産生を亢進することで bFGF 様の神経細胞保護作用を示すこと、神経軸索・突起伸長作用を有するが、細胞増殖作用を有しないこと、また、*in vivo* モデルでの解析により、SUN11602 の体内動態は良好で、経口投与によりラット及びマウス神経傷害モデルにおいて神経細胞保護作用を示し、この作用には CalB の産生が深く関与していることを明らかにすることができた。

本研究で得られた知見は、SUN11602 等の bFGF 様作用を有する低分子化合物の中核疾患治療薬としての有用性を示すとともに、bFGF の作用メカニズムの一端を明らかにするものである。

謝辞

本論文作成にあたり、有益な御指導と御鞭撻を賜りました京都薬科大学 山本 昌教授、中山祐治教授、大矢 進教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究を遂行する上で、御懇篤な御教示、御助言を戴きましたアスビオファーマ株式会社の福田好晃博士、井上照好氏、安田女子大学 森田泰博教授に心より感謝の意を表します。また、本研究に際し、貴重なご助言とご援助を戴きました岡哲志氏、竹本尚弘博士、上野新也博士、荻野涼子氏、野下敬史氏に心から感謝いたします。

また、本研究に御協力いただきましたアスビオファーマ株式会社の方々に厚くお礼申し上げます。

引用文献

1. Morrison RS, Sharma A, de Vellis J, Bradshaw RA. (1986) Basic fibroblast growth factor supports the survival of cerebral cortical neurons in primary culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 7537-7541.
2. Walicke P, Cowan WM, Ueno N, Baird A, Guillemin R. (1986) Fibroblast growth factor promotes survival of dissociated hippocampal neurons and enhances neurite extension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 3012-3016.
3. Sievers J, Hausmann B, Unsicker K, Berry M. (1987) Fibroblast growth factors promote the survival of adult rat retinal ganglion cells after transection of the optic nerve. *Neurosci. Lett.* 76, 157-162.
4. Walicke PA. (1997) Basic and acidic fibroblast growth factors have trophic effects on neurons from multiple CNS regions. *J. Neurosci.* 8, 2618-2627.
5. Beenken A, Mohammadi M. (2009) The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8, 235–253.
6. Honmou O, Houkin K, Matsunaga T, Niitsu Y, Ishiai S, Onodera R, Waxman SG, Kocsis JD. (2011) Intravenous administration of auto serum-expanded autologous mesenchymal stem cells in stroke. *Brain* 134, 1790-1807.
7. van den Brand R, Heutschi J, Barraud Q, DiGiovanna J, Bartholdi K, Huerlimann M, Friedli L, Vollenweider I, Moraud EM, Duis S, Dominici N, Micera S, Musienko P, Courtine G (2012) Restoring voluntary control of locomotion after paralyzing spinal cord injury. *Science* 336, 1182-1185.
8. Tashiro S, Shinozaki M, Mukaino M, Renault-Mihara F, Toyama Y, Liu M, Nakamura M, Okano H. (2014) BDNF induced by treadmill training contributes to the suppression of spasticity and allodynia after spinal cord injury via upregulation of KCC2. *Neurorehabil. Neural. Repair pii: 1545968314562110.*
9. Murayama N, Kadoshima T, Takemoto N, Kodama S, Toba T, Ogino R, Noshita T, Oka T, Ueno S, Kuroda M, Shimmyo Y, Morita Y, Inoue T. (2013) SUN11602, a novel aniline compound, mimics the neuroprotective mechanisms of basic fibroblast growth factor. *ACS Chem. Neurosci.* 4, 266-276.

10. Ogino R, Murayama M, Noshita T, Takemoto N, Toba T, Oka T, Narii N, Yoshida S, Ueno N, Inoue T (*These authors contributed equally to this work). (2014) SUN11602 has basic fibroblast growth factor-like activity and attenuates neuronal damage and cognitive deficits in a rat model of Alzheimer's disease induced by amyloid β and excitatory amino acids. *Brain Res.* 1585, 159-166.
11. Murayama N, Noshita T, Ogino R, Masuda T, Kadoshima T, Oka T, Ueno N, Takemoto N, Toba T, Ueno S, Schulze W, Igawa Y, Morita Y, Inoue T. (2015) SUN11602-induced hyperexpression of Calbindin D-28k is pivotal for the survival of hippocampal neurons under neurotoxic conditions. *Brain Res.* 1594, 71-81.
12. Motomura K, Hagiwara A, Komi-Kuramochi A, Hanyu Y, Honda E, Suzuki M, Kimura M, Oki J, Asada M, Sakaguchi N, Nakayama F, Akashi M, Imamura T. (2008) An FGF1:FGF2 chimeric growth factor exhibits universal FGF receptor specificity, enhanced stability and augmented activity useful for epithelial proliferation and radioprotection. *Biochim. Biophys. Acta.* 1780, 1432-1440.
13. Yoneda A, Asada M, Oda Y, Suzuki M, Imamura T. (2000) Engineering of an FGF-proteoglycan fusion protein with heparin-independent, mitogenic activity. *Nat. Biotechnol.* 18, 641-644.
14. Bogousslavsky J, Victor SJ, Salinas EO, Pallay A, Donnan GA, Fieschi C, Kaste M, Orgogozo JM, Chamorro A, Desmet A; European-Australian Fiblast (Trafermin) in Acute Stroke Group. (2002) Fiblast (trafermin) in acute stroke: results of the European-Australian phase II/III safety and efficacy trial. *Cerebrovasc. Dis.* 14, 239-251.
15. Adams HP Jr, Adams RJ, Brott T, del Zoppo GJ, Furlan A, Goldstein LB, Grubb RL, Higashida R, Kidwell C, Kwiatkowski TG, Marler JR, Hademenos GJ; Stroke Council of the American Stroke Association. (2003) Guidelines for the early management of patients with ischemic stroke: A scientific statement from the Stroke Council of the American Stroke Association. *Stroke* 34, 1056-83.
16. Zhang HY, Wang ZG, Wu FZ, Kong XX, Yang J, Lin BB, Zhu SP, Lin L, Gan CS, Fu XB, Li XK, Xu HZ, Xiao. (2013) Regulation of autophagy and ubiquitinated protein accumulation by bFGF promotes functional recovery and neural protection in a rat model of spinal cord injury. *Mol. Neurobiol.* 48, 452-464
17. Liu WG, Wang ZY, Huang ZS. (2011) Bone marrow-derived mesenchymal stem cells expressing the bFGF transgene promote axon regeneration and functional recovery after spinal cord injury in rats. *Neurol. Res.* 33, 686-693.

18. Zhang HY, Zhang X, Wang ZG, Shi HX, Wu FZ, Lin BB, Xu XL, Wang XJ, Fu XB, Li ZY, Shen CJ, Li XK, Xiao J (2013) Exogenous basic fibroblast growth factor inhibits ER stress-induced apoptosis and improves recovery from spinal cord injury. *CNS Neurosci. Ther.* 19, 20–29.
19. Meijs MF, Timmers L, Pearse DD, Tresco PA, Bates ML, Joosten EA, Bunge MB, Oudega M. (2004) Basic fibroblast growth factor promotes neuronal survival but not behavioral recovery in the transected and Schwann cell implanted rat thoracic spinal cord. *J. Neurotrauma* 21, 1415-1430.
20. Choi DW. (1998) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1, 623-634.
21. Mattson MP, Murrain M, Guthrie PB, Kater SB. (1989) Fibroblast growth factor and glutamate: opposing roles in the generation and degeneration of hippocampal neuroarchitecture. *J. Neurosci.* 9, 3728-3740.
22. Cheng B, Mattson MP. (1992) Glucose deprivation elicits neurofibrillary tangle-like antigenic changes in hippocampal neurons: prevention by NGF and bFGF. *Exp. Neurol.* 117, 114-123.
23. Mattson MP, Tomaselli KJ, Rydel RE. (1993) Calcium-destabilizing and neurodegenerative effects of aggregated beta-amyloid peptide are attenuated by basic FGF. *Brain Res.* 621, 35-49.
24. Sugimoto H, Nishino H. (1996) Effect of recombinant human basic fibroblast growth factor (bFGF) on the growth of human tumor cell lines. *Hum. Cell* 9, 129-140.
25. Imramovský A, Jorda R, Pauk K, Rezníčková E, Dušek J, Hanusek J, Kryštof V. (2013) Substituted 2-hydroxy-N-(arylalkyl)benzamides induce apoptosis in cancer cell lines. *Eur. J. Med. Chem.* 68, 253-259.
26. Imamura T, Engleka K, Zhan X, Tokita Y, Forough R, Roeder D, Jackson A, Maier JA, Hla T, Maciag T. (1990) Recovery of mitogenic activity of a growth factor mutant with a nuclear translocation sequence. *Science* 249, 1567-1570.
27. Wiedlocha A, Falnes PO, Madhus IH, Sandvig K, Olsnes S. (1994) Dual mode of signal transduction by externally added acidic fibroblast growth factor. *Cell* 76, 1039-1051.
28. Wiedlocha A, Falnes PO, Rapak A, Munoz R, Klingenberg O, Olsnes S. (1996) Stimulation of proliferation of a human osteosarcoma cell line by exogenous acidic fibroblast growth factor requires both activation of receptor tyrosine kinase and growth factor internalization. *Mol. Cell. Biol.* 16, 270-280.

29. Bossard C, Laurell H, Van den Berghe L, Meunier S, Zanibellato C, Prats H. (2003) Translokin is an intracellular mediator of bFGF trafficking. *Nat. Cell Biol.* 5, 433-439.
30. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. (2001) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 46, 3-26.
31. Winiwarter S, Bonham NM, Ax F, Hallberg A, Lennernäs H, Karlén A. (1998) Correlation of Human Jejunal Permeability (in Vivo) of Drugs with Experimentally and Theoretically Derived Parameters. A Multivariate Data Analysis Approach. *J. Med. Chem.* 41, 4939-4949.
32. Wager TT, Hou X, Verhoest PR, Villalobos A. (2010) Moving beyond rules: the development of a central nervous system multiparameter optimization (CNS MPO) approach to enable alignment of druglike properties. *ACS Chem. Neurosci.* 1, 435-449.
33. Lew ED, Furdui CM, Anderson KS, Schlessinger J. (2009) The precise sequence of FGF receptor autophosphorylation is kinetically driven and is disrupted by oncogenic mutations. *Sci. Signal* 2, ra6.
34. Klint P, Claesson-Welsh L. (1999) Signal transduction by fibroblast growth factor receptors. *Front Biosci.* 4, 165-177.
35. Klint P, Kanda S, Kloog Y, Claesson-Welsh L. (1999) Contribution of Src and Ras pathways in FGF-2 induced endothelial cell differentiation. *Oncogene* 18, 3354-3364.
36. Mattson MP. (2004) Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 430, 631-639.
37. Bezprozvanny I. (2009) Calcium signaling and neurodegenerative diseases. *Trends Mol. Med.* 15, 89-100
38. Schubert P, Ogata T, Marchini C, Ferroni S, Rudolphi K. (1997) Protective mechanisms of adenosine in neurons and glial cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 825, 1-10.
39. Mattson MP, Cheng B, Smith-Swintosky VL. (1993) Mechanisms of neurotrophic factor protection against calcium- and free radical-mediated excitotoxic injury: implications for treating neurodegenerative disorders. *Exp. Neurol.* 124, 89-95.
40. Rousseau E, Michel PP, Hirsch EC. (2013) The iron-binding protein lactoferrin protects vulnerable dopamine neurons from degeneration by preserving mitochondrial calcium homeostasis. *Mol. Pharmacol.* 84, 888-898.

41. Orrenius S, Nicotera P. (1994) The calcium ion and cell death. *J. Neural. Transm.* 43, 1-11.
42. Mao QQ, Zhong XM, Li ZY, Huang Z. (2011) Paeoniflorin protects against NMDA-induced neurotoxicity in PC12 cells via Ca²⁺ antagonism. *Phytother. Res.* 25, 681-685.
43. Wernyj RP, Mattson MP, Christakos S. (1999) Expression of calbindin-D28k in C6 glial cells stabilizes intracellular calcium levels and protects against apoptosis induced by calcium ionophore and amyloid beta-peptide. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 64, 69-79.
44. Zhen T. (1996) Calbindin D28k immunoreactivity in the cortex in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Res.* 2, 63-68.
45. Greene JR, Radenahmad N, Wilcock GK, Neal JW, Pearson RC. (2001) Accumulation of calbindin in cortical pyramidal cells with ageing; a putative protective mechanism which fails in Alzheimer's disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 27, 339-42.
46. Weldon DT, Rogers SD, Ghilardi JR, Finke MP, Cleary JP, O'Hare E, Esler WP, Maggio JE, Mantyh PW. (1998) Fibrillar beta-amyloid induces microglial phagocytosis, expression of inducible nitric oxide synthase, and loss of a select population of neurons in the rat CNS in vivo. *J. Neurosci.* 18, 2161-2173.
47. Hamby JM, Connolly CJ, Schroeder MC, Winters RT, Showalter HD, Panek RL, Major TC, Olsewski B, Ryan MJ, Dahring T, Lu GH, Keiser J, Amar A, Shen C, Kraker AJ, Slintak V, Nelson JM, Fry DW, Bradford L, Hallak H, Doherty AM. (1997) Structure-activity relationships for a novel series of pyrido[2,3-d]pyrimidine tyrosine kinase inhibitors. *J. Med. Chem.* 40, 2296-2303.
48. Panek RL, Lu GH, Dahring TK, Batley BL, Connolly C, Hamby JM, Brown KJ. (1998) In vitro biological characterization and antiangiogenic effects of PD 166866, a selective inhibitor of the FGF-1 receptor tyrosine kinase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 286, 569-577.
49. Mohammadi M, Froum S, Hamby JM, Schroeder MC, Panek RL, Lu GH, Eliseenkova AV, Green D, Schlessinger J, Hubbard SR. (1998) Crystal structure of an angiogenesis inhibitor bound to the FGF receptor tyrosine kinase domain. *EMBO J.* 17, 5896-5904.
50. Ablooglu AJ, Frankel M, Rusinova E, Ross JB, Kohanski RA. (2001) Multiple activation loop conformations and their regulatory properties in the insulin receptor's kinase domain. *J. Biol. Chem.* 276, 46933-46940.
51. Hubbard SR. (1997) Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex

- with peptide substrate and ATP analog. *EMBO J.* 16, 5572-5581.
52. Till JH, Ablooglu AJ, Frankel M, Bishop SM, Kohanski RA, Hubbard SR. (2001) Crystallographic and solution studies of an activation loop mutant of the insulin receptor tyrosine kinase: insights into kinase mechanism. *J. Biol. Chem.* 276, 10049-10055.
 53. Stamos J, Sliwkowski MX, Eigenbrot C. (2002) Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor. *J. Biol. Chem.* 277, 46265-46272.
 54. Oefner C, D'Arcy A, Winkler FK, Eggimann B, Hosang M. (1992) Crystal structure of human platelet-derived growth factor BB. *EMBO J.* 11, 3921-3926.
 55. Muller YA, Li B, Christinger HW, Wells JA, Cunningham BC, de Vos AM. (1997) Vascular endothelial growth factor: crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 7192-7197.
 56. Nourse MB, Rolle MW, Pabon LM, Murry CE. (2007) Selective control of endothelial cell proliferation with a synthetic dimerizer of FGF receptor-1. *Lab. Invest.* 87, 828-835.
 57. Mattson MP. (2008) Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1144, 97-112.
 58. Mohammadi M, Froum S, Hamby JM, Schroeder MC, Panek RL, Lu GH, Eliseenkova AV, Green D, Schlessinger J, Hubbard SR. (1998) Crystal structure of an angiogenesis inhibitor bound to the FGF receptor tyrosine kinase domain. *EMBO J.* 17, 5896-5904.
 59. Davis RJ. (1993) The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.* 268, 14553-14556.
 60. Seger R, Krebs EG (1995) The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* 9, 726-735.
 61. Kovalenko D, Yang X, Nadeau RJ, Harkins LK, Friesel R. (2003) Sef inhibits fibroblast growth factor signaling by inhibiting FGFR1 tyrosine phosphorylation and subsequent ERK activation. *J. Biol. Chem.* 278, 14087-14091.
 62. Zhang Y, Sawada T, Jing X, Yokote H, Yan X, Sakaguchi K. (2007) Regulation of ephexin1, a guanine nucleotide exchange factor of Rho family GTPases, by fibroblast growth factor receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 282, 31103-31112.

63. Cao Q, Qian M, Wang XF, Wang B, Wu HW, Zhu XJ, Wang YW, Guo J. (2011) Negative feedback regulation of Raf/MEK/ERK cascade after sublethal cerebral ischemia in the rat hippocampus. *Neurochem. Res.* 36, 153-162.
64. Ma Y, Liu W, Wang Y, Chao X, Qu Y, Wang K, Fei Z. (2011) VEGF protects rat cortical neurons from mechanical trauma injury induced apoptosis via the MEK/ERK pathway. *Brain Res. Bull.* 86, 441-446.
65. Creedon DJ, Johnson EM, Lawrence JC. (1996) Mitogen-activated protein kinase-independent pathways mediate the effects of nerve growth factor and cAMP on neuronal survival. *J. Biol. Chem.* 271, 20713-20718.
66. Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38MAP kinases on apoptosis. *Science* 270, 1326-1331.
67. Zheng WH, Quirion, R. (2004) Comparative signaling pathways of insulin-like growth factor-1 and brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons and the role of the PI3 kinase pathway in cell survival. *J. Neurochem.* 89, 844-852.
68. Perollet C, Han ZC, Savona C, Caen JP, Bikfalvi A. (1998) Platelet factor 4 modulates fibroblast growth factor 2 (FGF-2) activity and inhibits FGF-2 dimerization. *Blood* 91. 3289-3299.
69. Botta M, Manetti F, Corelli F. (2000) Fibroblast growth factors and their inhibitors. *Curr. Pharm. Des.* 6, 1897-1924.
70. Bouilleret V, Schwaller B, Schurmans S, Celio MR, Fritschy JM. (2000) Neurodegenerative and morphogenic changes in a mouse model of temporal lobe epilepsy do not depend on the expression of the calcium-binding proteins parvalbumin, calbindin, or calretinin. *Neuroscience* 97, 47-58.
71. Kook SY, Jeong H, Kang MJ, Park R, Shin HJ, Han SH, Son SM, Song H, Baik SH, Moon M, Yi EC, Hwang D, Mook-Jung I. (2014) Crucial role of calbindin-D28k in the pathogenesis of Alzheimer's disease mouse model. *Cell Death Differ.* 2014 21, 1575-87.
72. Liu X., Zhu XZ, Ji XQ. (1999) Effect of basic fibroblast growth factor on focal ischemic injury and antioxidant enzyme activities. *Zhongguo. Yao. Li. Xue. Bao.* 20, 227-231.
73. Tamatani M, Ogawa S, Nunez G, Tohyama M. (1998) Growth factors prevent changes in Bcl-2 and Bax expression and neuronal apoptosis induced by nitric oxide. *Cell Death Differ.* 5, 911-919.

74. Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, Carr T, Clemens J, Donaldson T, Gillespie F, Guide T, Hagopian S, Johnson-Wood K, Kham K, Lee M, Leibowitz P, Lieberburg I, Little S, Masliah E, McConlogue L, Montaya-Zavala M, Mucke L, Paganini L, Penniman E, Power M, Schenk D, Seubert P, Snyder B, Soriano F, Tan H, Vitale J, Wadsworth S, Wolozin B, Zhao J. (1995) Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F b-amyloid precursor protein. *Nature* 373, 523–527.
75. Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F, Cole G. (1996) Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274, 99–102.
76. Masliah E, Alford M, DeTeresa R, Mallory M, Hansen L. (1996) Deficient glutamate transport is associated with neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 40, 759-766.
77. Pomara N, Singh R, Deptula D, Chou JC, Schwartz MB, LeWitt P.A, (1992) Glutamate and other CSF amino acids in Alzheimer's disease. *Am. J. Psychiatry* 149, 251-254.
78. Nakamura S, Murayama N, Noshita T, Katsuragi R, Ohno T. (2006) Cognitive dysfunction induced by sequential injection of amyloid-beta and ibotenate into the bilateral hippocampus; protection by memantine and MK-801. *Eur. J. Pharmacol.* 548, 115-122.
79. Noshita, T, Murayama N, Oka T, Ogino, R, Nakamura S. Inou T. (2012) Effect of bFGF on neuronal damage induced by sequential treatment of amyloid beta and excitatory amino acid in vitro and in vivo. *Eur. J. Pharmacol.* 695, 76-82.
80. Mattson MP, Cheng B, Davis D, Bryant K, Lieberburg I, Rydel RE. (1992) beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J. Neurosci.* 12, 376-389.
81. Venneti S, Lopresti BJ, Wiley CA. (2006) The peripheral benzodiazepine receptor in microglia: from pathology to imaging. *Prog. Neurobiol.* 80, 308-322.
82. Demerle-Pallardy C, Duverger D, Spinnewyn B, Pirotzky E, Braquet P. (1991) Peripheral type benzodiazepine binding sites following transient forebrain ischemia in the rat: effect of neuroprotective drugs. *Brain Res.* 565, 312-320.
83. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry* 150, 76-85.

84. Conrad CD, Galea LA, Kuroda Y, McEwen BS. (1996) Chronic stress impairs rat spatial memory on the Y maze, and this effect is blocked by tianeptine pretreatment. *Behav Neurosci.* 110, 1321-34.
85. Conrad CD, Lupien SJ, Thanasoulis LC, McEwen BS. (1997) The effects of type I and type II corticosteroid receptor agonists on exploratory behavior and spatial memory in the Y-maze. *Brain Res.* 759, 76-83.
86. Logue SF, Paylor R, Wehner JM. (1997) Hippocampal lesions cause learning deficits in inbred mice in the Morris water maze and conditioned-fear task. *Behav. Neurosci.* 111, 104-13.
87. Morris R. (1981) Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learn Motiv.* 12, 239-260.
88. Barry AE, Klyubin I, Mc Donald JM, Mably AJ, Farrell MA, Scott M, Walsh DM, Rowan MJ. (2011) Alzheimer's disease brain-derived amyloid-beta-mediated inhibition of LTP in vivo is prevented by immunotargeting cellular prion protein. *J. Neurosci.* 31, 7259-7263.
89. Röncke R, Mikhaylova M, Röncke S, Meinhardt J, Schröder UH, Fändrich M, Reiser G, Kreutz MR, Reymann KG. (2011) Early neuronal dysfunction by amyloid beta oligomers depends on activation of NR2B-containing NMDA receptors. *Neurobiol. Aging* 32, 2219-2228.
90. Ikegaya Y, Itsukaichi-Nishida Y, Ishihara M, Tanaka D, Matsuki N. (2000) Distance of target search of isolated rat hippocampal neuron is about 150 microm. *Neuroscience* 97, 215-217.
91. Katsuki H, Itsukaichi Y, Matsuki N. (2000) Distinct signaling pathways involved in multiple effects of basic fibroblast growth factor on cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res.* 885, 240-250.
92. Ishiyama J, Saito H, Abe K. (1991) Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor promote the generation of long-term potentiation in the dentate gyrus of anaesthetized rats. *Neurosci. Res.* 12, 403-411.