

論文要旨

論文題目

ミトコンドリア機能調節に着目した神経細胞死抑制薬に関する研究

氏名 村松 裕子

高齢化が進む現代社会においては、虚血性脳疾患や神経変性疾患の罹患率の増加が予測されるが未だ根本治療薬はなく、発症を予防すること又は有効な治療薬を見出すことは、患者のQOLや家族の負担を改善させると共に医療経済上の急務である。

虚血性脳機能障害の場合、脳梗塞巣における神経細胞の脱落が原因となり、運動機能及び精神活動などの異常あるいは低下をもたらす。さらにパーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症(ALS)又はアルツハイマー病などの神経変性疾患は、脳・脊髄における特定のニューロン群が遺伝的・環境的因子の関与によって脱落し発症することが知られており、これらの疾患では共通して神経細胞死が中心的役割を果たしている。また、神経細胞死に先行してミトコンドリア膜電位低下とそれに引き続くミトコンドリア機能異常が観察されており、ミトコンドリア機能を維持する薬剤が有効な神経細胞保護薬と成り得ると考えられる。

本研究においては、ミトコンドリア膜電位低下及び細胞死を指標とし、ミトコンドリア機能調節に着目した神経保護薬創製の可能性について以下のような内容で検証した。

I. Thapsigargin によるミトコンドリア膜電位低下及び神経細胞死

小胞体の Ca^{2+} -ATPase を強力に阻害する thapsigargin は、細胞内カルシウム濃度の上昇を介してミトコンドリア膜透過性遷移(mitochondrial membrane permeability transition : MPT)を惹起し、その結果ミトコンドリア膜電位低下及び細胞死を誘導する。これらの現象は虚血時や神経変性疾患における神経細胞内環境をよく反映している。免疫抑制剤である FK506 や cyclosporin A が、各種脳梗塞モデル及び神経変性疾患において優れた神経保護作用を持つことが知られているが、これらの薬物は thapsigargin 誘導ミトコンドリア膜電位低下及び細胞死に対し、濃度依存的且つ有意な保護作用を示した。

このことから thapsigargin 誘発細胞死に対し神経保護作用を有する薬物は FK506 及び cyclosporin A と同様に虚血性脳疾患及び神経変性疾患において有効性を示す可能性があり、thapsigargin 誘発 in vitro 細胞死評価系及びミトコンドリア膜電位低下評価系は、神経保護薬の簡便且つ効率的なスクリーニング系として有用であると考えられる。II~IV 章では、thapsigargin 誘発細胞死を pivotal の評価系として虚血性脳疾患及び神経変性疾患治療薬の創製の可能性について検討した。

II. Thapsigargin によるミトコンドリア膜電位低下及び神経細胞死と免疫抑制剤 FR901459 の効果

カルシニューリン阻害剤である FK506 及び cyclosporin A の各種脳疾患に対する神経保護薬としての臨床使用は、その免疫抑制活性に伴う副作用により制限を受けることが懸念されることから、カルシニューリンを介さない神経保護薬の創製について検討した。ミトコンドリア膜透過性遷移(MPT)が惹起される際、ミトコンドリア膜上には蛋白複合体 MPT pore が形成され、ミトコンドリアからチトクローム C を放出し、アポトーシスが誘導される。Cyclosporin A は FK506 と同じカルシニューリン阻害によるメカニズム以外に、ミトコンドリア膜上の cyclophilin D を介した MPT pore 形成抑制により、細胞死を抑制する。Cyclosporin 誘導体である FR901459 は cyclosporin A よりも免疫抑制活性が約 6 倍弱く、一方 thapsigargin 誘発のマウス胸腺細胞ミトコンドリア膜電位低下及び SH-SY5Y 細胞死においては、強力な保護作用を示した。砂ネズミー過性全脳虚血モデル及びラット中大脳動脈閉塞再灌流モデルにおいても、有意な抑制又は抑制傾向を示し (図.1, 図.2)、MPT を介したミトコンドリア保護作用は、in vivo 脳梗塞モデルにおいて重要な役割を果たしていると考えられ、MPT を介したミトコンドリア機能の正常化は虚血性脳疾患に於ける創薬ターゲットと成り得る可能性が示された。

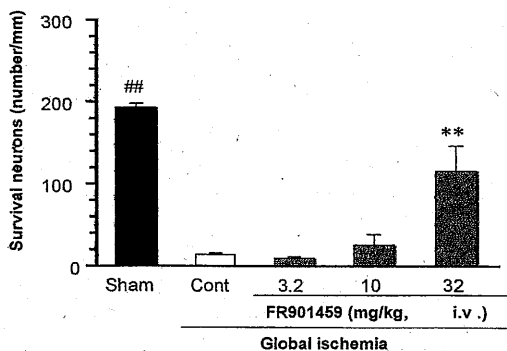


図.1 砂ネズミー過性全脳虚血モデルにおける FR901459 の効果 (**P<0.01, ##P<0.01)

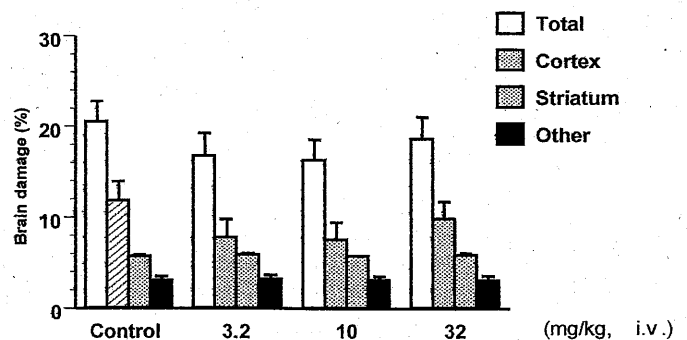


図.2 ラット中大脳動脈閉塞虚血再還流モデルにおける FR901459 の効果

III. ミトコンドリア膜電位調節剤 SCH-20148 の神経保護薬としての可能性検討

前章までの検討結果より、虚血などのストレス時における神経細胞死において、ミトコンドリア膜透過性遷移(MPT)の重要性が示唆されたことから、カルシニューリン阻害活性を介さないミトコンドリア膜電位調節に着目し検討した。

Thapsigargin で誘発されるミトコンドリア膜電位低下及び細胞死を指標とし、これらの作用を抑制する化合物探索から SCH-20148 を発見した。この化合物は、構造的には cox 阻害剤と類似性を有していた。

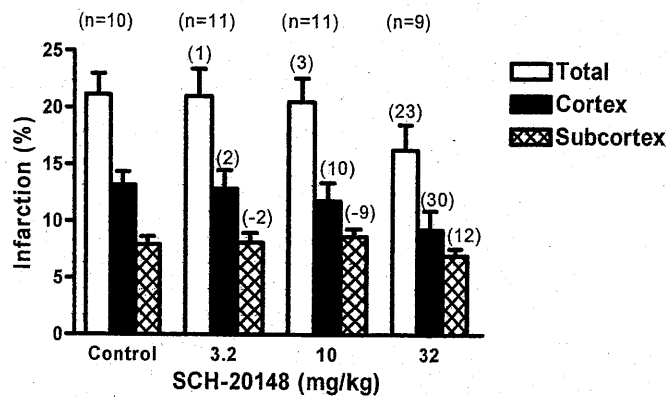


図.3 ラット中大脳動脈閉塞虚血再還流モデルにおける SCH-20148 の効果 (*P<0.05)

ミトコンドリア膜電位低下に対して保護作用を有する可能性が示された。ラット脳虚血-再灌流モデルにおいては、皮質部において 10mg/kg で約 10%、32mg/kg では 30%の有意な梗塞巣の縮小作用を示した。線条体においても、32mg/kg で約 12%の縮小が見られ、SCH-20148 は in vivo に於いても、用量依存的且つ有意に梗塞巣を減少させ有効性を示した (図.3)。

以上の検討結果から、SCH-20148 は免疫抑制活性を持たず、各種刺激によるミトコンドリア機能異常を抑制し、カルシニューリン阻害とは異なるメカニズムによる画期的な治療薬となり得る可能性が示された。

SCH-20148 は、免疫抑制作用を介さず、thapsigargin 処理で誘発されるミトコンドリア膜電位低下及び細胞死に対して保護作用を示した。さらに、SCH-20148 は A23187 及び ionomycin などの thapsigargin 以外の刺激においてもミトコンドリア膜電位低下に対して保護作用を示した。FK506 及び cyclosporin A は無効あるいは非常に弱い保護作用を示すのみであり、SCH-20148 は免疫抑制剤と比較して、より幅広いミトコ

IV. PPAR-δ アゴニストの脳梗塞並びにパーキンソン病治療薬としての可能性

PPAR サブタイプの中で、PPAR-α 及び PPAR-γ は脳梗塞モデルやパーキンソン病モデルに

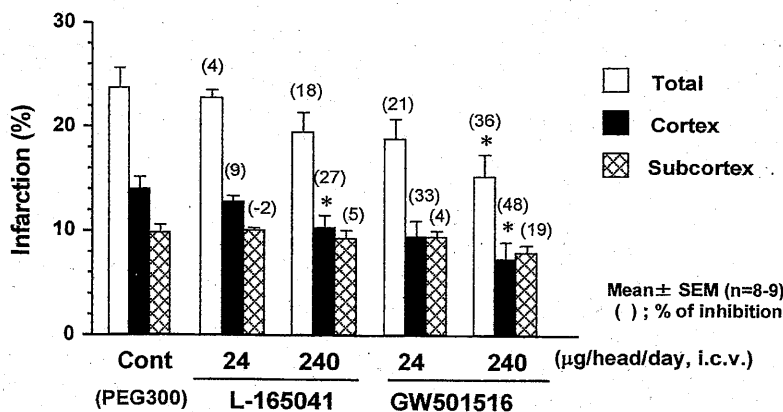


図.4 ラット中大脳動脈閉塞虚血再還流モデルにおける PPAR-δ の効果 (*P<0.05)

において抗炎症作用を介して有効であることが報告されている。PPAR-δ は神経細胞における発現が他の PPAR サブタイプに比べて多く神経系への寄与が期待できる。そこで PPAR-δ に選択的なアゴニストである L-165041 及び GW501516 を用いて、PPAR-δ アゴニストの神経保護作用を検討した。

PPAR-δ アゴニストは、thapsigargin 又は staurosporine 誘導 SH-SY5Y 細胞死に対し、濃度依存的な細胞死抑制効果を

示し、その効果は caspase-3 の活性化抑制を介したものであった。ラット脳梗塞モデルにおいては、用量依存的に虚血再灌流による梗塞巣を顕著に縮小させることが明らかとなった (図4)。

さらに PPAR- δ アゴニストの神経変性疾患への治療効果についても検討した。MPTP は合成麻薬生成時の副産物で、その摂取によりパーキンソン病と区別のつかない症状を呈することが知られている。MPTP は脳内に取り込まれた後、アストロサイトの中で monoamine oxidase B により MPP⁺ に代謝され、MPP⁺ はドーパミン作動ニューロンの細胞膜に存在するドーパミントランスポーターによって、ドーパミンニューロン内に取り込まれ、ミトコンドリアの電子伝達系の complex I を強力に阻害して毒性を発揮する。PPAR- δ アゴニストは、in vitro MPP⁺ 誘導神経細胞死に対し、濃度依存的且つ有意な細胞死抑制活性を示した。さらに、in vivo パーキンソン病モデルにおいては、MPTP による線条体ドーパミン及びその代謝物の含量低下を有意に抑制し、MPTP による黒質線条体ドーパミン神経細胞死を抑制した (図.5)。このとき L-165041 及び GW501516 のドーパ

ミン含量低下抑制の強度は、in vitro PPAR- δ アゴニスト作用の強度とよく相関していた。

PPAR- δ が、脳梗塞及びパーキンソン病など神経変性疾患の発症と直接関連することを示した報告は無く、今回初めて PPAR- δ アゴニストの虚血性脳機能障害やパーキンソン病を始めとする神経変性疾患の治療薬としての可能性が示された。

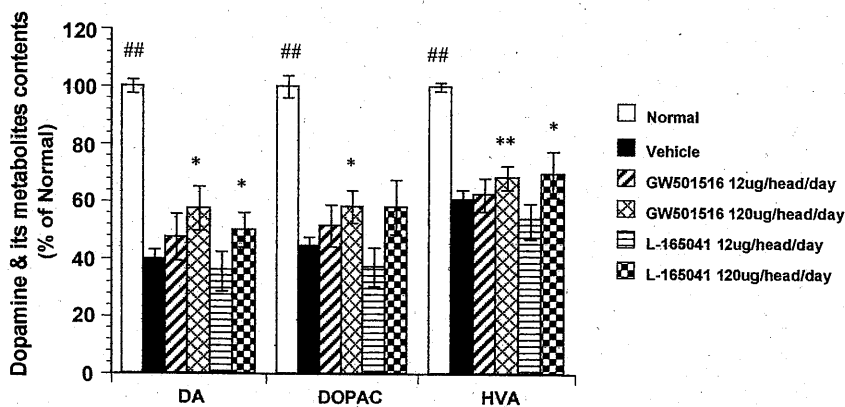


図.5 マウス MPTP モデルにおける PPAR- δ の効果

(* , P<0.05, ** , P<0.01, ## , P<0.01)

結語

カルシニューリン阻害による多臓器への副作用の懸念があるものの強力な神経細胞保護作用を示す免疫抑制剤のミトコンドリア機能異常に対する作用の検討から展開した本研究により、虚血性脳機能障害や神経変性疾患を適応とする新たな創薬の方向性が示され、新規ミトコンドリア膜電位調節薬及び PPAR- δ 作動薬が神経細胞死抑制作用を示すことを見出した。

本研究は、脳梗塞及び神経変性疾患治療薬の開発において新たな方向性を示す重要な知見を提供するものである。