

審査の結果の要旨

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、患者や家族の QOL を向上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。

1. 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 permeability transition : MPT)を惹起し、その結果ミトコンドリア膜電位低下を誘導する。thapsigargin はマウス胸腺細胞においてミトコンドリア膜電位低下を誘発するとともに、ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞及びラット初代培養神経細胞において細胞死を誘導することを確認し、神経細胞障害時を反映した細胞内環境を再現するモデルになると考えられた。

免疫抑制剤である FK506 や cyclosporin A が、各種脳梗塞モデルで著効を示し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。

これらの結果から thapsigargin により誘導される細胞内カルシウム濃度の上昇及びミトコンドリア膜電位低下などの細胞内環境を改善する薬物は、虚血性脳機能障害の有効な治療薬と成り得る可能性が示された。

2. 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薬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 A 誘導体である FR901459 は cyclosporin A よりも免疫抑制活性が約 1/6 しかなく、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 細胞死において強力な保護作用を示した。砂ネズミ一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、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。

3. 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

以上の検討結果より、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、さらに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、シェーリング社とのケミカルライブラリー交換サンプルの中から探索した、下痢を適用とする古い公知物質で、構造的には cox 阻害剤と類似性を有していた。

SCH-20148 は、免疫抑制作用を示さず、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有することが明らかとなった。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、thapsigargin 以外の刺激において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。

これらのことから、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。

4. 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

カルシニューリンは、アポトーシス調節蛋白である Bcl-2 や Bad の脱リン酸化による細胞死調節因子として重要であることから、カルシニューリンを介さない Bad 調節因子に着目した。核内受容体の 1 つである PPAR は種々の遺伝子発現制御に関与しており、サブタイプの一つである PPAR- δ の活性化は 14-3-3 タンパクの発現を上昇させ、リン酸化 Bad への結合を介して細胞死を抑制する可能性がある。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 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。

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、黒質線条体ドーパミン神経細胞保護作用を示した。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。

本研究では、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、虚血性脳機能障害や神経変性疾患を適応とする幾つかの新たな創薬の方向性を示した。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の疾病解明と治療薬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り、博士(薬学)の学位に値すると判断した。