

論文の内容の要旨

論文題目 免疫抑制作用を持たないニューロフィリンリガンドに関する研究
: 神経再生促進作用と神経障害改善作用

氏 名 山 崎 俊 司

強力な免疫抑制作用を有するタクロリムス（コード名；FK506）は、1984年筑波山の土壌より発見された放線菌の一種で *Streptomyces tuskubaensis* から単離・精製された23員環マクロライドである。1993年に臨床応用されて以来、移植後の拒絶反応を抑制し、臓器の定着率を向上させ、移植手術の成功率の改善に貢献している。これまでの研究により、タクロリムスは細胞内に豊富に存在するFK506結合タンパク質（FKBP）と複合体を形成して、カルシニューリンの活性を阻害し、転写因子NF-ATの核内移行を阻害して、インターロイキン-2（IL-2）等のサイトカインの産生を抑制することにより免疫抑制作用を示していることが明らかとなっている。一方、FKBPは免疫系よりむしろ神経系において豊富に存在している。このことは、神経系においてFKBPは重要な役割を担っていることが推測され、これまでに数多くの研究が実施されてきた。タクロリムスは、FKBP12と複合体を形成して神経保護作用を、FKBP52と複合体を形成して神経栄養作用を示すことが報告されている。その神経栄養作用により慢性神経変性疾患に対する治療効果が期待されるが、強い免疫抑制作用のため、長期間の反復投与では易感染性が危惧される。

神経変性疾患は、中枢神経の特定の神経細胞が徐々に死んでいく疾患の総称であり、代表的な神経変性疾患としてパーキンソン病・アルツハイマー型痴呆・筋萎縮性側索硬化症などが知られている。これらの疾患の成因仮説は諸説あるものの、いずれの疾患においてもそれぞれ特定の神経細胞の脱落が認められ、その治療には、細胞死抑制による病態の進行抑制と細胞再生促進による病態の改善の方針が採られる。これら神経変性疾患の治療には、神経幹細胞、ドパミン産生などの特定の機能を有する細胞や神経栄養因子を産生する細胞の移植による再生医療が試みられている。細胞移植は、移植技術、細胞生着に加え、倫理的な問題を

克服しなければならず難易度は高い。一方、薬剤処置による既存細胞の機能亢進、神経線維の伸展促進は、前述の問題を克服しうる再生医療として期待度が高い。糖尿病性末梢神経障害は、糖尿病の三大合併症の一つであり、長期にわたり高血糖に晒された末梢神経の神経変性疾患と考えられる。また、脳梗塞や脊髄損傷のような神経障害性の疾患においても、細胞死抑制とともに神経再生による機能改善を目指した治療が試みられている。

著者らは強力な免疫抑制薬であるタクロリムスを開発した経験を生かし、類縁化合物の中から神経栄養作用のみを有する化合物を同定することを試みた。神経成長因子 (NGF) などの神経栄養因子は高分子のため経口吸収性が悪く、また非特異的な神経栄養活性による副作用のため臨床での使用が制限される。一方、神経栄養作用を有する低分子化合物は、吸収・分布が改善され神経変性疾患の治療薬になりうると考えて、本研究を開始した。本論文では、FK506 誘導体の中から見出した免疫抑制作用を持たない新規ニューロフィリンリガンドである FK1706 の神経栄養作用及びその作用機序を、またさらに FK1706 の末梢神経障害治療薬および脊髄損傷治療薬としての可能性についての研究を行った成果を記述した。すなわち、FK1706 の神経栄養作用ならびに細胞内標的タンパクおよび情報伝達系について神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を用いて NGF による神経突起伸展を指標に検討した。また、種々のラット末梢神経障害モデルを用いて痛覚閾値改善作用・運動機能障害改善作用とともに組織形態の改善作用について検討し、さらに二つの脊髄損傷モデルにおける運動機能障害改善作用および損傷周辺部の神経軸索の形態変化改善作用についての検討結果をまとめた。さらに、末梢神経障害モデルと脊髄打撲損傷モデルのそれぞれ脊髄後根神経節と損傷部位脊髄における網羅的遺伝子発現解析を実施し、薬理作用を裏付ける遺伝子群の同定を試みた。

本研究を通じて、以下に示す新たな重要な知見を得た。

1. 免疫抑制作用を持たず、神経栄養作用を有するタクロリムス誘導体の FK1706 を見出した (Figure 1)。
FK1706 は、神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を用いた *in vitro* 評価系において、NGF 誘発神経突起伸展を増強することを見出した。さらに、この作用は抗 FKBP52 抗体の添加により消失することが明らかとなった。また、FK1706 の神経突起進展増強作用は、PLC, PI3K, Ras, Raf, MEK の特異的阻害薬の添加により消失したことから、Ras/Raf/MEK/ERK を介した反応であると推察された。FK1706 の神経突起進展増強作用を示す条件において、ERK1/2 のリン酸化が亢進されることを明らかとした。すなわち FK1706 は、FKBP52 と結合して、Ras/Raf/MEK/ERK 系を活性化することにより、NGF の細胞内シグナル増強を介し、神経突起進展増強作用（神経栄養作用）を示すユニークな化合物であることを見出した。その作用には、FKBP-52 との結合が重要であること、また Ras/Raf/MAPK 経路が関与していることを明らかとした。さらに、FK1706 単独では突起伸展作用を示さないことから、NGF 等の神経栄養因子の作用を増強していることが示唆された。
2. FK1706 は、ストレプトゾトシン (STZ) 誘発糖尿病性末梢神経障害モデルにおける痛覚異常や運動機能障害の改善作用を有することを見出した。この改善効果は、FK1706 の投与を中止した後も 4 週間にわたりその効果が持続した。STZ 誘発糖尿病性末梢神経障害モデルでは、糖尿病性末梢神経障

害患者と同様に、表皮末梢神経線維密度の低下が認められ、FK1706 は同モデルにおける神経密度の低下を改善し、痛覚異常、運動機能障害とともに、形態変化の改善作用を有することを明らかにした。FK1706 とガバペンチンとの併用投与による検討では、それぞれの単独投与による痛覚閾値改善の上乗せ効果が確認され、FK1706 の痛覚閾値改善作用はガバペンチンとは異なるメカニズムによるものと推察された。

3. FK1706 は、ラット脊髄半切損傷モデルおよび打撲損傷モデルにおける運動機能障害の改善作用を有することを明らかとした。さらに、打撲損傷モデルにおいては、障害部位近傍の神経軸索の形状を改善した。また、投与開始を 1 週間遅らせても運動機能障害を改善することから、障害初期の急性変化に対して適切な処置を施した後から、FK1706 の投与を開始できるものと期待される。
4. STZ 誘発糖尿病性末梢神経障害モデルおよび脊髄打撲損傷モデルにおける機能改善および形態改善作用のメカニズムを推定するために網羅的遺伝子発現解析を行った。末梢神経障害モデルでは脊髄後根神経節細胞の構造タンパクや細胞内構成タンパク、細胞外マトリックス等突起伸展・分枝を示唆する候補遺伝子が多数抽出された。脊髄損傷モデルでは、軸索伸展や損傷治癒に関連する候補遺伝子を変動させ、これらの因子が FK1706 の薬効発現に重要であることが示唆された。

以上、タクロリムス類縁化合物の中から免疫抑制作用を有さず、内在性神経栄養因子の作用を増強し、糖尿病性末梢神経障害モデルおよび脊髄損傷モデルにおいて、神経の形態改善を伴い運動機能を改善する低分子化合物 FK1706 を新たに見出すことができた。このような特徴を有する低分子化合物は、本来生体が持つ自己修復能を増幅し、糖尿病性末梢神経障害や脊髄損傷などの神経変性疾患に対する治療薬になりうると考えられた。またさらに、将来 FK1706 の糖尿病性末梢神経障害や脊髄損傷の機能回復の作用機序を解明することにより、さらに改良された化合物が見出されることが期待される。

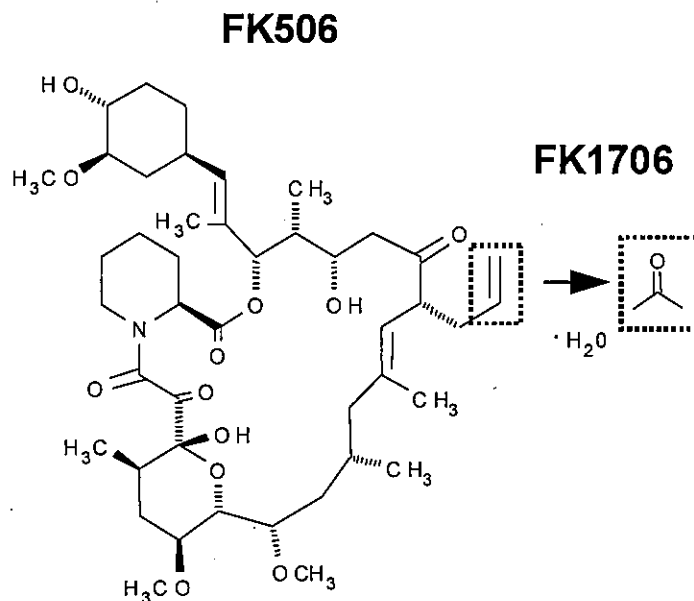


Figure 1. Chemical structure of FK1706.

Boxed area indicates changed moiety from FK506.

(1*R*,9*S*,12*S*,13*R*,14*S*,17*R*,18*E*,21*S*,23*S*,24*R*,25*S*,27*R*)-1,14-dihydroxy-12- $\{$ (*E*)-2-[(1*R*,3*R*,4*R*)-4-hydroxy-3-methoxycyclohexyl]-1-methylvinyl $\}$ -23,25-dimethoxy-13,19,21,27-tetramethyl-17-(2-oxopropyl)-11,28-dioxa-4-azatricyclo[22.3.1.0^{4,9}]octacos-18-ene-2,3,10,16-tetrone