

厚生省科学研究費補助金（脳科学研究事業）
研究報告書

課題名：神経栄養因子の産生調節による神経細胞の
保護・機能修復に関する研究

主任研究者：古川昭栄（岐阜薬科大学）

分担研究者：葛谷昌之（岐阜薬科大学）

広田耕作（岐阜薬科大学）

渡辺里仁（創価大学生命科学研究所）

厚生省科学研究費補助金（脳科学研究事業）
（総括）研究報告書

神経栄養因子の産生調節による神経細胞の保護・機能修復に関する研究

主任研究者 古川昭栄 岐阜薬科大学・薬学部・教授

研究要旨

脳由来神経栄養因子(BDNF)やグリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)の産生を促進する化合物を開発しこれらを脳神経疾患の治療薬として応用するための基礎的研究を行う。本年度は、1) BDNF、GDNFの産生を促進する低分子化合物のin vitro, in vivo検索、2) 既知活性化合物を脳に移行させるための化学修飾及びドラッグデリバリーシステムの検討、3) 脳への遺伝子移入のためのウイルスベクターの開発、などを行った。その結果、1) カルシウムイオン関連化合物、神経伝達物質関連化合物、ビタミン類、カテコール化合物および免疫抑制剤が培養ラット神経細胞のBDNF又は/及びGDNF産生を促進すること、2) そのうちの4-メチルカテコールや免疫抑制剤をラットに末梢投与すると脳内BDNFの発現が増加し神経機能が高まることを明らかにし、3) 4-メチルカテコールの脳・血液関門通過性能を高めた高分子プロドラッグの創製、4) 発現効率のよいレトロウイルスベクターの構築、に成功した。

分担研究者氏名・所属施設・職名

葛谷昌之・岐阜薬科大学・教授、学長
広田耕作・岐阜薬科大学・教授
渡辺里仁・創価大学・教授

因子産生誘導を検討した。産生誘導の標的とする神経栄養因子として作用スペクトルの広い脳由来神経栄養因子(BDNF)および比活性の強いグリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)を選んだ。

A. 研究目的

パーキンソン病、ハンチントン舞踏病、小脳変性症などの特定の脳神経細胞が死滅する疾病の多くは原因不明であり抜本的な治療法がない。これまでに脳疾患モデル動物の脳に神経栄養因子を投与すると神経細胞の変性や脱落が抑制され、神経機能も回復することが報告されている。すなわち神経栄養因子には神経細胞の変性・脱落を抑制、神経機能を修復・再建する作用がある。このため神経栄養因子は脳神経変性疾患の治療薬として有望視されているがタンパク質であり血流中で分解されやすい上に脳・血液関門を通過できないことから、末梢投与による効果は期待出来ない。しかしながら脳に神経栄養因子を直接注入することは倫理的・技術的に大きな制約を受ける。

そこで本研究では、1) 神経栄養因子の産生を促進する新規低分子化合物を検索(古川)、2) 既知活性化合物を脳に移行させるための化学修飾法の検討(広田)、3) 同じくドラッグデリバリーシステムの確立(葛谷)、4) 脳への遺伝子移入のためのウイルスベクターの開発(渡辺)、などの方策によって脳での神経栄養

B. 研究方法

1. 神経栄養因子産生促進活性の評価

BDNFおよびGDNFの高感度酵素免疫測定法、各mRNAのRT-PCR法を評価手段として培養神経細胞およびラット脳におけるBDNFおよびGDNFの産生促進効果を種々の候補化合物について検討した。

2. 活性化合物の化学修飾

強いBDNF産生促進活性をもつ4MCについて、脳・血液関門通過性を高めるためジヒドロピリジン基を4MCの二つの水酸基にエステルとして導入し脳内移行後加水分解されることによって脳内に滞留するようデザインした。

3. 活性化合物の物理化学的修飾

4MCを1-ベンゾイル化したのち2-メタクリルオイロキシエチルイソチオシアネートと反応させてビニル誘導体とした。次にこれをガラクトースのビニル誘導体との間でメカノケミカル固相重合させた。

4. 神経栄養因子遺伝子の導入、脳内発現

レトロウイルス(A8ウイルス)の複製欠損型遺伝子のLTRの下流にチミジンキナーゼのプロモーターを二つ挿入し、それぞれの下流にネオ

マイシン耐性遺伝子、ガラクトシダーゼ遺伝子をそれぞれもつベクターを構築した。また遺伝子発現の効率を調べるためポリA構造の周辺構造を種々変換したベクターを作成した。

C. D. 結果と考察

1. 培養神経細胞を用いた新規活性化化合物の検索と評価 (分担：古川昭榮)

BDNFおよびGDNFの高感度酵素免疫測定法を評価手段として培養神経細胞におけるBDNFおよびGDNFの産生促進効果を検討した結果、異なる生理活性をもついくつかの物質に強い産生促進活性を見出した。すなわち、①細胞内カルシウムレベルを高める物質 (A23187、KT-5720、H89) と神経伝達物質関連化合物のアセチル-L-カルニチン、神経成長因子 (NGF) の産生促進物質である4-メチルカテコールにBDNF産生促進活性を、②イソプロテレノールとドーパミン、およびビタミンK₃にGDNF産生促進活性を、③免疫抑制剤として臨床で使用されているシクロスポリンA、タクロリムスにはBDNF、GDNFの両方の産生促進活性をそれぞれ見出した。いずれの化合物も新規に見出された活性であり本研究にとって有望な候補物質である。

4MCとサイクロスポリンについては以下に述べるように末梢投与による脳での産生促進活性と神経機能への影響を評価し、4MCについてはさらに脳・血液関門通過性と徐放性を高めるための化学的、物理化学的修飾を加えた。他の候補物質とともに次年度に生体系での活性評価を行う。

2. 4-メチルカテコール (4MC) による脳内BDNF産生の促進とプロドラッグ化

1) 4MCによる脳内BDNF産生の促進 (分担：古川昭榮)

4MCをラットの脳室に直接注入したところ、その注入部位周辺でBDNF含量が著しく増加した。そこで末梢から投与し脳での作用を検討した。4MCは脳・血液関門の通過性が悪いと考えられるので血液・脳関門が未熟な幼若ラットの腹腔に投与したところ脳の全域でBDNF mRNAの上昇を観察した。これに伴い神経細胞の構築タンパクであるシタキシンの発現も増加した。すなわち脳・血液関門通過性を高めることができれば、末梢投与4MCによって脳でのBDNF産生を促進し神経機能を改善できると考えられた。

そこで4MCの脳内移行を高めるため、化学的修飾、物理化学的修飾を試みた。

2) 4MCの化学修飾：ジヒドロピリジン基の導入 (分担：広田耕作)

4MCの脳・血液関門通過性を高めるための試みとして、ジヒドロピリジン基を4MCの二つの水酸基にエステルとして導入し脳内移行後加水分解されることによって脳内に滞留するようデザインした。目的化合物は5つの行程で合成できたがエステル構造が不安定であり以後の動物実験には使用できなかった。そこで安定化のためのリンカーを導入することとし目的産物の合成まで2行程を残すところまで到達している。次年度に合成を完了し、脳でのBDNF産生促進活性を検討する予定である。

3) メカノケミカル固相重合による4MCの高分子プロドラッグ化 (分担：葛谷昌之)

4MCの効率的な脳・血液関門通過性と薬効の持続性を高めることを目的として、4MCを1-ベンゾイル化したのち2-メタクリルオイロキシエチルイソチオシアネートと反応させてビニル誘導体とした。次にこれをガラクトースのビニル誘導体との間でメカノケミカル固相重合させた。脳・血液関門通過性の指標となる分配係数を比較したところ、1-ベンゾイル化した4MCはもとの4MCより2倍も脳・血液関門通過性が高いと予想された。また最終的に得られた高分子プロドラッグは水溶性が高く、単分散性に近い高分子であり、薬物放出挙動や生体内挙動のばらつき小さいきわめて有用な物性を保持していた。次年度に脳でのBDNF産生促進活性を調べる予定である。

3. 末梢投与サイクロスポリンによる脳内BDNF量の増加

サイクロスポリンは免疫抑制作用の他に神経再生、神経修復作用をもつこと、さらに脳・血液関門を通過することが知られている。そこで神経作用が期待できる用量 (免疫抑制作用に必要な量の1/20-1/50) のサイクロスポリンを成熟ラットに腹腔内投与した。その結果海馬や線状体を含めた脳の広範な領域でBDNFの免疫染色性の著明な増加が認められた。さらにドーパミン合成酵素であるチロシン水酸化酵素の免疫染色性が大脳皮質内線維組織や黒質の神経細胞体で増加していた。GDNFの産生増強は確認していないがBDNFまたはGDNFの産生増強によりドーパミン作動性神経細胞の機能が亢進されたと考え

られる。

免疫抑制剤が結合する細胞内分質はイムノフィリンと呼ばれ脳にも多く存在する。イムノフィリンリガンド（イムノフィリンに結合する物質の総称で免疫抑制剤も含まれる）がパーキンソン病モデル動物や脳虚血動物の脳で神経細胞死を抑制することが相次いで報告され、免疫抑制効果を全く持たないイムノフィリンリガンドにも同様な作用が明らかとなっている。これまで神経再生、神経機能修復作用の機構は不明であったが、本研究の結果から、サイクロスポリンは神経細胞のBDNF、GDNFの産生を促進し産生されたこれらの神経栄養因子が作用を示すことが強く示唆された。今後、免疫抑制作用のないイムノフィリンリガンドを中心に、神経栄養因子産生促進活性を指標としてより強い活性をもつ分子を探索する。

4. レトロウイルスベクターによる神経栄養因子遺伝子導入・発現に関する研究 (分担：渡辺里仁)

脳への遺伝子導入・発現は神経栄養因子の産生を高める直接的かつ有力な方法であり、将来神経疾患の遺伝子治療につながることを期待される。そこで本研究では分担者渡辺らが開発したレトロウイルス（A8ウイルス）の複製欠損型遺伝子をベクターとして中枢神経に選択的なBDNF、NT-3遺伝子の発現を試みる。本年度はラット大脳皮質発達過程におけるBDNF、NT-3の発現を調べ、脳室周囲の分裂細胞に強くBDNF、NT-3が発現することを明らかにし、これら神経栄養因子の発現をチェックするシステムを確立した。つぎに中枢神経系に親和性を付与するためのベクター構築を行いこれに適したパッケージング細胞を樹立した。さらに遺伝子発現を不安定化する要因となるポリAの周辺構造を種々構築し、非スプライス型で機能させることにより欠損mRNA形成がほとんどなくなることを明らかにした。

E. 結論

1. A23187、KT-5720、H89、アセチル-L-カルニチン、4-メチルカテコールにBDNF産生促進活性を、イソプロテレノール、ドーパミン、ビタミンK₃にGDNF産生促進活性を、シクロスポリンA、タクロリムスにBDNF、GDNFの両方の産生促進活性を見い出した。いずれも新規な活性であり有望な候補物質で

ある。

2. 幼若ラット腹腔に投与した4MCは脳のBDNF産生を高め神経機能に影響を及ぼした。
3. 4MCの脳内移行を高め除放化に優れた高分子プロドラッグを創製した。
3. 末梢投与したサイクロスポリンはラット脳の広範な領域でBDNF産生を高め、神経機能に影響を及ぼした。
4. 神経栄養因子の脳内遺伝子発現を検定するシステムを確立し、効率的なレトロウイルスベクターを構築した。

F. 研究発表

学会発表

- 1) 古川昭栄、新田淳美、伊藤めぐみ、古川美子
ニューロトロフィンの発現と神経機能 第71回日本生化学会大会 シンポジウム、1998年10月14-17日（名古屋）
- 2) 新田淳美、伊藤めぐみ、野元裕、古川昭栄
培養ラットアストロサイトにおける4-メチルカテコールのニューロトロフィン合成促進効果 第71回日本生化学会、1998年10月14-17日（名古屋）
- 3) 高瀬明、渡辺里仁 神経病原性マウスレトロウイルスのin vivoおよびin vitroの増殖に対するレセプターの関与 第2回日本神経ウイルス研究会研究集会 1998年7月24-25日（東京）
- 4) 高瀬明、渡辺里仁 神経病原性マウスレトロウイルスのレセプター認識 第46回日本ウイルス学会総会 1998年10月12-14日（東京）

G. 知的所有権の取得状況

なし

厚生科学研究費補助金(脳科学研究事業)
分担研究報告書

脳由来神経栄養因子(BDNF)およびグリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)の
産生を促進する低分子化合物の検索

古川昭栄 (岐阜薬科大学・薬学部・教授)

研究要旨 脳神経疾患の治療薬を開発するために脳由来神経栄養因子(BDNF)やグリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)の産生を促進する化合物の検索を行った。培養ラット神経細胞において、カルシウムイオン関連化合物、神経伝達物質関連化合物、ビタミン類、カテコール化合物および免疫抑制剤がこれらの産生を促進することを明らかにした。さらに、カテコール化合物や免疫抑制剤をラットに末梢投与したところ、脳内のBDNFやGDNFの発現が増加し、神経機能に関連するタンパク質の発現も増加していた。これらの結果は、培養神経細胞に対してBDNFやGDNFの産生促進効果を持つ化合物は、末梢から脳に移行し脳内でこれら神経栄養因子の発現を促進することを示しており、脳神経疾患治療薬としての可能性を示唆すると考えられる。

A. 研究目的

パーキンソン病、ハンチントン舞踏病、小脳変性症などの特定の脳神経細胞が死滅する疾病の多くは原因不明であり抜本的な治療法がない。神経栄養因子には神経細胞の変性・脱落を抑制、神経機能を修復・再建する作用があることから、脳神経変性疾患の治療薬として有望視されている。神経栄養因子を脳疾患モデル動物の脳に投与すると、神経細胞の変性や脱落が抑制され神経機能の障害が修復されることも報告されている。しかし、治療薬としての利用を考えた時、神経栄養因子を脳に直接注入することは倫理的・技術的に限界がある。神経栄養因子はタンパク質であるため血中で分解されやすい上に脳・血液関門を通過できず、末梢投与による脳での効果は期待出来ない。すでに著者らは代表的な神経栄養因子である神経成長因子(NGF)の合成・分泌を誘導する化合物が、末梢神経の機能障害を改善することを報告している。このことは、神経栄養因子の生体内誘導が疾患治療に有効であることを示している。しかしながら、NGF合成誘導化合物の末梢投与が脳神経疾患に奏功を示した例は報告されていない。その理由として、NGFの中樞神経系での作用スペクトルが比較的狭いことが挙げられる。そこで本研究では、神経栄養因子の中でも作用スペクトルの広い脳由来神経栄養因子(BDNF)および活性の強いグリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)に重点をおき、末梢投与後に脳に移行して、これらの脳での合成を促進する低分子化合物の検索を試みた。

B. 研究方法

BDNFおよびGDNFの高感度酵素免疫測定 (EIA)法の確立

ヒト組み換え型BDNFおよびGDNFを成鶏およびウサギにそれぞれを免疫することにより抗血清を得た。この血清からアフィニティクロマトグラフィーにより抗体を精製し、EIA法に用いた。

ラット神経細胞の初代培養

妊娠18日齢のラットの胎仔から海馬を取り出し、トリプシンで分散後、血清を含む培地で培養を開始した。検索化合物を無血清培地中で24時間反応させ、培養上清中の神経栄養因子レベルを測定した。

ラット脳室への4-メチルカテコール (4-MC) 直接注入とその脳内 BDNF 発現に及ぼす影響

ラット脳室にマイクロシリンジを用いて4-MC (2.5 nmole) を直接注入し、24時間後に脳を摘出・分割してEIA法でBDNF含量を測定した。

4-MCの末梢投与とその幼若ラット脳でのBDNF発現に及ぼす影響

出生2日後の幼弱ラットに 4-MC (100 μ g) を12時間間隔で5回腹腔内投与した後、脳を摘出してBDNFの免疫組織染色を行った。免疫組織染色は、BDNFの特異的な部分ペプチドを認識した抗体を用い、アビジン-ビオチン法で行った。

成熟ラット脳でのBDNFおよびGDNFの発現に及ぼす免疫抑制剤の影響

7週齢のWistar系雄性ラットにサイクロスポリンA (1.5 mg/kg) およびタクロリムス (1.0mg/kg)を1日1回連続5日間腹腔内投与した後、脳を摘出して免疫組織染色やEIAのサンプル

表1 培養神経細胞における種々の化合物のBDNFおよびGDNFの産生促進効果

	BDNF	GDNF		BDNF	GDNF
Ca²⁺-associated compounds			vitamins		
nifedipine	↓	→	A	→	→
A23187	↑	→	D2	→	→
KT-5720	↑	→	D3	→	→
H-89	↑	→	B2	→	→
adrenergic compounds			B6	→	→
epinephrine	→	→	B12	→	→
norepinephrine	→	→	B13	→	→
isoproterenol	→	↑	Bt	→	→
octopamine	→	→	E	→	→
cholinergic compounds			K1	→	→
acetyl-L-carnitine	↑	→	K3	→	↑
carbacol	→	→	K5	→	→
muscarine	→	→	M	→	→
nicotine	→	→	P	→	→
dopaminergic compounds			L	→	→
dopamine	→	↑	H	→	→
SKF 83566	→	→	4-methylcatechol	↑	→
PD098059	→	→	immunophilin ligands		
surpiride	→	→	cyclosporin A	↑	↑
histaminergic compounds			tacrolimus	↑	↑
histamine 2HCl	→	→	↑; 明らかな上昇 (2-3倍以上)		
methothopine	→	→	→; 変化なし		
			↓; 明らかな減少 (1/2-1/3以下)		

ルとし、BDNFやGDNFの発現を検討した。

C. 研究結果およびD. 考察

今まで操作が簡便で信頼性が高く多数の検体を評価できるBDNFおよびGDNFの測定方法が確立されていなかった。本研究においてBDNFおよびGDNFの高感度酵素免疫測定法（検出限界は0.5pg/ml）の確立に成功した。この測定方法を用いて、培養神経細胞における種々の化合物のBDNFおよびGDNFの産生促進効果について検討した結果をtable 1 に示した。カルシウムチャンネル阻害剤のニフェジピンでBDNFの合成が抑制され、カルシウム流入を引き起こすA23187、カルシウム依存性キナーゼの阻害物質であるKT-5720やH89の添加により培養神経細胞でのBDNF産生が著しく増加した。これらの結果からBDNF産生と細胞内遊離カルシウム量との相関が示唆された。これらの結果は、今後の候補化合物の選択に有利な知見と考えられる。

神経伝達物質関連化合物では、アセチルコリンとセロトニンの応答を高めるアセチル-L-カルニチンでBDNFの産生が誘導され、β-アドレナリンレセプター作動薬のイソプロテレンールでGDNFの産生が誘導された。また、ドーパミンでGDNFの産生が誘導された。これらの結果は神経活動とBDNFやGDNFの産生との関連を示唆している。

ビタミン類では、ビタミンK₃がGDNFの産生を誘導することを見出した。著者らは、ビタミ

ンKが培養神経細胞の生存を維持することを報告しているが、GDNFの産生誘導による可能性が考えられる。この産生誘導が神経機能の修復や再生にどのように寄与するかを今後明らかにしたいと考えている。

NGFの産生を促進する化合物として見出した4-MCはBDNFの産生も誘導した。4-MCをラットの脳室に直接注入したところ、その周辺部位でBDNF含量が著しく増加した。この結果は、4-MCが脳でBDNFの産生を促進する化合物として応用できる可能性を示すものである。神経変性疾患の患者の脳では血液・脳関門が不完全であることが報告されている。本研究では、このような脳を再現したモデルとして血液・脳関門が不完全である幼若ラットを使用し、4-MCを腹腔内投与したところ、脳全域でBDNFの発現の増加が観察された。この時、細胞構築タンパクであるシタキシンの発現も増加していた。今後、化学修飾などによって血液・脳関門の通過性を高めた4-MCのプロドラッグ化を試みたい。

免疫抑制剤として臨床で使用されているサイクロスポリンやタクロリムスも培養神経細胞におけるBDNFやGDNFの産生を促進した。さらに成熟ラットに腹腔内投与すると、脳各部位でのBDNFやGDNFの含量が増加した。サイクロスポリンを投与したラットでは、ドーパミン合成酵素であるチロシン水酸化酵素の免疫染色性が増加していた。これら免疫抑制剤は末梢投与後、脳に移行してBDNFやGDNFの合成を促進し、神経機能に影響を与えていると考えられる。免疫抑制剤が結合する細胞内分質はイムノフィリンと呼ばれ、当初はリンパ球などの免疫担当細胞で存在が確認されていたが、脳にも多く存在することが最近明らかとなった。イムノフィリンリガンド（イムノフィリンに結合する物質の総称で免疫抑制剤も含まれる）がパーキンソン病モデル動物や脳虚血動物の脳で神経細胞死を抑制することが相次いで報告されている。免疫抑制効果を全く持たないイムノフィリンリガンドも開発され、強い神経栄養因子効果や神経細胞保護作用を有していることが明らかとなっている。本研究で用いた投与量も免疫抑制効果が期待される量の10分の1程度であり、GDNFやBDNFの産生誘導作用と免疫抑制作用は直接関連しないと考えられることから、イムノフィリンリガンドの神経保護効果はBDNFやGDNFの産生を介していることが示唆される。今後、免疫抑制作

用のないイムノフィリンリガンドである GPI-1046などについても同様の検討を行う予定である。

E. 結論

以上をまとめると、培養神経細胞でBDNFやGDNFの合成を促進する低分子物質を見出した。これら化合物のいくつかは、末梢投与によって脳でのBDNFやGDNFの合成を促進した。今後、これら化合物の神経機能修復や再生作用について検討したいと考えている。

F. 研究発表

学会発表

古川昭栄、新田淳美、伊藤めぐみ、野元 裕、古川美子；ニューロトロフィンの発現と神経機能（第71回日本生化学会、1998. 10. 14-17、名古屋）

新田淳美、伊藤めぐみ、野元 裕、古川昭栄；培養ラットアストロサイトにおける4-メチルカテコールのニューロトロフィン合成促進効果（第71回日本生化学会、1998. 10. 14-17、名古屋）

G. 知的所有権の取得状況

なし

厚生科学研究費補助金 (脳科学研究事業)
分担研究報告書

神経栄養因子の産生調節による神経細胞の保護・機能修復に関する研究

分担研究者 葛谷 昌之 岐阜薬科大学教授・学長

研究要旨 本研究では、4-methylcatecholの血液脳関門(BBB)透過性を高め、かつ、持続的な薬理活性の発現を目指し、メカノケミカル固相重合を利用した4-methylcatechol誘導体の高分子プロドラッグ合成を実施した。4-methylcatecholのBBB透過性を高める目的で、モデル化合物として1-ベンゾイル誘導体(1)を合成した。4-methylcatecholと化合物(1)の脂溶性を比較したところ、化合物(1)の方が約2倍BBB透過性が大きいと予想された。化合物(1)のビニル誘導体(2)とガラクトースのビニル誘導体(3)とのメカノケミカル固相重合は定量的に進行し、水溶性で、かつ、極めて単分散性に近い分子量分布を有する高分子プロドラッグが得られた。

A. 研究目的

神経成長因子(NGF)はアルツハイマーのような神経性疾患の治療薬として有望であることは知られているが、血液脳関門(BBB)を通過できないためこのような中枢神経疾患における利用は困難である。NGF合成を促進する低分子化合物を中枢神経疾患治療に利用するいくつかの研究がここ数年、注目を集めている。その中で、本研究の主任研究者である古川らは、4-methylcatecholが有効なNGF促進剤であることを報告し、本化合物のin vitroおよびin vivoにおける活性が多く、研究者により報告されている。しかしながら、本化合物は十分な疎水性がないため、BBBを通過するのが困難なため、脳内への移行が乏しいことも報告されている。

かかる背景より、本研究では、よりBBB透過性の高い4-methylcatechol誘導体を合成し、そのビニル誘導体をメカノケミカル固相重合法により高分子プロドラッグ化し、持続性ある中枢神経疾患治療薬の開発を目指す。すなわち、モデル誘導体として1-benzoyl-4-methylcatecholを合成し、2-methacryloyloxyethyl isocyanateとの反応によりビニル誘導体を合成した。その後、メカノケミカル固相重合法

により目的とする高分子プロドラッグを合成し、その物性について検討した。

B. 研究方法

1. 試料

4-methylcatechol誘導体として、*p*-crezolと過酸化ベンゾイルとの反応により1-benzoyl-4-methylcatechol(1)を合成した。1のビニル誘導体(2)は1と2-(2-methacryloyloxy)ethyl isocyanateとの反応により合成した。また、親水性固体モノマーとしてガラクトースのビニル誘導体(3)を合成した。

2. メカノケミカル固相重合

化合物(2)と(3)を無酸素条件下、金属製ボールミルを用いる高速振動処理によりメカノケミカル固相重合を実施した。また、処理試料の¹H-NMRスペクトル測定より重合率を求めた。

3. オクタノール-水分分配係数測定

4-methylcatecholあるいは化合物(1)をオクタノールに溶かした後、pH7.4のリン酸緩衝液を加え、分液操作を行った。オクタノール層および水層の化合物量をUVスペクトル測定により求め、分配係数を算出した。

4. ゲルろ過クロマトグラム (GPC) 測定

高分子プロドラッグの分子量は、0.01mol の LiBr を含有するジメチルフォルムアミドを溶媒として、40℃にてゲルろ過クロマトグラムにより測定した。基準物質として、polystyrene standard を用いた。

C. 研究結果

1. 1-benzoyl-4-methylcatechol (1) の物性について

4-methylcatechol は BBB 透過性が低いことから、より BBB 透過性の高い誘導体と期待される 1-benzoyl-4-methylcatechol (1) を合成した。

薬物の BBB 透過性は物質の脂溶性のみならず、その分子量とも関係することが報告されており、オクタノール-水分配係数 / (分子量)^{1/2} と BBB 透過速度の間に良好な直線関係があることが知られている。そこで、4-methylcatechol および化合物 (1) の分配係数を測定し、予想される BBB 透過速度を比較した。表 1 はその結果を示したものである。ベンゾイル化することにより BBB 透過速度が 2 倍になることが予想された。

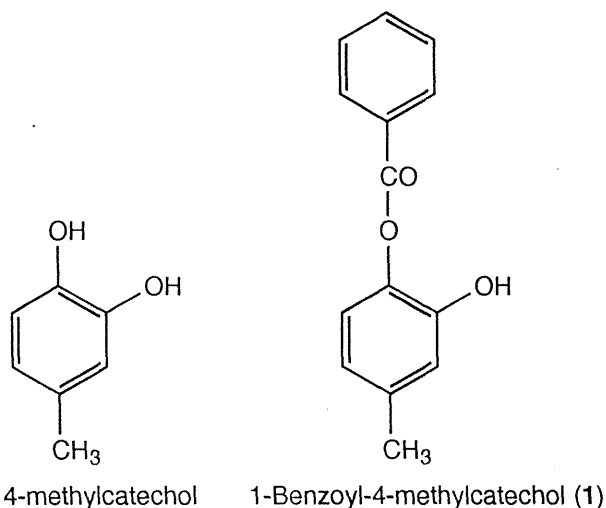


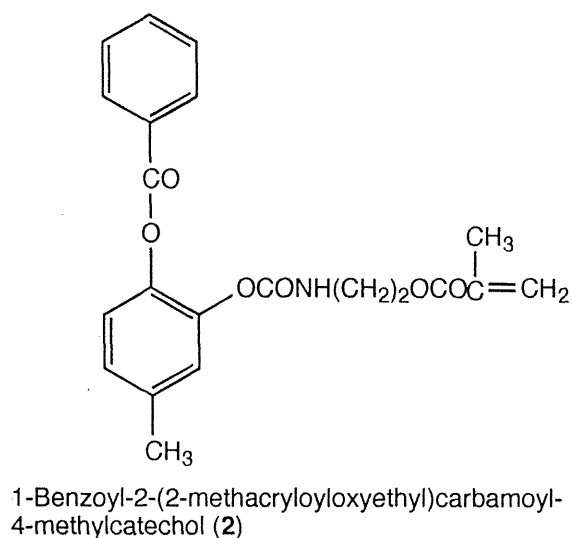
Table 1 Expected BBB permeability coefficient of 4-methylcatechol and its derivative.

compound	expected BBB permeability coefficient (X10 ⁻⁵ cm/s)
4-methylcatechol	2.63
1	5.25

2. メカノケミカル重合により合成した高分子プロドラッグの物性について

水溶性の高分子プロドラッグを得る目的で、常法に従い、化合物 (2) とガラクトースのビニル誘導体 (3) とのメカノケミカル固相重合反応を実施した。

処理試料の ¹H-NMR スペクトルを測定した結果、ビニル基に由来するピークが完全に消失している事実より、重合反応が定量的に進行したことを確認した。化合物 (2) の含有率が 10mol% である共重合体は水溶性であり、目的とする水溶性高分子プロドラッグを得ることができた。また、本高分子プロドラッグは水以外に、ジメチルフォルムアミド、ジメチルスルホキシドに溶解し、エタノール、アセトン、ベンゼンには不溶であった。さらに、ゲルろ過クロマトグラム (GPC) 測定により求めた本高分子プロドラッグの分子量は、数平均分子量 28000、多分散度 1.10 であった。



D. 考察

4-methylcatechol はNGF促進剤としての有用性が知られているが、BBB透過性が低く、脳内への移行が乏しいことが報告されている。本研究では、BBB透過性を高め、脳内において4-methylcatecholへ変換可能なモデル化合物として、1-ベンゾイル誘導体(1)を合成した。4-methylcatecholと化合物(1)の脂溶性を比較すると化合物(1)の方が約2倍BBB透過速度が速くなると予想された。化合物(1)は2位の水酸基を保護し、エステル交換後、脱保護を行えば様々な誘導体に容易に導くことが可能であるため、本化合物を出発原料として合目的なBBB透過性を有する医薬品開発が可能になると期待される。

化合物(1)の高分子プロドラッグ化を行うため、2位の水酸基にビニル基を有する置換基を導入した化合物(2)を合成した。高分子プロドラッグを血中に投与することを考えると、水溶性であることが不可欠であるため、水溶性モノマーであるガラクトースのビニル誘導体(3)と化合物(2)とのメカノケミカル共重合により、水溶性の高分子プロドラッグを合成した。本重合反応は定量的に進行したことより、分離や精製の後処理操作が不要であり、かつ固相反応であることから高分子中への溶媒などの残留の危惧もない。さらに、メカノケミカル固相重合反応の特徴である極めて単分散性に近い(多分散度1.10)高分子が得られた。分子量は高分子の物性をきめる重要な因子の1つであり、分子量分布の広い高分子(多分散性)を用いることは物性の異なる高分子の混合物を用いることになり、薬物放出挙動および生体内挙動のばらつきが大きくなる可能性がある。一方、単分散性の高分子を使用すればより均一な物性を持つ高分子を使用するため、ばらつきが小さく、高分子プロドラッグにとっては極めて有用な物性と考えられる。

E. 結論

本研究により得られた知見を以下にまとめる。

4-methylcatechol誘導体として、その1-ベンゾイ

ル体を合成し、その脂溶性の比較より本化合物の方が4-methylcatecholよりも約2倍BBB透過性が高いことが予想された。また、本化合物を出発原料とし、エステル部位の構造の異なる様々な他の誘導体合成が可能であると考えられる。

4-methylcatecholのビニル誘導体と親水性モノマーとのメカノケミカル固相重合を実施し、定量的に水溶性高分子プロドラッグを得ることができた。また、本高分子プロドラッグは極めて単分散性に近い分子量分布を有することを明らかにした。

今後、本高分子プロドラッグからの薬物放出性についての検討、ならびに、*in vivo*、*in vitro*におけるモデル薬物のBBB透過性やNGF産生促進等について検討してゆく。

F. 研究発表

未発表

G. 知的所有権の取得状況

なし

活性化化合物の合成に関する研究

分担研究者 廣田 耕作 岐阜薬科大学教授

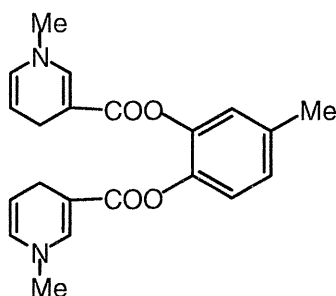
研究要旨 4-メチルカテコールへのジヒドロピリジン構造導入による、脳内移行を性の向上を目的としたプロドラッグの合成を検討した。

A. 研究目的

近年神経成長因子(NGF)の欠落とアルツハイマー型痴呆との関連性が注目されているが、NGFは血液脳関門(BBB)を通過しない点、及び血中半減期がきわめて短い点から、適度な脂溶性を保持し、脳内に移行しやすい、NGF合成促進作用を有する化合物の開発が必要である。そこで、NGF合成促進作用を有するカテコールアミン類の単純化アナログである4-メチルカテコールを用いた脳内移行型プロドラッグの開発に着手した

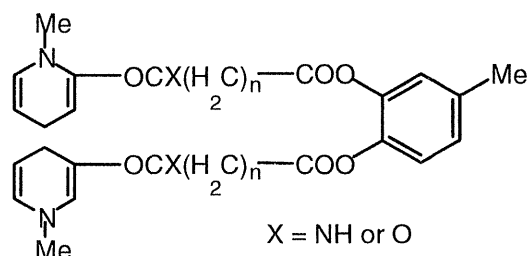
B. 研究方法

薬物のBBB透過性のみならず、一旦BBBを通過した薬物の脳内対流性を高める脳内移行補助基として Bodor らが考案した(J. Med. Chem. 1988, 31, 244)ジヒドロピリジンを4-メチルカテコール分子に導入し、脳内移行後加水分解的に切断されることで、脳内に滞留するようデザインした。



C. 研究結果 • D. 考察

目的とした化合物は、4-メチルカテコールから5行程 21%の収率で合成することができたが、エステル部分の安定性から、生成過程での分解が著しく、活性試験への適用が疑問視された。そこで、加水分解に対する適度な安定性の



向上を目的としたリンカーの導入を検討することとした。種々検討の結果、現在 $n = 1$, $X = NH$ 及び $n = 5$, $X = NH$ の誘導体についてピリジン環の縮合まで成功し、4級ピリジニウム塩とした後ピリジン環を還元する2行程を残すところまで完了している。

E. 結論

今後、合成の達成により、本脳内移行補助基とリンカーの有効性を確認するとともに、 n 及び X 部分の誘導化に基づく最適化により、適度な(BBB透過前は十分に安定で、透過後に容易に加水分解される)安定性と高い脳内移行性を有する化合物の開発が必須である。

厚生科学研究費補助金 (脳科学研究事業)

分担研究報告書

レトロウイルスベクターによる神経栄養因子遺伝子導入・発現に関する研究

分担研究者 渡辺里仁 創価大学生命科学研究所教授

BDNF と NT-3 はそれぞれの高親和性受容体を介して、神経前駆細胞の移動や神経細胞への分化方向付けの決定に何らかの作用を持つと考えられる。ベクター構築の面では、LTR の内部に2つのプロモーターを挟んだ場合、パッケージング細胞の増殖中に何らかの理由で前方のプロモーターが不活性化されて、目的とする遺伝子の発現が弱められた。また、パッケージング細胞の env 遺伝子の安定発現のためにポリ A シグナルの構造の関与があることを明らかにした。

A. 研究目的

レトロウイルスベクターを用いた遺伝子発現系で、神経栄養因子の遺伝子が個体内で安定に遺伝子発現する条件を決定する。本研究では、中枢神経系に親和性をもつレトロウイルス (A8 ウイルス) を複製欠損ウイルスベクターとして用いて代表的な神経栄養因子であるニューロトロフィンを局所的に発現することにより、大脳皮質神経系細胞の発生、移動、分化に対する影響を細胞種レベルで詳細に検討することを目的とする。ベクターは、人獣共通の新規なレトロウイルスベクターを構築し、サル、ラットで遺伝子導入効率を確かめ、更にヒトの遺伝子治療に用い得る形にするための基礎研究を行う。

B. 研究方法

1. 神経栄養因子の遺伝子

1) 我々が作成した特異抗体を用いて、ラット大脳皮質発達過程におけるニューロトロフィンとその高親和性受容体の発現分布を免疫染色を行った。2) 中枢神経系に親和性を持つベクターを作成するためにいくつかのベクターの構築を試みた。マウスレトロウイルス pLXSN の LTR の下流に2つのチミジンキナーゼのプロモーター配列を挿入し、それぞれの下流にネオマイシン耐性遺伝子および b-ガラクトシダーゼ (b-gal) 遺伝子を挿入した (LX-TK2-neo-gal)。LX-TK2-neo-gal をパッケージング細胞 ψ FrC6- δ に導入した。

2. ベクター系

我々が分離したウイルス株である A8-V の遺伝子を基にしたパッケージング細胞 ψ FrC6/NIH 及び ψ FrC6/C6 をパッケージング細胞として用いた。A8 ウイルス遺伝子よりパッケージングシグナル Ψ を除き

更に下流の LTR を SV40 のスプライシング型ポリ A 付加シグナルで置換して得たベクター pA8(Ψ)- β を NIH3T3 細胞に導入し、パッケージング細胞 ψ FrC6- β を樹立した。安定したエンベロップ蛋白遺伝子 (env) 発現のためのポリ A 構造について検討した。特に、RNA の立体構造が異常スプライシングによる遺伝子発現の不安定さを誘導している可能性が高いため、ポリ A 構造周辺部位が異なった遺伝子構造を構築し、その立体構造に与える影響と、異常スプライシングを誘導する機構を検索した。

C. 研究結果

1. 神経栄養因子の遺伝子

1) ラット大脳皮質形成過程においてニューロトロフィンとその受容体が特定の領域に時期特異的に発現していた。特に、分裂期 (M 期) に当たる脳室の際に在る神経前駆細胞で強い発現を示し、陽性細胞数が大脳皮質の灰白質を形成する神経前駆細胞の多くが発生・移動する時期にピークを迎えその後減少した。2) 上記の構築では、ネオマイシンで選択し、クローン化したパッケージング細胞の増殖中に β -gal 陽性細胞の数が減少した。この細胞は再度ネオマイシン入りの培地で培養しても数の減少をみなかった。

2. ベクター系

感染力価があがらなかった原因の一部が、スプライシング型のポリ A シグナルによることと、発現ベクターに残存している env 遺伝子断片が影響していることが示唆された。スプライシング型ポリ A シグナルを用いた場合 env 遺伝子の約 1Kb、即ち、env 遺伝子の gp70 の中の下流領域と p15E の大部分をコードする部分約 1Kb がスプライスアウトされた形でエンベロー

ブ蛋白 (Env 蛋白) の mRNA が形成されていた。ポリ A シグナルを非スプライス型で機能させると、このような欠損 mRNA の形成がほとんどなくなり、安定した env 遺伝子の発現が得られた。

D. 考察

1) BDNF と NT-3 はそれぞれの高親和性受容体を介して、神経前駆細胞の移動や神経細胞への分化方向付けの決定に何らかの作用を持つと考えられる。2) LTR の内部に2つのプロモーターを挟んだ場合、パッケージング細胞の増殖中に何らかの理由で前方のプロモーターが不活性化されて、 β -gal の発現が弱められたと考えられる。3) パッケージング細胞の改良面では、ウイルスの各構成遺伝子の安定発現を計るためには、レトロウイルスの増殖に関する基礎的なデータの積み重ねが必要であることが、あらためて明かとなった。

E. 結論

今回、我々は、env 遺伝子の安定発現のためにポリ A シグナルの構造の関与があることを明らかにしたが、この事実は、複雑な遺伝子発現制御に関わる因子のほんの氷山の一角であることが予想されるからである。その意味でも、ベクターの開発に関する仕事は、世界的なレベルで見ると漸く入り口にたどり着いたところであると言える。

F. 研究発表

学会発表

- 1) 高瀬 明、渡辺里仁 神経病原性マウスレトロウイルスの in vivo および in vitro の増殖に対するレセプターの関与 第2回日本神経ウイルス研究会研究集会 1998年7月24-25日 (東京)
- 2) 高瀬 明、渡辺里仁 神経病原性マウスレトロウイルスのレセプター認識 第46回日本ウイルス学会総会 1998年10月12-14日 (東京)

