

厚生省科学研究費補助金（脳科学研究事業）
平成11年度総括，分担研究報告書

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）

飯沼宗和（岐阜県保健環境研究所）

渡辺里仁（創価大学生命科学研究所）

厚生科学研究費補助金(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 これまでに見い出した活性物質のうち、1) タクロリムス(FK506)は、6-OHDA投与パーキンソン病モデル動物の脳内GDNF産生を著明に亢進し、ドパミン神経細胞の変性を抑制した。2) シクロスポリンAは、正常ラットの線条体、梨状葉皮質、橋/延髄のGDNFレベルと線状体のBDNFレベルを有意に高めた。3) 4-メチルカテコール (4MC) は、糖尿病モデルラットで観察される脳内BDNFの低下とそれに伴う脳神経機能障害を抑制した。4) 4MCの誘導体、1-ベンゾイル4MCの高分子プロドラッグ化によって薬物を徐放化することに成功した。5) 植物成分中に有望な新規活性物質を見い出した。

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

飯沼宗和・岐阜県保健環境研究所・所長

渡辺里仁・創価大学・教授

点をおき、末梢から脳に移行して、脳でこれらの神経栄養因子の合成を促進する低分子化合物の開発を目的としている。

平成10年度(初年度)では、培養神経細胞を使ったin vitroスクリーニングにより12種類の活性低分子物質を見い出し、一部については高分子プロドラッグ化にも成功した。この実績を踏まえて平成11年度は以下の項目について検討した。

- 1) In vivoでの活性と薬効の評価 (古川)
- 2) 脳の物質代謝酵素活性への影響 (古川)
- 3) 活性化合物の物理化学的修飾・徐放化 (葛谷)
- 4) 新規活性物質の化学合成、修飾 (広田)
- 5) 植物成分中の活性物質の抽出と同定 (飯沼)
- 6) レトロウイルスベクターによる脳への遺伝子導入・発現 (渡辺)

A. 研究目的

パーキンソン病、ハンチントン舞踏病、小脳変性症などは脳の特定の神経細胞が死滅することによって引き起こされる脳神経変性疾患である。近年、いくつかの遺伝性疾患において変異遺伝子がポジショナルクローニングされ、病因解明の突破口が開かれた。しかし同定された遺伝子の異常がどのように病気と結び付くのか明快な結果が得られていない疾患も多い。したがってこれら疾患には依然として抜本的な治療法がないのが現状である。

近年の多くの動物実験により、神経栄養因子は成熟神経細胞の変性・脱落を抑制し、神経機能を修復・再建する作用をもつことが明らかとなり、脳神経変性疾患の治療薬として有望視されるようになってきた。しかし神経栄養因子を末梢から投与すると、肝臓や血中で分解されやすい上に、脳・血液関門を通過できず脳での作用が期待出来ないなど、治療薬への応用が制限されている。かといって、脳に直接神経栄養因子を注入することは倫理的、技術的に大きな制約を受ける。そこで本研究では作用スペクトルの広い脳由来神経栄養因子(BDNF)、作用濃度の低いグリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)に重

B. 研究方法

1) 神経栄養因子産生誘導活性の評価

高感度酵素免疫測定法(EIA)、RT-PCR法を評価手段として培養神経細胞、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) 病態モデル動物の作製

5週齢のddy系雄マウスの右側線条体に6-OHDAを注入して黒質ドパミン神経細胞を破壊しパーキンソン病モデル動物とした。メタアンフェタミン投与によって片側回転運動がみられ機能障害の指標とした。

7週齢のWistar系雄性ラットにストレプトゾトシン(STZ)を投与しインスリン依存性I型糖尿病モデルを作成した。このモデルの脳ではBDNF、

ニューロトロフィン-3 (NT-3) の発現が顕著に低下し、種々の神経細胞特異的タンパク質が低下しており、学習・記憶能も障害される。

3) 脳内酵素活性の測定

7週齢のWistar系雄性ラットにシクロスポリンA(1.5または5.0 mg/kg)を1日1回連続10日間、腹腔内投与した後、前頭葉皮質、梨状葉皮質、海馬、線条体、間脳、中脳、小脳、橋/延髄の8部位について7種類の薬物代謝関連酵素、アルカリフォスファターゼおよびスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 活性を測定した。

4) 活性化化合物の物理化学的修飾・徐放化

4-メチルカテコール(4MC)誘導体として、1-benzoyl-4-methylcatechol(I)を合成しこれを2-(2-methacryloyloxy)ethyl isocyanateとの反応によりビニル誘導体(II)とした。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(III)を合成した。化合物(II)と(III)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した。高分子プロドラッグの加水分解はアセトニトリルとpH 7.4のリン酸緩衝液の等量混合液中、37℃にて実施した。高分子プロドラッグの分子量は0.01 M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℃にてゲルろ過により測定した。

5) 新規活性物質の化学合成、修飾

薬物の脳・血液関門透過性の改善だけでなくいったん脳・血液関門を通過した薬物の脳内滞留性を高める脳内移行補助基としてジヒドロピリジンを4MC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、化学合成を試みた。

6) レトロウイルスベクターによる脳への遺伝子導入・発現

LXSNA8にgreen fluorescent protein(GFP)の変異型(EGFP)またはBDNF-EGFP 遺伝子を挿入しヒト cMyc の部分ペプチド-His 6 tag 複合タンパク質を作成した。

安定した遺伝子発現のためのポリ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あり、ポリA構造周辺部位が異なる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。

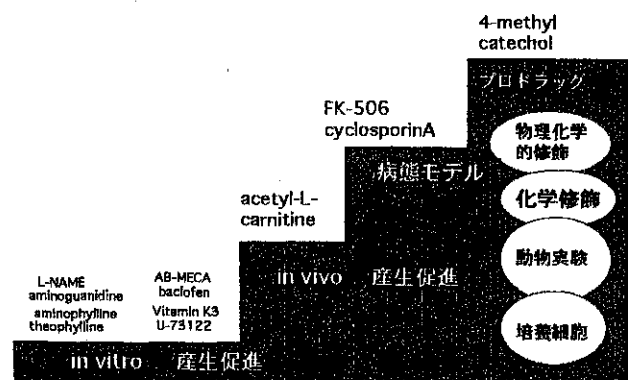
C. D. 研究結果および考察

1) in vitro での神経栄養因子産生促進物質の探索

a. これまでに見い出した活性化化合物とそれぞれの研究進捗状況 (分担：古川昭栄)

培養神経細胞およびアストロサイトを用いて約200種類の候補化合物を検索し、BDNFまたはGDNFの生合成を促進する12種類の化合物を同定し、これらの用量依存性、再現性などを詳細に検討した。具体的には①免疫抑制剤であるシクロスポリンA、タクロリムス(FK506)にBDNF, GDNFの産生促進活性を、②細胞内カルシウムを高める物質(A23187, KT-5720, H89), アセチル-L-カルニチン、4-メチルカテコール (4MC) などにBDNFの産生促進活性を、③NO合成酵素阻害物であるL-NG-nitro- arginine methyl ester (L-NAME), フォスホリパーゼC, A2阻害物質であるU-73122, ビタミンK3などにGDNF産生促進活性を見い出した。このうち、4MC, シクロスポリンA, タクロリムスについてはin vivo での活性評価、病態モデルを使った薬効評価に研究をステップアップした。また4MCについては病態モデルでの薬効評価を行い、さらに高分子プロドラッグ化を行った。高分子プロドラッグについては徐放性、in vivoでの活性を評価した。

下記の図にこれまで得られた候補物質とそれぞれの研究進捗状況を示した。



候補物質の研究進捗状況

b. 植物成分中の活性物質の抽出と同定 (分担：飯沼宗和)

*Vatica rassak*および*Shorea hemssleyama*の樹液からアセトンで抽出後、シリカゲル、セファデックスカラムにて精製し、FIC-13からFIC-23のステルベン三量体および四量体を単離した。

*Mallotus philippinensis*の果実表皮腺毛をメタノール抽出し、シリカゲルで精製し、FIC-22およびFIC-23のフロログリシノール誘導体を得た。パラあるいはメタジフェノールをもつ化合物をアルデヒド類とアセトフェノン類とのアルドール縮合によりFIC-1からFIC-5を合成した。2,5-ジヒドロオキシベンズアルデヒドとマロン酸の縮合によりFIC-9からFIC-12を得た。藤コブの特異成分FIC-6、アメリカ特産地衣類由来のFIC-7およびFIC-8は常法の抽出とカラムクロマトで単離した。赤ビート (*Beta vulgaris* var. *rapa*) (アカザ科)の根部に含まるベタインおよびベタラニンも常法により単離、評価に供した。

評価は継続中であるが、FIC-1, 3, 4に培養アストロサイトのBDNF産生を促進する活性を見出した。

c. 含窒素複素環化合物の合成

(担当：広田耕作)

ピリミジン及び縮合ピリミジンを中心として約30種類の含窒素複素環化合物を合成し、神経栄養因子産生活性のスクリーニングに供した。

2) 4-メチルカテコール(4MC)の薬効評価と高分子プロドラッグ化

a. 糖尿病モデルラットに対する4MCの効果 (分担：古川昭栄)

STZ投与で惹起される糖尿病モデルラットは、脳内ニューロトロフィンの発現が著しく低下することを見出している。その結果と考えられるが、大脳皮質ニューロンの構造異常、海馬歯状回のcalbindin D-28の減弱、海馬のsyntaxinの減弱、大脳皮質ニューロペプチドY陽性細胞数の減少がみられた。すなわちこのモデルでは機能タンパク質の発現が著しく損なわれており、シナプス機能やニューロン機能を支える構造にも異常があると考えられた。そこで、BDNF産生促進作用をもつ4MCを投与した結果、BDNF発現の低下が抑制され、馴れ行動における空間認知能力の低下が抑制された。すなわち4MCによってBDNF産生を高めると糖尿病に付随する脳神経障害を予防できることが示唆された。そこで4MCの薬効を高めるため、化学的修飾、物理化学的修飾を試みた。

b. 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、①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た後、脳内に滞留するようデザインしたものの、②4MCのメチル基部分をヒドロキシメチル化した後、ジヒドロピリジン基を導入する化合物をデザインした。①の化合物は現在2種類のリンカーの導入を検討中である。②にはすでに合成を完了したが、その遊離体である4-ヒドロキシメチルカテコールが産生誘導活性を示さないことが判明し現在検討を中止している。

c. 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とその特性

(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(1-ベンゾイル4MC)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。この高分子プロドラッグからのin vitroにおける薬物放出性について検討したところ、1-ベンゾイル4MCは定量的に放出され、かつ、高分子プロドラッグ中のIの含有量により薬物放出速度の制御が可能であることが示唆された。

培養アストロサイトを用いて1-ベンゾイル4MCの神経栄養因子産生誘導作用を調べたところ、用量依存的にNGFとGDNFの産生を促進した。BDNFは低濃度で、NT-3は高濃度で産生促進が見られたがそれ以外の濃度ではやや産生を抑制する傾向もみられた。

次に本高分子プロドラッグのNGF産生誘導効果をラットを用いて検討した。4MC (1mg/kg投与)を単回投与後、海馬内NGFを経時的に観察すると投与12時間後をピークとして上昇がみられた。これに対し、モル換算で1/10量しか4MCを含まない用量の本高分子プロドラッグを投与ただけで、4MCによる最高値と同等のNGF産生誘導効果を示し、さらに24時間後まで徐々に上昇傾向を示した。すなわち高分子プロドラッグ化による薬物の徐放化によって活性の増大が示唆された。

3) シクロスポリンAによるin vivo神経栄養因子レベル変化と脳代謝関連酵素活性への影響 (分担：古川昭栄)

a) 神経栄養因子レベル

シクロスポリンA (1.5または5.0 mg/kg)を1日1回連続10日間、腹腔内投与すると線条体、でBDNF、NT-3、GDNFの有意な増加が、橋/延髄ではNT-3とGDNFの増加が、梨状葉皮質ではGDNFの増加が観察された。他の部位（前頭葉皮質、海馬、間脳、中脳、小脳）では変化は見られなかった。複数の神経栄養因子が線条体で増加することはパーキンソン病治療の観点から注目される。すなわち黒質ドパミン神経細胞は軸索を線条体に投射し、そこで産生されたBDNF、GDNFを逆行性に取り込んで自己の機能維持に利用すると考えられるからである。

b) 物質代謝酵素の活性

シクロスポリンAを正常ラットに連続投与が脳のホメオスタシスに影響するかどうかを種々の脳内酵素(9種類)活性を指標として検討した。その結果、モノアミン酸化酵素、アルカリフォスファターゼの活性だけが線条体に限定して有意に増加あるいは低下していた。すなわち、線条体では神経栄養因子のレベルの増加に加え、一部の代謝系酵素の変動が起こった。しかしその他の部位では、シクロスポリンAの投与やそれによって産生亢進した神経栄養因子が脳の物質代謝系を変化させる可能性は低いと考えられた。

4) パーキンソン病モデル動物に対するタクロリムス(FK506)の神経細胞保護効果 (分担：古川昭栄)

6-OHDAで片側線条体を障害したラットの腹腔にタクロリムス(FK506) (1.5 mg/kg)を投与後、線条体と大脳皮質でのGDNFレベルを調べた結果、線条体、大脳皮質で著しい増加を観察した。GDNFは強いドパミン神経細胞保護作用をもつ。そこで6-OHDA投与の直後からタクロリムスを投与した群と4日後から投与した群について回転運動値を計測した結果、6-OHDA投与直後からタクロリムスを与えた群では回転数が有意に低下するが、4日以降の投与群では全く効果がなかった。以上の結果より、タクロリムスはGDNFの産生を促進して6-OHDAによるドパミン神経細胞の障害を抑制することが強く示唆された。障害から時間を経るとタクロリムスの効果がなくなることから、誘導されたGDNFは6-OHDAの毒性に対する抵抗性を神経細胞に付与しその生存を維持すると推定された。

5) 新しいイムノフィリンリガンドの開発 (分担：古川昭栄)

免疫抑制剤は細胞内でイムノフィリンと呼ばれるタンパク質に結合し、広義にはイムノフィリンリガンドと総称される。イムノフィリンは免疫細胞だけでなく脳にも多く存在する。イムノフィリンリガンドは種々の病態モデル動物の神経細胞死を抑制することが知られており、免疫抑制効果を持たずに神経栄養因子効果を発揮する物質も開発されている。本研究においても、GDNFやBDNFの産生誘導をおこすタクロリムスの投与量は免疫抑制効果に必要な量の10分の1程度であり免疫抑制作用とは発現機構が異なると考えられる。これまで報告されているイムノフィリンリガンドの神経栄養効果は主にBDNFやGDNFの産生を介して発揮されると考えられる。イムノフィリンリガンドを臨床応用するには免疫抑制作用のないものを新規に開発する必要がある。

イムノフィリン上にはカルシウムチャンネルとの結合部位が存在するが、この構造と類似するIle-Leuジペプチドに、神経細胞の生存維持活性、神経栄養因子産生促進作用があることを見出した。このジペプチドは免疫抑制作用をもたないと推定している。次年度ではこれを化学的に修飾し、安定化、活性の向上、プロドラッグ化を計る予定である。

6) レトロウイルスベクターによるBDNF遺伝子の導入・発現 (担当：渡辺里仁)

神経栄養因子の遺伝子を脳で発現させる技術は将来の遺伝子治療につながる重要な課題である。そこで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発現する条件を決定するための検討を行った。

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、変異型緑色蛍光蛋白質(EGFP)遺伝子とBDNF遺伝子との融合蛋白遺伝子を作成した。しかし、EGFPの発現はレトロウイルスベクターで導入・発現させた場合特に減弱しかつ不安定であった。昨年度までに、パッケージ細胞の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が、本年度は、不安定な発現を誘導する責任部位を更に絞り込んだ。

E. 結論

シクロスポリンA, タクロリムスおよび4MCとその高分子誘導体は, 末梢投与によって脳でのBDNFやGDNFの産生を促進するばかりでなく, パーキンソン病モデル動物や糖尿病病態モデル動物に対して明瞭な神経保護効果を示した。これら化合物を化学的, 物理的に修飾することにより, 将来, 神経変性疾患治療薬に発展する薬物の創製につながるものと期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nitta A., Itoh M., Fukumitsu H., Ohmiya M., Sometani A., Nomoto H., Furukawa Y., Furukawa S. 4-Methylcatechol increases brain-derived neurotrophic factor content and mRNA expression in cultured brain cells or in vivo brain of rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 291, 1276-1283, 1999
- 2) Fukumitsu H., Sometani A., Ohmiya M., Nitta A., Nomoto H., Furukawa Y., Furukawa S.: Induction of a physiologically active brain-derived neurotrophic factor in the infant rat brain by peripheral administration of 4-methylcatechol. *Neurosci. Lett.*, 274, 115-118, 1999

2. 学会発表

- 1) 鈴木宣雄, 新田淳美, 古川昭栄
糖尿病によって誘発される中枢神経機能障害に対する4-メチルカテコールの保護効果
第42回日本神経化学会, 1999年9月15-17日 (広島)
- 2) 新田淳美, 西岡博史, 古川昭栄
イムノフィリンリガンドの神経栄養因子産生増強作用と神経保護効果
第42回日本神経化学会, 1999年9月15-17日 (広島)
- 3) 新田淳美, 西岡博史, 古川昭栄
サイクロスポリンAによる神経栄養因子産生誘導作用 日本薬学会第120年会, 2000年3月28-31日 (岐阜)
- 4) 鈴木宣雄, 新田淳美, 古川昭栄
糖尿病によって誘発されるBDNFの発現減少に対する4-メチルカテコールの抑制効果
日本薬学会第120年会, 2000年3月28-31日 (岐阜)

- 5) 福光秀文, 高瀬 (余田) 明, 渡辺里仁
中枢神経病原性ウイルス (A8ウイルス) 感染がEAEに及ぼす病理学的変化
第12回日本神経免疫学会学術集会, 2000年2月3-4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

神経栄養因子産生誘導物質の検索およびそれら化合物の
末梢投与による中枢神経系への効果について

古川昭栄 (岐阜薬科大学・薬学部・教授)

研究要旨 昨年度の本研究において4-メチルカテコールや免疫抑制剤などの12種類の化合物に、培養神経細胞やアストロサイトの神経栄養因子産生を促進する活性を見い出した。今年度は、これらの候補化合物は末梢投与すると正常ラット脳内のBDNFやGDNFの産生を増強するばかりでなく、病態モデル動物における脳神経細胞の変性や機能低下が抑制されることを明らかにした。これらの結果は、培養神経系細胞に対して神経栄養因子の産生を促進する効果を持ち、さらに末梢から脳に移行できる化合物は、脳内で神経栄養因子の発現を促すことができ、その結果、神経細胞保護効果を発揮すると考えられた。このような化合物は将来の脳神経疾患治療薬として有望であると考えられた。

A. 研究目的

パーキンソン病、ハンチントン舞踏病、小脳変性症などは脳の特定の神経細胞が死滅することによって引き起こされる脳神経変性疾患である。近年、いくつかの遺伝性疾患において変異遺伝子がポジショナルクローニングされ、病因解明の突破口が開かれた。しかし同定された遺伝子の異常がどのように病気と結び付くのか明快な結果がまだ得られていない疾患も多い。したがってこれら疾患には依然として抜本的な治療法がないのが現状である。

神経栄養因子は未熟な神経細胞に作用して、その生存を維持し、分化を促進する活性を有する生体内物質として見い出された。さらに近年の多くの研究により障害を受けた神経細胞の変性・脱落を抑制し、神経機能を修復・再建するなど、成熟神経細胞にも作用することが明らかとなった。動物を用いたこれらの結果から、脳神経変性疾患の治療薬として神経栄養因子が有望視されるようになってきた。しかし神経栄養因子を末梢投与しても肝臓や血中で分解されやすい上に脳・血液関門を通過できず、脳での効果が期待出来ないなど、タンパク質であることが治療薬としての利用を制限している。だからといって、脳に直接神経栄養因子を注入することは倫理的・技術的に問題がある。

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には、末梢神経障害を改善する作用、坐骨

神経の再生線維を著明に増加させる作用があることを報告している。この事実は神経栄養因子産生の促進、誘導が神経疾患の治療に有効であることを示唆している。しかし末梢では有効であっても、脳神経系疾患に効果を示した例は報告されていない。その理由として中枢神経系におけるNGF受容体の分布領域が狭く、仮に脳でNGFの産生誘導を起こしても脳には作用を及ぼさない可能性がある。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)および作用濃度が低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、脳で神経栄養因子の合成を促進する低分子化合物の開発を行った。

平成10年度(初年度)では、培養神経細胞を使ったin vitroスクリーニングにより、細胞内カルシウムを高める作用をもつ物質、神経伝達物質関連物質及びビタミンK3、さらに免疫抑制剤シクロスポリンA、タクロリムスなどにBDNF及び/またはGDNFの産生を促進することを見い出した。そこで平成11年度では、これらの候補物質について、1) in vivoでの活性と薬効の評価、2) 脳の物質代謝ホメオスタシスへの影響、3) 薬効の強化とプロドラッグ化、4) 新規活性物質の創製、などを行ったほか、5) 生薬成分にまで対象を拡大して新しい活性物質の探索を継続して行った。

本研究のストラテジーの妥当性と候補物質の医学的ポテンシャルを示すことによって産業界の新薬開発気運を高め、有効な新薬の開発を引

き出すことが本研究の最終目的である。脳神経変性疾患に対する治療薬の開発は多くの患者が待ち望んでおり、保健医療行政にも多大な貢献を成すと考える。

B. 研究方法

1) In vitro での神経栄養因子産生評価

a) 神経細胞、アストロサイトの初代培養

神経細胞：胎生18日齢のラット海馬をトリプシンで分散後、血清を含む培地で24時間培養した。被検化合物を溶解した完全無血清培養液に交換してさらに一定時間培養した。

アストロサイト：胎生21日齢ラット大脳皮質、海馬をトリプシンで分散後、血清を含む培養液で培養を開始した。細胞が飽和密度に達した後、継代し、再び飽和密度に達した後、被検化合物を含む培養液で一定時間培養した。

b) 培養液中の神経栄養因子レベルの測定

被検物質を含む培養液で24時間培養した後、培養液中のBDNF、NGF、NT-3、GDNFの各神経栄養因子レベルをそれぞれに特異的な酵素免疫測定法(enzyme immunoassay: EIA)法で定量した。

c) mRNA発現レベルの測定

被検物質を含む培養液で24時間培養した後、細胞から総RNAを抽出、単離し、逆転写PCR(reverse-transcription polymerase chain reaction: RT-PCR)法によってBDNF、NGF、NT-3、GDNFの各神経栄養因子mRNAレベルを調べた。βアクチンのmRNA発現に対する比で表わした。

2) in vivo での神経栄養因子産生評価

PBS、DMSOなどに溶解した候補物質(4-MC、免疫抑制剤など)を、正常または病態モデル動物(6-ヒドロキシドーパミン(6-OHDA)の線条体注入モデル、ストレプトゾトシン(STZ)惹起性糖尿病モデル)の腹腔内へ投与し、経時的にNGF、BDNF、NT-3、GDNFのタンパクレベル及びmRNAレベルをEIA法及びRT-PCR法で解析した。

3) 病態モデル動物の作製

a) パーキンソン病モデル動物の作製

5週齢のddy系雄マウスの右側線条体にアスコルビン酸に溶解した6-OHDA (12.5 μg/μl)をマイクロシリンジを用いて麻醉下で注入することによって作製した。このモデル動物は片側のドーパミン神経細胞が障害されるため、ドーパミンを遊離させる薬物であるメタアンフェタミンを投与することによって、著しい片側回転運動が観察される。回転数を数えることによってドーパミン神経細胞の障害の程度を推定できる利点をもつ。

b) ストレプトゾトシン(STZ)惹起性糖尿病モデル

7週齢のWistar系雄性ラットにストレプトゾトシン(STZ: 45 mg/kg)を投与しランゲルハンス島β細胞を破壊することによってインスリン依存性I型糖尿病モデルを作成した。このときをSTZ投与の1週間前から4-MC (100 μg/kg)投与を開始し、1日1回、5週間連続で腹腔内投与した。最終投与から24時間後に、学習・記憶能力の測定を行った後、軽麻酔下で断頭し、脳内BDNF量を測定した。

4) 馴れ行動試験法

ラットの記憶・学習能力の測定には数多くの試験法が考案されている。しかし、強制的な運動や水泳をとまったり、記憶の強化方法が絶食、絶水または痛みなどであることが多い。糖尿病モデルラットは運動能力、感覚能および摂食や飲水に対する要求の程度がコントロールラットとは大きく異なる。そのため、本研究では侵害的なモチベーションを用いないで行うことのできる馴れ行動学習法で記憶能力を評価した。この試験法は、ラットは初めて暴露される環境では探索行動をとるため、自発運動量が増加するが、2度めに暴露されたときは周りの環境を記憶して行動量が減少することを利用している。本実験では、1m四方の灰色の板の周囲に15cmの高さの壁を作り、内部をラットに15分間探索させ、その間の行動量を測定した(訓練試行)。24時間後に同じ試行を行い(保持試行)、行動量の減少の程度を記憶・学習能力として評価した。

5) 脳代謝に関与する脳内酵素の測定

a) 薬物代謝酵素

シクロスポリンAの連続投与が脳代謝系に及ぼす影響を調べるため以下の実験を行った。7週齢のWistar系雄性ラットにシクロスポリンA(1.5または5.0 mg/kg)を1日1回連続10日間、腹腔内投与した後、脳を摘出した。前頭葉皮質、梨状葉皮質、海馬、線条体、間脳、中脳、小脳、橋/延髄の8部位に分け、それぞれのPBS抽出液について、グルタチオンS-転移酵素(GST)、キノン還元酵素(QR)、グルコース6リン酸脱水素酵素(G-6-P DH)、グルタチオン還元酵素(GR)、グルタチオンパーオキシダーゼ(GSH-Px)、乳酸脱水素酵素(LDH)、モノアミン酸化酵素(MAO)の7種類の薬物代謝関連酵素の活性を測定した。酵素単位として1分間に1mmol/minの基質分解量に相当する酵素量を1 unitとして表し、組織中の湿重量(mg)当たりの酵素活性量として表した。

b) アルカリフォスファターゼ活性

5)と同じ条件でラットにシクロスポリンAを投与し、同様に脳を8部位に分けて採取した。PBSを加えてホモジネートとし、その1/3量に相当するn-butanolを添加し、4℃にて3時間攪拌した。透析膜に移し10 mM Tris-HCl緩衝液(pH 7.5)に対して4℃にて十分透析したのち、アルカリフォスファターゼ活性をKind-King法に基づき測定し、1分間に1mmol/minの基質分解量(phenol)に相当する酵素量を1 unitとし、組織中の湿重量(mg)当たりの酵素活性量で表した。

c) スーパーオキシジスムターゼ (SOD) 活性

5)と同じ条件でラットにシクロスポリンAを投与し、同様に脳を8部位に分けて採取した。組織重量の10倍量のPBS中で組織を超音波破碎し、遠心分離した上清についてSOD活性を測定した。

C. 研究結果およびD. 考察

1) in vitro で神経栄養因子産生を促進する物質

培養神経細胞および培養アストロサイトを用いて約200種類の候補化合物を検索し、BDNFまたはGDNFの生合成を促進する12種類の低分子活性物質を新しく同定し、これらの用量依存的な作用、再現性などを詳細に検討した。具体的に

は、1) 免疫抑制剤であるシクロスポリンA、タクロリムスにBDNF、GDNFの産生促進活性を、2) 細胞内カルシウムを高める物質(A23187, KT-5720, H89), アセチル-L-カルニチン, 4-メチルカテコール(4MC)などにBDNFの産生促進活性を、3) NO合成酵素阻害物であるL-NO-nitroarginine methyl ester (L-NAME) (図1), フォスホリパーゼC, A2阻害物阻害物質であるU-73122 (図2) およびビタミンK3にGDNF産生促進活性を見出した。その他、分担研究者飯沼によって提供された植物成分(生薬)にも非常に有望な活性見出しつつある(図3)。

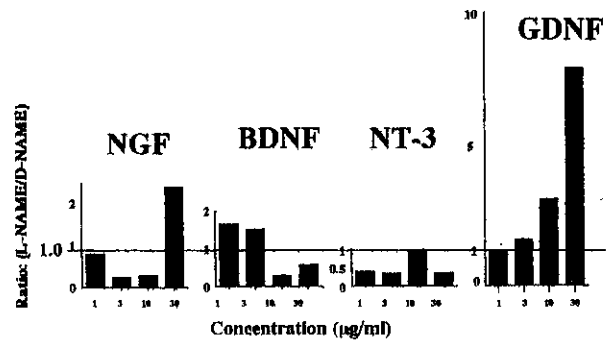


図1 L-NANEによる培養海馬神経細胞のGDNF産生の増強

種々の濃度におけるL-NANE添加時の値をD-NANE(不活性)添加時の値で割った比で表示した。

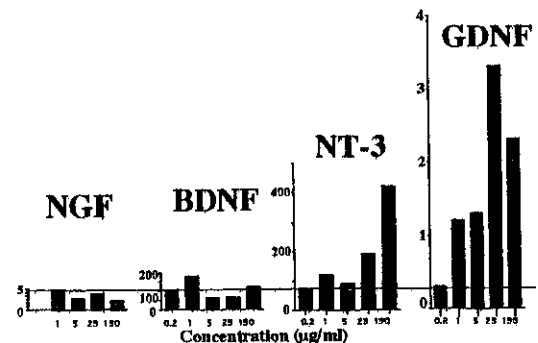


図2 フォスホリパーゼC, A2阻害物阻害物質, U-73122による培養海馬神経細胞のNT-3, GDNF産生増強作用

種々の濃度のU-73122の添加時の値を無添加時の値で割った比で表示した。

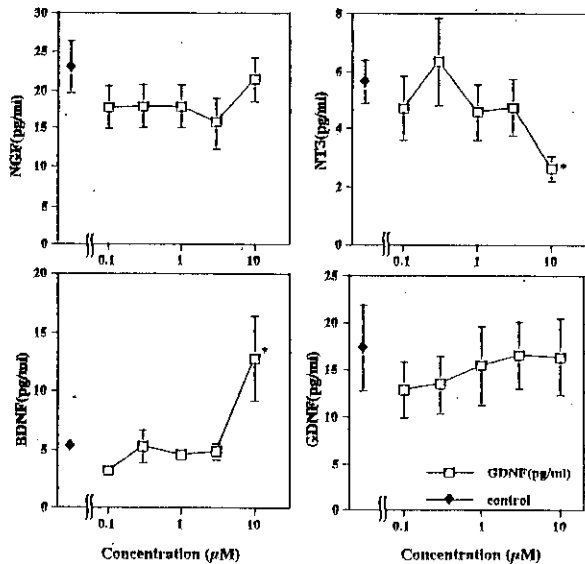


図3 生薬成分FIC-4による培養アストロサイトのBDNF産生増強作用

FIC-4はポリフェノール類の一つであり構造既知物質である

タクロリムスは培養神経細胞のBDNF, GDNF産生を促進するので、培養下で中脳ドパミン神経細胞の生存維持や分化促進作用を示すと推定された。そこで、胎生14日ラット中脳から培養した神経細胞に10-1000pg/mlのタクロリムスを添加すると用量依存的にチロシン水酸化酵素 (tyrosine hydroxylase: TH) 陽性細胞数が増加した (図4)。すなわち、産生増強されたこれ

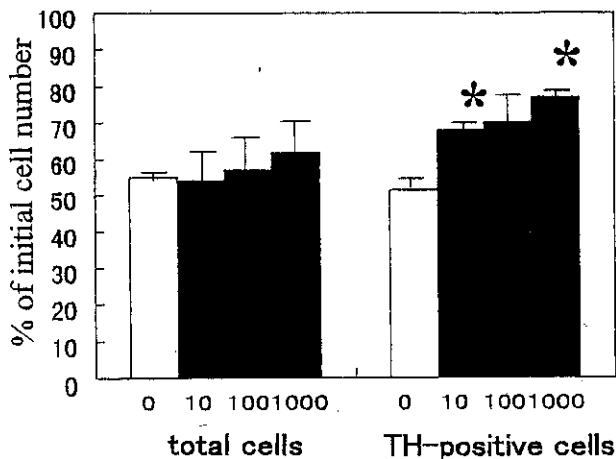


図4 培養中脳神経細胞の総数とチロシン水酸化酵素陽性細胞数に及ぼすタクロリムスの効果
*P<0.05

ら神経栄養因子は神経細胞自身に作用を及ぼすことが判明した。同様の実験をBDNFノックアウト

トマウスから培養したニューロンについても試みたところ、タクロリムスは野性型マウス由来神経細胞とノックアウトマウス由来神経細胞のいずれにも同程度にGDNF産生を促進し、生存するTH陽性神経細胞の数にも両者に顕著な違いは見い出せなかった。このことより、ドパミン神経細胞へのタクロリムスの作用はBDNFよりGDNFの産生誘導による影響が主体的であると考えられた。

2) in vivo での神経栄養因子産生とその薬効評価

a) パーキンソン病モデルに対するタクロリムスの効果

シクロスポリンA, タクロリムス, 4MCの in vivo での薬効を評価するため、それぞれ正常ラットや6-OHDAで線条体を障害したモデル動物の腹腔に投与し、脳でのBDNFまたは/およびGDNF産生が促進されることを証明した。一部については、それに付随して神経特異的なカルシウム結合タンパク質であるカルピンジンド-28の発現が促進されることを明らかにした。

a) タクロリムスによる中脳ドパミン神経細胞保護作用: 6-OHDAで片側線条体を障害したモデル動物の腹腔にタクロリムスを投与し、線条体と大脳皮質におけるGDNFタンパク質の変化を調べた (図5)。その結果、タクロリムスの1.5 mg/kg体重投与によって障害側の線条体、大脳皮質のいずれにおいてもGDNF量が著しく増加していた。これとは別にタクロリムスの投与に

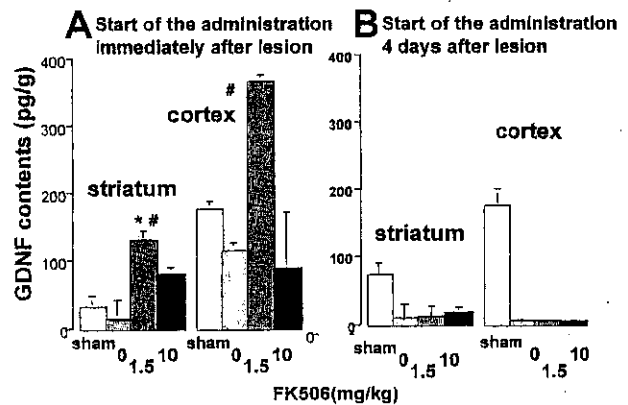


図5 線条体への6-OHDA注入後の線条体内及び大脳皮質内GDNFレベルとそれに及ぼすタクロリムス(FK506)投与の効果

A: 6-OHDA注入直後よりタクロリムスを投与した群; B: 6-OHDA注入4日後よりタクロリムスを投与した群

は関係なく非障害側では偽手術群に比べて明らかにGDNF量が低下していた。片側を6-OHDAで障害することによって非障害側におけるGDNF産生又は輸送が変化すると考えられる。このようにタクロリムスの投与により障害側で顕著なGDNF産生が起ることから、ドパミン神経細胞に対する保護効果が期待される。そこで、6-OHDA投与直後からタクロリムスを投与する群と、投与4日後からタクロリムス投与を開始する群についてメタアンフェタミン投与による回転運動を計測した(図6)。その結果、6-OHDA投与直後からタクロリムスを投与した群では、タクロリムス投与量依存的に回転回数の有意な低下が観察された。しかし4日後から投与した群ではタクロリムスの効果は全く観察されなかった。以上の結果より、タクロリムスはGDNFの産生を促進することにより、6-OHDAによるドパミン神経細胞の障害を機能的に緩和する作用をもつことが明らかとなった。

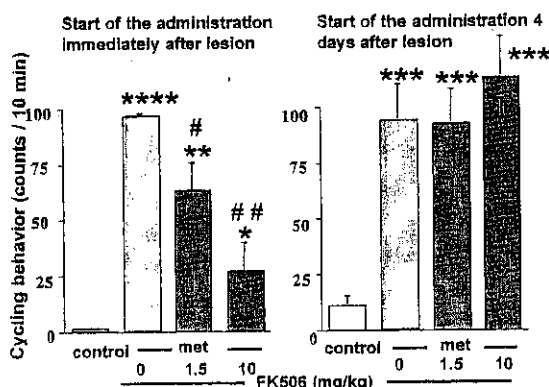


図6 線条体損傷モデルの回転運動に及ぼすタクロリムスの効果

左: 6-OHDA注入直後よりタクロリムスを投与した群; 右: 6-OHDA注入4日後よりタクロリムスを投与した群 有意差: control群に対して *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.005$; ****, $P < 0.0001$; 投与量 0 mg/kg群に対して #, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$

b) 新しいイムノフィリンリガンド開発の試み

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。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は免疫抑制効果が発揮される10分の1量であり、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の産生を介すると考えられる。臨床への応用をめざすためには免疫抑制作用のないイムノフィリンリガンドの開発が重用である。

イムノフィリンは通常小胞体のIP3受容体とリアノダイン受容体のLeu-Pro構造に結合しカルシウムもれを防いでいるが、免疫抑制剤が結合すると離脱し、細胞質へカルシウムが遊離されることが知られている。すなわち免疫抑制剤は細胞内カルシウムの増加を介してBDNF産生の亢進を引き起こすと推定される。この観点から、イムノフィリン上のカルシウムチャンネル結合部位と類似した構造をもついくつかの合成ジペプチドを合成し、培養神経細胞に添加したところIle-Leuジペプチドに神経細胞生存維持活性があることを見出した。このジペプチドは免疫抑制剤とは作用機構が異なる知見を得ており、免疫抑制作用をもたず、神経栄養因子作用を示す可能性があると推定している。次年度で、①Ile-Leuペプチドの免疫抑制作用の有無を確認し、②Ile-Leuペプチドを化学的に修飾し、安定化、活性の向上、プロドラッグ化を計る予定である。

b) 糖尿病モデルラットに対する4MCの効果

すでに我々は、STZ投与により膵臓ランゲルハンス島β細胞を破壊した糖尿病モデルラット脳では著しいニューロトロフィン産生の低下が起こることを明らかにしている。このことは脳神経機能に影響する可能性がある。そこで形態観察を行い、さらにニューロン機能を担う種々の機能タンパク質の発現を解析した。その結果、①Golgi染色像の解析により、糖尿病ラットでは大脳皮質錐体ニューロンのspine構造の不明瞭化とbasal dendritesの分枝数が減少していた。②免疫組織化学的に解析した結果、糖尿病群では海馬歯状回の樹状突起領域でcalbindin D-28の染色性の減弱、海馬全体のsyntaxinの減弱、大脳皮質内のNPY陽性神経細胞数、線維密度の減少、などがみられた。しかしアストロサイトのマー

カーであるGFAPの発現、分布には変化がなかった。③イムノプロット法による解析では海馬における calbindinD-28, synaptophysin, syntaxinの各タンパク質の含量が有意に低下していた。

すなわち本糖尿病モデルラット脳では機能タンパク質の発現が著しく損なわれており、シナプス機能やニューロン機能を支える構造にも異常が起きていると考えられた。そこで、BDNF産生促進作用を有する4MCを投与し、糖尿病モデルラットで見られる神経機能障害や、BDNF発現におよぼす影響を調べた。STZ投与前の1週間、投与後4週間、毎日ラット腹腔内に4MCを投与(100 µg/kg体重)すると、血糖値は変化しないが、海馬におけるBDNFタンパクやBDNFmRNAの低下が抑制された。また馴れ行動試験で空間認知能力を評価するとその低下が抑制された(図7)。すなわち4MCによってBDNF産生を高めると糖尿病に付随する脳神経障害を予防できることが示唆された。

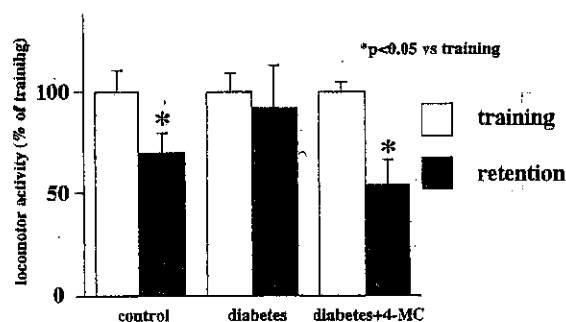


図7 糖尿病が誘発する空間認知能の低下と4MC投与によるその抑制

3) シクロスポリンA投与による脳代謝関連酵素活性への影響

シクロスポリンAを正常ラットに連続投与し、その副作用として脳のホメオスタシスにどのような影響を与えるかを種々の酵素活性を指標として脳各部位について検討した。

a) 神経栄養因子レベル

シクロスポリンA (1.5または5.0 mg/kg)を1日1回連続10日間、腹腔内投与すると線条体、梨状葉皮質においてNGF, NT-3, BDNF, GDNFの有意な増加が観察された。他の部位

(前頭葉皮質、海馬、間脳、中脳、小脳、橋/延髄)ではそのような変化は見られなかった。複数の異なる神経栄養因子が類似する部位特異的变化を示す理由として、部位ごとに、①シクロスポリンAの脳への移行の度合いが異なる、②神経栄養因子に対する神経細胞の応答が異なる、③測定上の問題、などが考えられる。

b) 薬物代謝酵素活性

GST, QR, G-6-P DH, GR, GSH-Px, LDH, MAOの7種類の酵素のうち、MAO活性だけが線条体でのみ有意に上昇していた(無処理群: 0.061 ± 0.009 ; 処理群: 0.072 ± 0.008 ; 単位, $\mu\text{U}/\text{mg}$ タンパク質; $P < 0.05$)。神経栄養因子レベルの変化が線条体で最も大きかったことと関連していると思われる。MAOはアストロサイトに分布する酵素であることから、アストロサイトの細胞機能に変化が起こったことを示唆している。神経栄養因子は神経細胞に作用するがアストロサイトには影響しないので、この変化は産生増強された神経栄養因子の作用ではなくシクロスポリンAのアストロサイトへの直接的な作用であると考えられる。しかしMAO以外の酵素では有意な活性変動を認めなかった。すなわち、シクロスポリンAや神経栄養因子の産生亢進が脳の物質代謝系ホメオスタシスを攪乱する可能性は低いと考えられた。

c) アルカリフォスファターゼ活性

神経栄養因子やMAOの変化と同様に、アルカリフォスファターゼ活性は線条体でのみ変化が観察され、しかも有意な低下を示した(無処理群: 2067 ± 540 ; 処理群: 920 ± 419 ; 単位, mU/mg タンパク質; $P < 0.05$)。脳の血管内皮細胞、シナプス小胞、グリア細胞、シナプス前膜およびシナプス後膜にアルカリフォスファターゼが存在するが多くの哺乳類で証明されている。脳血液内皮細胞にみられるアルカリフォスファターゼは、中枢神経系におけるリン酸エステルの代謝に関与すると考えられている。今回の結果は脱リン酸化活性の低下が線条体で起こっていることを示している。他の部位では有意な変化は見られなかった。

d) スーパーオキシドジスムターゼ活性

脳は他の臓器に比べ酸素消費量が高く、また、

カテコールアミンや不飽和脂肪酸のように容易に酸化される物質が豊富なので活性酸素による障害を受けやすい。スーパーオキシディスムターゼ (superoxide dismutase: SOD) は活性酸素のうち、スーパーオキシド (酸素分子の1電子還元物質) を消去する酵素であり、ヒトをはじめとする哺乳動物では主に細胞質に存在するCu, Zn-SOD, ミトコンドリアマトリックスに存在するMn-SOD, 分泌酵素であるextracellular-SODの3種が存在する。今回の検討では、前頭葉皮質、梨状葉皮質、海馬、線条体、間脳、中脳、小脳、橋/延髄の8部位すべてについてSOD活性にはシクロスポリンAの投与の影響が全く見られなかった。

NGF, BDNFによるSOD活性の亢進, NGFによるSOD mRNAレベルの上昇などが報告されている。またCu, Zn-SODの発現低下がPC12細胞のアポトーシスやNO-ONOO (パーオキシナイトライト) による神経細胞死の原因になることも報告されている。一方、家族性筋萎縮性側索硬化症の原因遺伝子としてCu, Zn-SODがあげられているなど、神経細胞死との関係は多数指摘されている。しかし、今回の結果は、シクロスポリンAによる神経細胞保護効果は、SODとは直接関係していないことが判明した。やはり、GDNFなどの神経栄養因子産生誘導によるSODとは独立した経路の活性化が関与していると推定された。

E. 結論

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。これらの化合物のうちタクロリムスや4MCは、末梢投与によって脳でのBDNFやGDNFの合成を促進し、パーキンソン病モデル動物や糖尿病病態モデル動物に対して明らかな神経保護効果を示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nitta A., Itoh M., Fukumitsu H., Ohmiya M., Sometani A., Nomoto H., Furukawa Y., Furukawa S. 4-Methylcatechol increases brain-derived neurotrophic factor content and mRNA expression in cultured brain

cells or in vivo brain of rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 291, 1276-1283, 1999

- 2) Fukumitsu H., Sometani A., Ohmiya M., Nitta A., Nomoto H., Furukawa Y., Furukawa S.: Induction of a physiologically active brain-derived neurotrophic factor in the infant rat brain by peripheral administration of 4-methylcatechol. *Neurosci. Lett.*, 274, 115-118, 1999

2. 学会発表

- 1) 鈴木宣雄, 新田淳美, 古川昭栄
糖尿病によって誘発される中枢神経機能障害に対する4-メチルカテコールの保護効果
第42回日本神経化学会, 1999年9月15-17日 (広島)
- 2) 新田淳美, 西岡博史, 古川昭栄
イムノフィリンリガンドの神経栄養因子産生増強作用と神経保護効果
第42回日本神経化学会, 1999年9月15-17日 (広島)
- 3) 新田淳美, 西岡博史, 古川昭栄
サイクロスポリンAによる神経栄養因子産生誘導作用
日本薬学会第120年会, 2000年3月28-31日 (岐阜)
- 4) 鈴木宣雄, 新田淳美, 古川昭栄
糖尿病によって誘発されるBDNFの発現減少に対する4-メチルカテコールの抑制効果
日本薬学会第120年会, 2000年3月28-31日 (岐阜)

G. 知的所有権の取得状況

なし

活性化化合物の物理化学的修飾・徐放化

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、前年度合成した 1-benzoyl-4-methylcatechol (I) を側鎖に有する高分子プロドラッグからの *in vitro* における薬物放出性について検討した。その結果、I は定量的に放出され、かつ、高分子プロドラッグ中の I の含有量により薬物放出速度の制御が可能であることが示唆された。また、本高分子プロドラッグの NGF 産生効果について検討したところ、反応時間とともに NGF の量は増加傾向を示し、薬物の徐放化による活性の増大が示唆された。

A. 研究目的

脳内の恒常性を維持するために、血液脳関門 (BBB) には様々な輸送機能が存在する。これらの機能を介して一部のペプチド (ホルモンなど) は脳内に移行するが、一般に高分子は BBB を通過することができない。最近、アルツハイマー患者の脳内において血清蛋白が確認され、BBB の異常透過性が示唆された。したがって、アルツハイマー患者におけるこの BBB 異常透過性を利用して、高分子側鎖に薬物を結合した高分子プロドラッグを用いれば、受動的に脳疾患部位に薬物を運搬することが可能と考えられる。

本研究の主任研究者である古川らはすでに、4-methylcatechol (4MC) が有効な神経成長因子 (NGF) 促進剤であることを見出し出しているが、十分な脂溶性を持たないため BBB を通過するのが困難である。前年度においては、4MC の脂溶性を高めるためそのベンゾイル誘導体 (I) の合成と I を高分子側鎖に有する水溶性高分子プロドラッグの構築を行った。

上述の理由により、前年度において構築した高分子プロドラッグは受動的ターゲティングによるアルツハイマー治療薬としての利用が期待される。本年度は、前年度において構築した高分子プロドラッグの *in vitro* における薬物放出性について検討した。また、本高分子プロドラッグの *in vivo* における NGF 産生効果を評価するため、合成のスケールアップと共同研究者への試料の提供を行った。

B. 研究方法

1. 試料

4-methylcatechol 誘導体として、*p*-cresol と過酸化ベンゾイルとの反応により 1-benzoyl-4-methylcatechol (I) を合成した。I のビニル誘導体 (II) は I 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

(III) を合成した。

2. メカノケミカル固相重合

化合物 (II) と (III) 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. *in vitro* 薬物放出試験

高分子プロドラッグの加水分解反応はフラスコ震盪法 (密閉系) を用い、アセトニトリルと pH7.4 のリン酸緩衝液の等量混合液中、37℃にて実施した。加水分解反応液を経時的にサンプリングし、HPLC により遊離した薬物を定量した。

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/l 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. *in vitro* における高分子プロドラッグからの薬物放出特性

前年度の報告から明らかなように、1-benzoyl-4-methylcatechol (I) は脂溶性の高い化合物であるため、水に対する溶解性が極めて低い。したがって、水を溶媒として密閉系にて薬物放出試験を実施すると、速やかに飽和溶液に達するため sink 条件を満たさず、高分子プロドラッグからの薬物放出が抑制される。本研究では、かかる問題点を回避するため、アセトニトリルと pH7.4 リン酸緩衝液の等量混合液中にて薬物放出試験を実施した。

図 1 は本研究において使用した高分子プロドラッグの構造を示したものである。高分子プロドラッグ中の I の含有率が 10mol% と 20mol% の 2 種類の高分子プロドラッグ (Poly(10)、Poly(20)) を合成した。両者とも数平均分子量が 28,000、多分散度が 1.10 であり、水溶性の高分子であった。図 2 は本研

究において実施した薬物放出試験の概要を示したものである。上述の混合溶媒を用いて、37℃、フラスコ震盪法（密閉系）により加水分解を行い、経時的にサンプリングをし遊離する薬物の量をHPLCにより定量した。

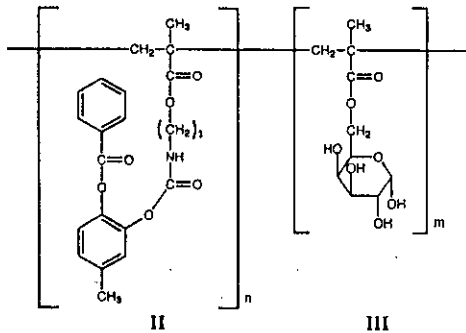


図1 1-Benzoyl-4-methylcatechol (I) を側鎖に持つ高分子プロドラッグ

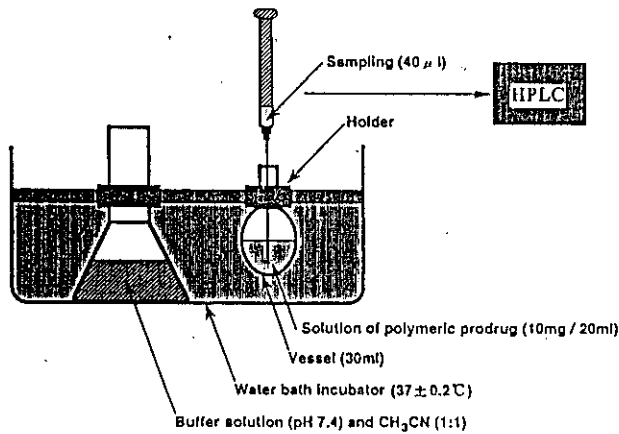


図2 薬物放出試験装置の概要

図3は本高分子プロドラッグから遊離した化合物Iの濃度の経時変化を示したものである。両高分子プロドラッグはいずれも極大値を持つ濃度変化を示すが、極大値に達するまでの時間はPoly(20)の方が長時間を要した。このような濃度変化を示すのは、化合物Iがさらに加水分解され親薬物である4MCになるためであり、事実、HPLCのピークにおいても経時的に4MCのピーク強度は増大した。

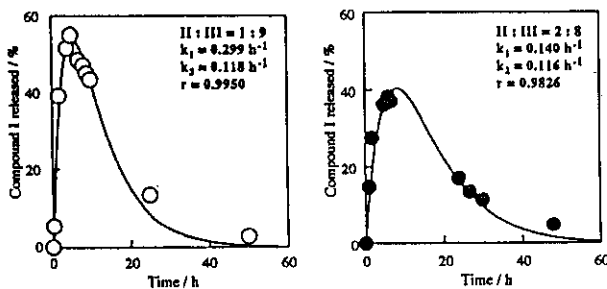


図3 I を側鎖に有する高分子プロドラッグの加水分解反応挙動
○ ; Poly(10)、● ; Poly(20)。

2. 薬物放出速度解析

図4は本高分子プロドラッグの加水分解反応のスキームを示したものである。高分子プロドラッグの加水分解反応過程の速度を k_1 とし化合物Iの加水分解反応過程の速度を k_2 とすると、次の2つの反応速度式が導かれる。

$$-d[P]/dt = k_1 [P]$$

$$d[I]/dt = k_1 [P] - k_2 [I]$$

ここで[P]は高分子プロドラッグに結合している化合物Iの濃度、[I]は遊離した化合物Iの濃度、そしてtは時間を表す。上記の2式より、Iの濃度変化に関する次式が導かれる。

$$[I] = k_1 P_0 (\exp(-k_1 t) - \exp(-k_2 t)) / (k_1 - k_2)$$

ここで P_0 は $t=0$ における[P]を表す。本式を用いて解析した結果が、図3中の実線であり、その時の各パラメーターを表1に示す。

k_1 はPoly(10)の方が約2倍大きな値であり、 k_2 は両者ともほぼ同じ値であった。別途、同条件における化合物Iの加水分解反応速度について検討しており、その値は 0.0893 h^{-1} であった。

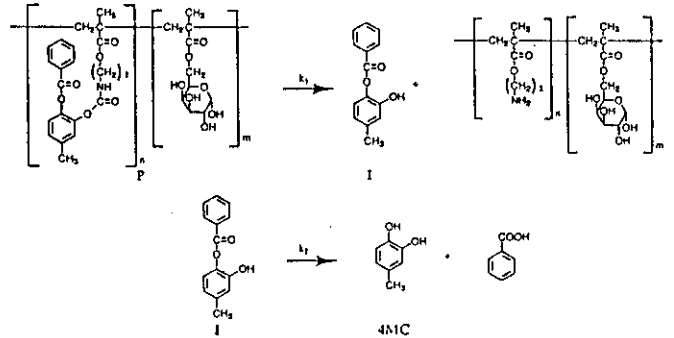


図4 高分子プロドラッグの加水分解反応

表1 薬物放出速度パラメーター

	$k_1 \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$k_2 \text{ (h}^{-1}\text{)}$	相関係数
Poly(10)	0.299	0.118	0.9950
Poly(20)	0.140	0.116	0.9826

3. 高分子プロドラッグ合成のスケールアップ

本高分子プロドラッグ合成のスケールアップを行うため、従来の小型粉砕機よりも大きな装置（中型粉砕機）を用いる高分子プロドラッグ合成について検討した。今回は、予備実験として従来の3倍量の試料を用いて検討した。

本重合反応において粉砕エネルギーは重要な因子であり、従来の装置と新たに用いた中型の粉砕機の粉砕エネルギーを比較したところ、中型粉砕機は従来の装置の約1/4のエネルギーであった。

そこで、粉砕時間を長くして（4時間）Poly(10)の合成を行ったところ、反応は定量的に進行し、かつ、短分散性の高分子プロドラッグが得られた。

本試料について、共同研究者にNGF産生効果について検討を依頼したところ、NGF産生量が経時的に増加する傾向が示された。

D. 考察

アルツハイマー患者においては、BBBの異常透過性が示唆されていることから、高分子側鎖にNGF促進剤を結合した高分子プロドラッグを用いれば、受動的に脳疾患部位に薬物を運搬することが可能であり、アルツハイマー治療薬としての有用性が期待される。

化合物(I)の高分子プロドラッグについて、組成の異なる高分子プロドラッグ(Poly(10)とPoly(20))のin vitroにおける薬物放出試験を実施した。その結果、本実験条件下においては高分子プロドラッグから化合物Iが放出されるが、Iはさらに加水分解され4MCを与えることが示された。また、その薬物放出速度式による解析を行った結果、化合物Iはいずれの高分子プロドラッグにおいても定量的に放出され、かつ、Poly(10)の薬物放出速度はPoly(20)の約2倍速いことが示された。このような反応速度の差異は、高分子プロドラッグ中のIの含有量による疎水性の違い起因すると考えられる。

本重合反応のスケールアップのために、中型の粉碎機を用いて検討した。本装置の粉碎エネルギーは従来の装置の1/4であったが、長時間粉碎することにより反応は定量的に進行し、単分散性の高分子プロドラッグが得られた。また、本高分子プロドラッグのNGF産生効果について検討したところ、経時的にNGF産生が増加する傾向が示され、この結果は高分子プロドラッグからの化合物Iの徐放化に起因するものと考えられる。

E. 結論

本研究により得られた知見を以下にまとめる。

1-benzoyl-4-methylcatechol (I) を側鎖に有する高分子プロドラッグを合成し、その薬物放出特性を検討した。高分子プロドラッグから遊離したIはさらに加水分解され、親化合物である4MCにまで加水分解されるが、定量的に放出されることを明らかにした。また、高分子プロドラッグ中のIの含有量により、その薬物放出挙動の制御が可能であることが示唆された。

本重合のスケールアップを目的として、中型の粉碎機を用いて重合を実施した。その結果、粉碎エネルギーが弱いため長時間要するものの定量的に目的とする高分子プロドラッグが得られた。本高分子プロドラッグのNGF産生効果について検討したところ、反応時間とともにNGF産生量は増加する傾向を示し、薬物の徐放化による活性の増大が示唆された。

F. 研究発表

学会発表

- 1) 葛谷昌之、近藤伸一、古川昭栄 メカノケミカル固相重合による中枢神経疾患への適用を目的とした高分子プロドラッグの構築 第15回

G. 知的所有権の取得状況

なし

分担研究報告書

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、脳内移行性の向上を目的としたプロドラッグの合成と NGF 合成促進作用を期待した含窒素複素環化合物の合成を検討した。

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を検討した。また、NGF合成促進作用を有する新しい化合物の発見を期待して、多数の含窒素複素環化合物を合成することとした。

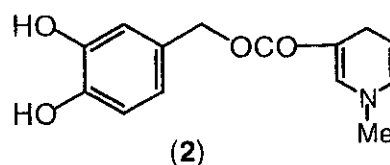
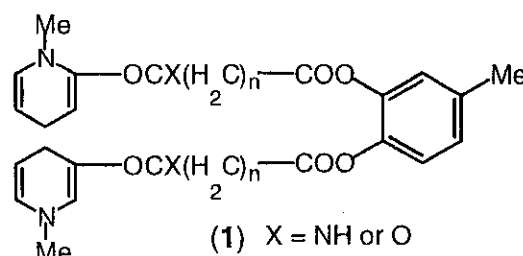
B. 研究方法

薬物の脳内滞留性を高める脳内移行補助基として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することで、脳内に滞留するようデザインした。

C. 研究結果 ・ D. 考察

プロドラッグ合成を目的とした誘導体は、リンカーを介してジヒドロピリジンを導入した(1)の化合物と、(2)に示す4-メチルカテコールのメチル基部分をヒドロキシメチル基とした後ジヒドロピリジンを導入した化合物の2種類である。(1)については現在2種類のリンカーの導入

を検討中である。(2)については合成を終了しているが、その遊離体である4-ヒドロキシメチルカテコールが NGF 合成促進作用を示さないことが判明したため、以降の検討を中止した。また、ピリミジン及び縮合ピリミジンを中心として約30種類の含窒素複素環化合物を NGF 合成促進作用のスクリーニング用に合成した。



E. 結論

最終的に(1)の誘導体の合成の達成により、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、高い脳内移行性を有する化合物の開発が期待できる。また、含窒素複素環化合物からの活性物質の検索により、新規な構造を有する NGF 合成促進作用薬の発見も期待でき興味深い。

F. 研究発表

なし

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

植物成分中の神経栄養因子産生誘導物質の抽出と同定

飯沼宗和 (岐阜県保健環境研究所・所長)

研究要旨 天然物由来あるいはその構造類似体(合成品)から脳由来あるいはグリア細胞由来神経栄養因子の産生誘導活性物質を検索することを目的とし、1) 民間伝承薬物(主として活血, 補養性生薬), 2) ポリフェノール(主としてスチルベノイド化合物) および, 3) パラあるいはメタージフェノール基を部分構造にもつ化合物に焦点を絞り, 検体とした。合成品のパラ位に酸素官能基をもつカルコン類, 天然品(*Beta vulgaris* var. *rapa*) のベタインに活性が認められた。

A. 研究目的

天然物由来あるいはその構造類似体(合成品)から脳由来あるいはグリア細胞由来神経栄養因子の産生誘導活性物質を検索することを目的とする。

B. 研究方法

民間伝承薬物(主として活血, 補養性生薬), ポリフェノール(主としてスチルベノイド化合物) および, 3) パラあるいはメタージフェノール基を部分構造にもつ化合物に焦点を絞り, 検体とした。

1) ポリフェノール類の抽出およびスチルベノイドの単離, 精製

a) *Vatica rassak* および *Shorea hemssleyama* (いずれもフタバガキ科) 植物の抽出

両植物ともインドから入手し, 樹液を実験材料に選び, 常法に従いアセトンで室温抽出し, エキスを得た。シリカゲルクロマトグラフィー(クロロホルム-メタノール系), セファデックスカラムクロマトグラフィー(メタノール系)にて精製を繰り返し, *Vatica rassak*よりFIC-13からFIC-17, *Shorea hemssleyama*よりFIC-18からFIC-23と仮称するスチルベンの三量体および四量体をそれぞれ単離した。

b) *Mallotus philippinensis* (トウダイグサ科) 植物の抽出

カラマと称される同植物(日本名:クスノハガシワ)の果実表皮の腺毛をメタノールで抽出し, そのエキスをシリカゲルクロマトグラフィー(アセトン-ヘキサン系)で精製を繰り返し, FIC-22およびFIC-23と称する二種のフロログリシノール誘導体を得た。

2) パラあるいはメタージフェノールを部分構造をもつ化合物の合成と天然からの単離

常法のアルデヒド類とアセトフェノン類とのアルドール縮合により, FIC-1からFIC-5を得た。また, 2,5-ジヒドロキシベンズアルデヒドとマロン酸(アニリン存在下)のクネベナーゲル縮合反応により, 異常付加化合物FIC-9からFIC-12を得, それぞれの構造を明らかにした。藤コブの特異成分であるFIC-6あるいはアメリカ特産の地衣類に含まれるFIC-7およびFIC-8は常法の抽出, カラムクロマトグラフィーを用いる精製により, それぞれ単離した。

3) 民間伝承薬物

赤ビート(*Beta vulgaris* var. *rapa*) (アカザ科)の根部に含まれているベタインおよびベタラニンを常法により単離した(一部合成品として市販されているものも検体として用いた)。和漢薬で活血性生薬あるいは補養性生薬として供されている, タンジン(*Salvia miltiorrhiza*) (シソ科), ハゲキテン(*Morinda officinalis*) (アカネ科), クセキ(*Cibotium barometz*) (ヘゴ科), アメリカカイカリソウ(*Vancouveria hexandra*) (メギ科)およびカワ(*Fler methysicum*) (コショ

ウ科)について、アセトン、メタノール、70%メタノールでそれぞれ抽出した。

C. 研究結果およびD. 考察

次の三つの視点に立って植物エキスの調製、単離及び合成を行い、脳由来神経栄養因子あるいはグリア細胞由来神経栄養因子の産生誘導活性測定の検体とした。

1) ポリフェノール類

ポリフェノールを、スチルベノイド化合物をフタバガキ科あるいはトウダイグサ科植物より11種類、単離、精製した。現在活性を評価中である。

2) パラあるいはメタジフェノール基を部分構造にもつ化合物の合成

合成化合物のうち、3,4-dihydrocinnamic acid (FIC-1), 2,5-dibenzoyloxy-2', β -dihydroxychalcone (FIC-3) および 2,5-dibenzoyloxy-2', 3', 4', 6'-tetramethoxychalcone (FIC-4) には、培養アストロサイトの脳由来神経栄養因子産生を促進する活性が見いだされた。p-Dihydroxybenzaldehyde とマロン酸とのクネベナーゲル縮合反応で異常反応物として得られる、付加化合物(4種類)とパラキノンあるいはオルトキノンを部分構造として持つ天然化合物(4検体)についても現在活性を評価中である。

3) 民間伝承薬物

赤ピートの根部に含まれるベタイン、ベタラニンの活性について検討した。塩酸ベタインには認められなかったが、遊離のベタインには培養ラット海馬神経細胞の生存維持活性が認められた。ベタラニンについても今後検討する予定である。ベタラニンは主成分であるベタキサンチンとベタシアニンの混合体であるため、両者を分離後、それぞれについて活性を評価する必要がある。赤ピートの利用開発が期待される。

E. 結論

オルト位に酸素官能基をもつカルコン類及び天然由来のベタインに脳由来神経栄養因子産生を促進する活性が認められた。

F. 研究発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

なし