

平成 12 年 度

厚生省科学研究費補助金（脳科学研究専業）
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）

藤岡科作（岐阜薬科大学）

飯沼宗和（岐阜県保健環境研究所）

渡辺圭仁（創価大学）

大井長和（宮崎医科大学）

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 神経保護作用を示す新規物質として、Leu-Ile ジペプチドと acetyl pipecolic acid ([A]物質)を開発した。Leu-IleにはBDNFとGDNFの、[A]物質にはNT-3の産生促進作用が見出された。一方、NGFとBDNFの産生促進活性をもつ4-メチルカテコール(4MC)に新たにMAPキナーゼの活性化作用を見いだした。これら3種の活性物質は6-OHDAによるラット線条体破壊と同時に腹腔内投与すると黒質ドパミンニューロンの変性を有意に抑制した。また、[A]物質は脊髄の半切断損傷モデルに投与すると有意に機能修復を促進した。昨年度までの成績も考慮すると、神経栄養因子産生促進活性を指標として探索された物質は中枢性神経変性疾患の治療薬へと発展する高い可能性を備えていると判断される。すなわちこの戦略は新しい視点からの神経疾患治療薬開発に貢献し、ひいては社会福祉、医療行政に寄与できる高いポテンシャルを有していると判断された。

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・創価大学生命化学研究所・教授
大井長和・宮崎医科大学・第三内科・助教授

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らか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だされた。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有望視されてきたが、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、脳での直接的効果が期待できないなど、タンパク質であることが

治療薬としての利用を困難にしているのが現状である。しかし、脳に直接神経栄養因子を注入することは倫理的・技術的に大きな問題がある。これらの問題を克服するため我々は、神経栄養因子の産生を促進する活性をもち、同時に脳に移行性の物質を見出し、これを末梢投与することによって中枢神経系での神経栄養因子産生を高めることができるのではないかと考えた(図1)。

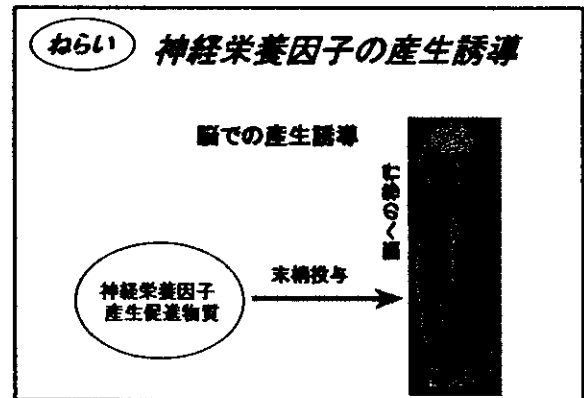


図1 神経栄養因子の産生誘導スキーム

特に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(brain-derived neurotrophic factor: BDNF)と作用の強いグリア細胞株由来神経栄養因子(glial cell line-derived neurotrophic factor: GDNF)を主な対象とし、この3年間にわたり多くの候補化合物(300種類以上)を培養海馬ニューロンを用いた in vitro

スクリーニングで検討してきたところ、約 30 種類の化合物に神経栄養因子産生を促進する活性を見出した。活性物質の主なものは、1) 免疫抑制剤であるシクロスポリン A、FK506、2) 細胞内カルシウム濃度を亢進する A23187、KT-5720、H89、3) アセチル-L-カルニチン、4) 4-メチルカテコール (4MC)、5) NO 合成酵素阻害物である L-NG-nitroarginine methyl ester (L-NAME)、6) フォスホリパーゼ C、A2 阻害物である U-73122、7) ビタミン K3、などである。

4MC と免疫抑制剤の FK506 およびシクロスポリン A については、平成 11 年度の検討により、末梢投与されたこれらの化合物がラット脳での神経栄養因子産生を促進することを確認し、さらにパーキンソンモデル動物における黒質ドパミンニューロンの変性を抑制することを明らかにした。さらに 4MC については、除法性に優れた高分子プロドラッグ化に成功し (分担研究者葛谷)、脳内移行性を高めるための化学修飾を試みてきた (分担研究者広田)。さらに生薬成分の単離や類縁物質の化学合成 (分担研究者飯沼)、脳内遺伝子発現のためのウイルスベクターの改良 (分担研究者渡辺) を行ってきた。

以上の成果を受け、最終年度である本年度は、1) 新しいイムノフィリンリガンドの創製とその薬効評価、2) 4-メチルカテコール (4MC) の神経栄養作用の解析、3) 4MC の除法化と薬効の強化をねらった高分子プロドラッグ化、4) 4MC の脳移行誘導体の合成、5) 新しい活性物質の探索、を行った。その結果、今後の治療薬開発のターゲットとなり得る 3 種の有望な活性化合物を開発することに成功した。

B. 研究方法

1) 神経栄養因子産生促進効果と病態モデル動物に対する薬効評価 (分担: 古川昭栄、大井長和)

a) in vitro での神経栄養因子産生評価

主に胎生 18 日齢のラット海馬から培養した神経細胞を用い、一部の実験には培養アストロサイトを用いた (図 2)。

被検化合物の活性測定は完全無血清培養した細胞を用いた。培養液中または細胞中の神経栄養因子レベルの測定には BDNF、NGF、NT-3、GDNF のそれぞれに特異的な酵素免疫測定法 (enzyme immunoassay: EIA) 法を用いた。mRNA の発現は、細胞から総 RNA を抽出、単離し、BDNF、NGF、NT-3、GDNF のそれぞれに特異的なプライマーを用いた逆転写 PCR (reverse-

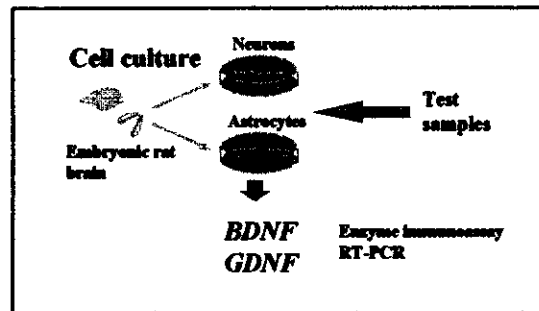


図 2 神経栄養因子産生促進活性の in vitro スクリーニング

transcription polymerase chain reaction: RT-PCR) 法によって検出した。発現量は β アクチンの mRNA 量に対する比で表わした。

b) ラット不死化シュワン細胞株 (S16) を用いた神経栄養因子産生促進作用

ラット不死化シュワン細胞株 (S16) を 10% 牛胎仔血清を含む DMEM 培養液で培養した。飽和密度に達したら Leu-Ile ペプチドを含む DMEM (0.5% 牛血清アルブミンを含む) に交換し 24 時間培養した。細胞数の計測し、培養液を採取した。

c) 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 (4MC、免疫抑制剤など) を、正常または病態モデル動物の腹腔内へ投与し、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。

d) 病態モデル動物の作製と薬効評価

ddy 系雄マウスの右側線条体に 6-ヒドロキシドパミン (6-OHDA: 12.5 μ g/ μ l) を注入した。この動物は片側のドパミン神経細胞が障害されるためメタアンフェタミンを投与すると左右不对称に線条体内へドパミンが遊離され、著しい片側回転運動を起こす。回転数からドパミン神経細胞の障害の程度を推定できる。

Wistar 系雄ラットの第 12 胸椎弓を切除後、同部位で鋭利な刃物により左側脊髄を切断した。切断 5 時間後に左後足麻痺の障害を確認した動物について経時的に歩行能力を 21 段階で評価した。

d) 免疫抑制活性の評価

マウス脾臓 T 細胞をコンカナバリン A で刺激すると同時に被検試料を培養液に加え、48 時間培養後、培養液中のインターロイキン-2 を酵素免疫測定法で定量した。

2) 4MC の物理化学的修飾、除酸化

(分担：葛谷昌之)

a) 1-benzoyl-4MC を側鎖にもつ高分子プロドラッグの作製

4-methylcatechol(4MC) 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-methyl-catechol (I) を合成した。I のビニル誘導体 (II、IV) は I と 2-(2-methacryloyloxy)ethyl isocyanate、あるいは methacryloyl chloride 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) およびグルコースのビニル誘導体 (V) を合成した。化合物 (II) あるいは (IV) 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。

b) 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。

3) 脳移行性の 4MC プロドラッグの合成

(分担：広田耕作)

4MC の脳内移行性と滞留性を高めるためリンカーを介してジヒドロピリジンを 4MC 分子に導入した。ジヒドロピリジンは高脂溶性で電荷をもたないため脳・血液関門通過性が向上する。脳内移行後にデヒドロゲナーゼ等の作用でピリジニウム塩に変換され陽荷電を帯びるため脳から外に移行しにくくなる。

a) 4-ヒドロキシメチルカテコールの合成

ジヒドロピリジン基を導入するため 4MC のメチル基をヒドロキシメチル基に変換した化合物、4-ヒドロキシメチルカテコールを合成した。

b) リンカーを介した 4MC のジヒドロピリジン誘導体の合成

4MC とジヒドロピリジンを直接結合するのではなく、適当なリンカーを導入し、両者の結合を安定化した化合物の合成を施行した。さらにこの結合は、脳内で容易に加水分解を受け 4MC が遊離されるようデザインした。

4) 植物由来の活性フラボノイドの抽出、合成

(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-2

1 のスチルベン三量体および四量体を単離し、*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。また、パラあるいはメター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、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 を合成した。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。

In vitro で強い活性を示した 3 種のカルコン類 (FIC4: 2, 5-dibenzoyloxy-2', 3', 4', 6'-tetramethoxy-chalcone; FIC5: 2, 5-dihydroxy-2', 3', 4', 6'-tetramethoxychalcone; FIC6: 2, 5-diisopoxy-2', 3', 4', 6'-tetramethoxydihydrochalcone) を大量に合成し、ラットを用いた in vivo 動物実験を施行した。

5) BDNF 遺伝子発現ベクターの構築

(分担：渡辺里仁)

昨年までに作製した神経病原性レトロウイルス由来の新規ベクター系 (LxA ベクター) に、c-Myc の部分ペプチド配列をタグとして付加した BDNFcDNA と、オワンクラゲ緑色タンパク質の cDNA を導入した。発現量を高くするため CMV ウイルスのエンハンサー・プロモーターおよび CMV ウイルスのエンハンサーの下流にアクチンのプロモーターをつないだ。

C. 研究結果および D. 考察

1) 新規 in vitro 神経栄養因子産生促進物質

(分担：飯沼宗和、広田耕作、古川昭榮)

ア) 植物成分

a) カルコン類による神経栄養因子産生促進

分担研究者飯沼によってフタバガキ科生薬成分から単離された 23 種類 (FIC 1-23) のスチルベノイド化合物について培養海馬神経細胞 NGF、BDNF、NT-3、GDNF 産生に及ぼす効果を調べた。特にカルコン類 FIC4, 5, 6 は BDNF、GDNF 産生を低濃度で促進し、FIC7 は GDNF 産生を低濃度で強く刺激した。

a) カルコン類による神経細胞生存維持作用

これらの中から FIC4, 5, 6 について培養海馬神経細胞の生存に及ぼす影響を調べた。その結果、FIC4, 5 には有意な生存維持活性（無添加群の 130-140% 生存）が観察されたが、FIC6 には認められなかった（図 3）。

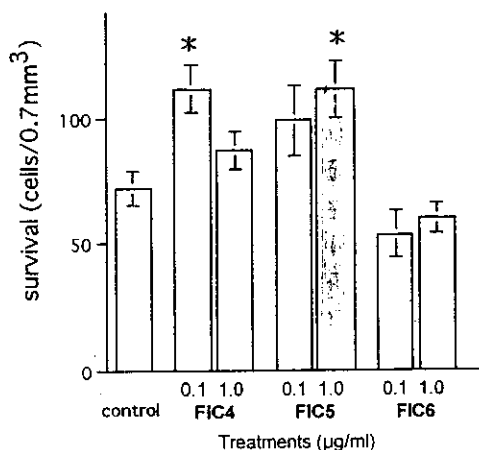


図 3 培養海馬神経細胞の生存に及ぼす FIC4, 5, 6 の効果

胎生 17 日のラット海馬をトリプシンで分散後、 $10^5/cm^2$ の細胞密度で培養した (n=8)。24 時間後に被検試料を含む無血清培養液に交換しさらに 24 時間培養し、生存細胞数を顕微鏡下で計測した。

b) カルコン類による脳内神経栄養因子産生促進次に飯沼によって多量に化学合成された FIC4, 5, 6 を成熟ラットに投与して脳の各部位での神経栄養因子含量を測定した。その結果、線条体の BDNF 含量が、FIC5 の投与によって有意に増加した（図 4）。他の部位、FIC4, 6 についても増加傾向を示す傾向はあったが統計学的な有意差には至らなかった。

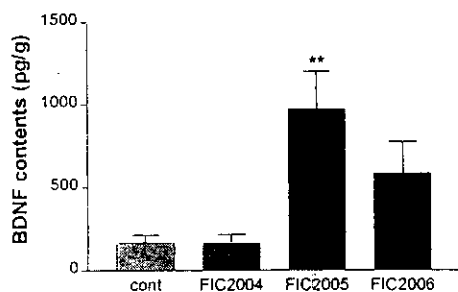


図 4 ラット線条体における BDNF 含量に及ぼすカルコン類の効果

8 週齢雄ラット腹腔内へ FIC4, 5 または 6 を毎日 1 回、1 mg/kg 体重で 7 日間投与した。最終投与 24 時間後に脳を採取し、海馬、線条体、大脳皮質を分取した。BDNF 含量は酵素免疫測定法にて測定した。P<0.05

イ) 複素環化合物

分担研究者広田によって化学合成された 31 種類の複素環化合物について前項と同様に培養海馬神経細胞の NGF、BDNF、NT-3、GDNF 産生促進に及ぼす効果を調べ、いくつかの活性物質を見いだした。今後、動物実験で脳への作用を確認する予定である。

2) 免疫抑制剤、新規イムノフィリンリガンドの開発とその作用の解析

ア) シクロスポリン A (CsA) (分担: 古川昭栄)

a) 培養海馬神経細胞に対する生存維持作用

培養海馬神経細胞を $8 \times 10^4 cells/cm^2$ で培養開始すると 7-9 日目には、はじめの 25.2% まで細胞数が減少した。しかし培養液に CsA を添加すると細胞数の減少は 49.3% にまで抑制された。しかし、細胞体の大きさや神経突起の長さには差が認められなかった。この結果は培養下で経日的に起こる細胞死に対して CsA が生存維持効果を持つことを示している。

b) BDNF、GDNF の産生増強作用

BDNF および GDNF の細胞内含量を調べたところ、1nM から 1pM の CsA の添加により有意に増加し、 $0.42 \mu M$ で最も強い作用が観察された（図 3）。海馬神経細胞はこれら因子の受容体を発現しており、オートクラインまたは局所パラクライン的に BDNF、GDNF に応答すると考えられる。よって CsA の生存維持効果には BDNF および GDNF の産生量の増加が少なくとも部分的に寄与していると考えられる。

c) ラット脳の BDNF 発現に及ぼす CsA の影響

ラットに CsA ($1.2 \mu moles/kg$) を 10 日間腹腔内投与すると、海馬、線条体、黒質での BDNF の免疫染色性が増強した。特に海馬錐体細胞層の CA2 から 3 領域で染色性が増強された。線条体、黒質でも陽性細胞数の増加と染色強度の増強が認められた。チロシン水酸化酵素 (TH) でドパミン神経細胞を免疫染色すると大脳皮質と黒質の TH 陽性繊維が長くなり、黒質の陽性細胞が増加し、染色強度も強くなった。この結果は、CsA が誘導した BDNF によってドパミン神経機能が高まるためと考えられた。

ア) Leu-Ile ジペプチドの作用

(分担: 古川昭栄、大井長和)

神経保護を目的とする場合、免疫抑制作用は不利益となる。そこで免疫抑制作用をもたない神経保護物質を探索する必要がある。FK506 が結合タンパク質 (FKBP12) に結合する構造と類似す

る疎水性ジペプチドについて検討したところ Leu-Ile に最も強い作用が見いだされた。

a) 生存維持効果

培養海馬神経細胞は培養 5 日目にははじめの 50.8% に生存細胞数が減少したが、培養開始 1 日後に Leu-Ile (0.4 μ M) を添加した場合は 70.2% の細胞が生存した。

b) 培養神経細胞の BDNF および GDNF の産生促進作用

培養神経細胞の培養液に Leu-Ile (0.4 μ M) を添加すると培養液の BDNF および GDNF 濃度が無添加の 2.2 倍、2.1 倍に増加した。

c) 培養シュワン細胞に対する神経栄養因子の産生促進作用

Leu-Ile は培養神経細胞の BDNF と GDNF 産生を促進することが明らかになっている。そこで分担研究者大井長和は最終年度のみ本研究に参加し、Leu-Ile が培養シュワン細胞の神経栄養因子産生に及ぼす効果を検討した。この研究は、Leu-Ile の作用が中枢神経細胞に限定されるのか、末梢神経組織にも及ぶのかを明らかにすることを目的としている。その結果、NGF、BDNF 産生は 10 μ g/ml の Leu-Ile 濃度で約 2 倍の、GDNF 産生は 1 μ g/ml の Leu-Ile 濃度で約 5 倍の増強効果が観察された。シュワン細胞は種々の神経栄養因子を産生し、末梢神経の再生、修復過程を推し進める上で重要な役割をもつと考えられており、Leu-Ile が末梢神経障害にも有効であることが示唆された。

d) BDNF および GDNF の脳含量に及ぼす影響

PBS に溶解した Leu-Ile をマウス脳室内または腹腔内に 1 日 1 回、10 日間投与し、最終投与から 24 時間後に線条体し BDNF および GDNF 含量を測定した。その結果、Leu-Ile の脳室内投与、腹腔内投与いずれの場合も明瞭な BDNF 量の増加が認められた (図 5)。同様に GDNF 含量も有意な増加を認めた (図 6)。

BDNF の発現には核内転写因子 CREB のリン酸化が関与している。BDNF 遺伝子は機能的な CRE 配列をもっており、リン酸化 CREB の結合を介して発現が促進されると考えられる。腹腔または脳室内に投与した Leu-Ile はいずれも線条体の BDNF および GDNF の含量を増加させた。腹腔内投与の場合、Leu-Ile は不安定であり、脳・血液関門通過性も問題があると推定されたが、脳室内投与に遜色のない効果を引き出した。これをリード物質にして強力な誘導体の創製が期待される。

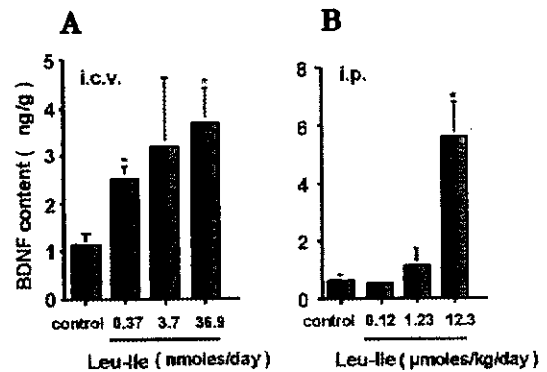


図 5 Leu-Ile の脳室内投与 (A)、腹腔内投与 (B) による線条体内 BDNF 含量の変化 *P<0.05

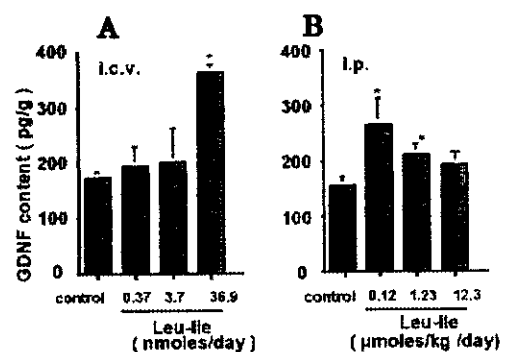


図 6 Leu-Ile の脳室内投与 (A)、腹腔内投与 (B) による線条体内 GDNF 含量の変化 *P<0.05

ウ) 新しいイムノフィリンリガンドの創製とその作用の解析 (分担: 古川昭栄)

免疫抑制剤 FK506 の活性部位の構造をもとにデザインし、新規化合物 acetyl picpecolic acid ([A]物質) を化学合成した。培養海馬神経細胞を用いた *in vitro* アッセイでは、[A]物質は BDNF、GDNF ではなく NT-3 の産生を促進した。CaA や FK506 にも NT-3 の産生促進活性があり、[A]物質はこれらの活性を部分的にもち特定のイムノフィリン分子だけに結合する可能性もある。

a) ドパミン神経障害に対する効果

マウスの右側線条体に 6-OHDA を注入直後より、[A]物質を腹腔内に 1 日 1 回、10 日間投与した。メタアンフェタミンで惹起される片側回転運動数は [A]物質の投与でほぼ半減し [A]物質によってドパミン神経細胞の障害が軽減されたと考えられた。

b) 脊髄損傷修復に及ぼす効果

脊髄損傷直後には歩行評価スコアは 0 まで低下した。2 日目までは [A]物質の効果は観察されなかったが、3 日目以降は歩行能力の回復に効果を示した。[A]物質投与群は 23 日目に損傷前のレベ

ルに回復した。無投与群のラットは 16 日目にはスコア 15 まで上昇したが以後もそれ以上の回復はなかった (図 7)。海馬、小脳、脊髄の切断部位では NT-3 含量の増加傾向が観察されたがそれ以外の神経栄養因子の産生誘導は観察されなかった。

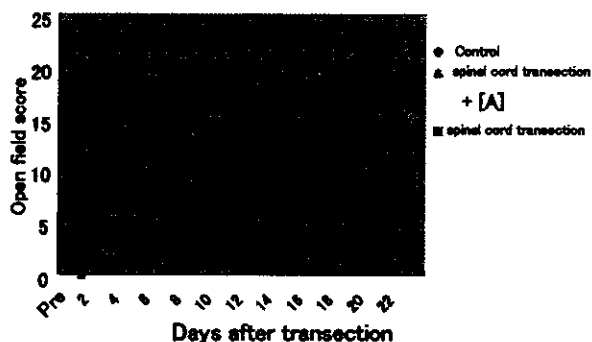


図 7 脊髄損傷に伴う運動機能障害に及ぼす[A]物質の効果

エ) 新しいイムノフィリンリガンドの免疫抑制作用の評価 (分担: 古川昭栄)

a) IL-2 の定量

ConA 刺激マウス脾臓 T 細胞による IL-2 産生は、免疫抑制剤の CsA や FK506 により濃度依存的に抑制されたが、Leu-Ile または [A] 物質には全く影響がみられなかった (図 8)。Leu-Ile および [A] 物質の免疫抑制作用はあっても非常に微弱と考えられた。

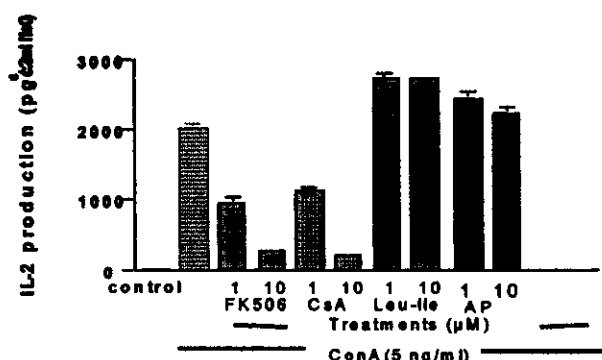


図 8 各種イムノフィリンリガンドの免疫抑制活性

3) 4-メチルカテコール (4MC) に関する研究

すでに 4-メチルカテコール (4MC) には強い神経保護作用が見いだされており、きわめて有望な物質である。そこで、ア) 新しい作用機構の検討、イ) 除法化と薬効強化をめざした物理化学的修飾、ウ) 脳内移行性の付与を目的とした有機化

学的修飾など、多方面から検討した。

ア) 4MC の新しい作用 (分担: 古川昭栄)

a) 細胞内タンパク質のリン酸化作用

4MC は培養大脳皮質神経細胞に直接作用していくつかのタンパク質のリン酸化を引き起こすことが判明した。そのうち分子量 140kDa のタンパク質はニューロトロフィン受容体である Trk ファミリーのチロシンリン酸化であった。主にリン酸化されるのは BDNF 受容体の TrkB と考えられた。

一方、MAP キナーゼのセリン 133 のリン酸化は 4MC 処理 1 時間後も増強が続いた。このリン酸化は PD98059 により阻害されることから MEK 依存性のリン酸化であった。MAP キナーゼのリン酸化が TrkB のリン酸化の下流にくるのか、独立した別の経路によるのかは不明である。4MC は MAP キナーゼを活性化しその下流の多彩な細胞応答を刺激すると考えられた。

b) 神経細胞の生存維持作用

MAP キナーゼの活性化は神経細胞の生存維持、神経突起形成を促すと考えられる。そこで培養大脳皮質神経細胞の生存に及ぼす影響を調べた結果、10、100 nM の 4MC 存在下で、有意な生存細胞数の増加が認められた。すなわち、4MC は神経栄養因子の産生を亢進するだけでなく、それ自身が神経栄養効果を持つと考えられた。4MC の示す、BDNF 産生促進活性、生存維持活性の作用機構を図 9 に模式的に示す。

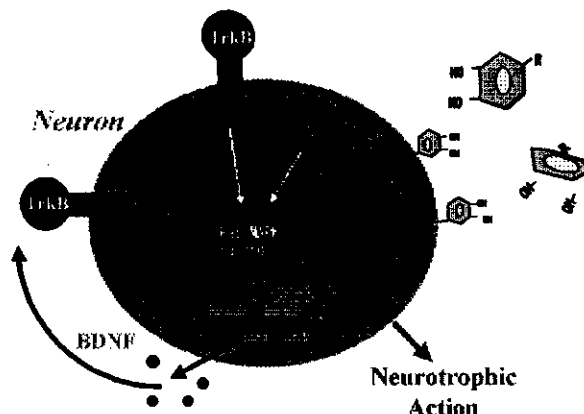


図 9 4MC の作用機構スキーム

4MC は細胞内へ受動的に取り込まれたのちなんらかの細胞内成分と相互作用し、その結果、TrkB、MAP キナーゼのリン酸化を起こす。その下流のカスケードには転写因子の一つである cAMP 応答配列結合タンパク質 (CREB) のリン酸化、活性化が含まれる。活性化された CREB は BDNF 遺伝子の 5' 上流の CRE に結合しその発現を増強する。さらに活性化された CREB は他の遺伝子発現を変化させ、生存維持効果さらには分化作用を示すと推定される。

イ) 4MC の徐放性高分子プロドラッグの構築とその特性解析 (分担: 葛谷昌之)

a) 4MC の高分子量プロドラッグの構築とその特性の検討

4MC の物理化学的修飾と、その持続的な活性賦与を目的としたメカノケミカル固相重合による高分子プロドラッグ化を行った。4MC のベンゾイル誘導体を合成しこれを高分子側鎖に有する水溶性高分子プロドラッグを完全乾式法であるメカノケミカル固相重合法により構築した。

本高分子プロドラッグは単分散性分子量分布を有しており、生体内挙動の厳密な制御が可能と考えられる。in vitro の検討により徐放性でかつ定量的に薬物が放出されることを確認した。さらに本高分子プロドラッグの in vivo における NGF 産生促進効果について評価し、結合様式およびスパーサー構造による薬物放出制御についても検討した。

さらに、本高分子プロドラッグに能動的ターゲット能を賦与する目的でグルコースのメタクリロイル誘導体の合成を行った。

b) 大量生産の予備試験

また、大量生産のための予備的実験として中型粉砕機を用いる方法について検討し反応には長時間を要するものの単分散性に近い分子量分布をもつ高分子プロドラッグを得た。

ウ) 4MC の脳移行性誘導体の合成と解析

(分担: 広田耕作)

a) 4MC へのジヒドロピリジン基の導入

4MC へのジヒドロピリジン構造導入による、脳移行性の向上を目的としたプロドラッグの合成を検討した。まず、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、リンカー (n=3 または 5) を介してジヒドロピリジンを 2 個導入した化合物と、1 個だけ導入した化合物を合成した。これらの誘導体は基本的に末端に臭素をもつメチレン鎖をエステル結合を介して 4MC に導入した後、ニコチン酸のナトリウム塩と縮合し、ピリジン環窒素のメチル化、還元を行ってジヒドロピリジン誘導体に変換した。in vivo での評価はまだ実施していない。

4) レトロウイルスベクターによる遺伝子の脳への導入・発現 (分担: 渡辺里仁)

神経栄養因子の遺伝子を脳で選択的に発現させることは将来の遺伝子治療につながる重要な技術である。そこで分担研究者渡辺里仁は、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、遺伝子を安定に発現する条件を検討した。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が、EGFP の発現は減弱しかつ不安定であった。内部プロモーターとして CMV のプロモーターを使用した場合には蛋白の発現量は良好であったがウイルス感染した細胞での蛋白発現はまだ検討中である。

一方、感染力価が低い原因の一部が、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。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。

E. 結論

免疫抑制作用をもたず、神経保護作用を示す新規イムノフィリンリガンドとして、Leu-Ile ジペプチドと [A] 物質を開発した。Leu-Ile には BDNF と GDNF の、[A] 物質には NT-3 の産生促進作用が見出された。一方、NGF と BDNF の産生促進活性をもつことが判明している 4-メチルカテコールに、新たに MAP キナーゼ活性化作用を見出した。すなわち、4-メチルカテコールは、神経細胞に直接作用する活性と、神経栄養因子の産生を介して間接的に作用する二つの面をもつことを明らかにした。これらの活性物質は将来の神経疾患治療薬としての応用が期待される。

脳神経変性疾患治療をめざす本研究のストラテジーの妥当性と、候補物質の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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Lee E. W., Shizuki K., Hosokawa S., Suzuki M., Suganuma H., Inakuma T., Li J., Ohnishi-Kameyama M., Nagata T., Furukawa S.,

- Kawagishi H.: Two novel diterpenoids, Erinacines H and I from Mycelia of *Hericium erinaceum*. Biosci. Biotechnol. Biochem., 64, 2402-2405, 2000
- 2) Kawakami H., Nitta A., Matsuyama Y., Kamiya M., Satake K., Sato K., Kondou K., Iwata H., Furukawa S.: An increase of neurotrophin-3 expression followed by Purkinje cell degeneration in the adult rat cerebellum after spinal cord transection. J. Neurosci. Res. 62, 668-674, 2000
 - 3) Fukumitsu, H., Ohmiya, M., Nitta, A., Furukawa, S., Mima, T., Mori, K.: Aberrant expression of neurotrophic factors in the ventricular progenitor cells of infant hydrocephalic HTX rats. Child's Nerv. Syst., 16, 516-521, 2000
 - 4) Nomoto, H., Tomotoshi, K., Ito, H., Furukawa, S.: Balance of two secretion pathways of nerve growth factor in PC12 cells changes during the progression of their differentiation, with a decrease in constitutive secretion in more differentiated cells. J. Neurosci. Res. 59, 632-642, 2000
 - 5) Ohmiya M., Fukumitsu H., Nitta A., Nomoto H., Furukawa Y., Furukawa S.: Administration of FGF-2 to embryonic mouse brain induces hydrocephalic brain morphology and aberrant differentiation of neurons in the postnatal cerebral cortex. J. Neurosci. Res., 2001, in press
 - 6) Furukawa S., Nitta A., Furukawa Y.: Stimulation of neurotrophin synthesis by 4-methylcatechol: a promising approach for neuroprotection. Biomed. Rev. 10, 45-54, 1999
 - 7) Takase-Yoden, S. and Watanabe, R. Contribution of virus-receptor interaction to distinct viral proliferation of neuropathogenic and nonneuropathogenic murine leukemia virus in rat glial cells. J. Virol. 73, 4461-4464, 1999
 - 8) Takase-Yoden, S. and Watanabe, R. High incidence of meningeal infiltration by leukemic cells after infection of chimeric virus between neuropathogenic and non-neuropathogenic retroviruses. J. NeuroVirol. 5, 414-420, 1999
 - 9) H. Ikeda, K. Kato, T. Suzuki, H. Kitani, Y. Matsubara, S. Takase-Yoden, R. Watanabe, M. Kitagawa, S. Aizawa Properties of the naturally occurring soluble surface glycoprotein of ecotropic murine leukemia virus: Binding specificity and possible conformational change after binding to receptor. J. Virol. 74, 1815-1826, 2000
 - 10) K. Arima, A. Kowalska, M. Hasegawa, M. Mukoyama, R. Watanabe, M. Kawai, K. Takahashi, T. Iwatsubo, T. Tabira, N. Sunohara Two brothers of frontotemporal dementia and parkinsonism with an N279K mutation of the tau gene. Neurology, 54, 1787-1795, 2000
 - 11) 新田淳美、古川美子、古川昭栄: 神経栄養因子、ファルマメディカ、18, 87-93, 2000
 - 12) 古川昭栄、古川美子: 神経栄養因子研究の最近の進歩、神経研究進歩、44, 339-349, 2000
- ## 2. 学会発表
- 1) 新田淳美, 堀琢也, 古川美子, 古川昭栄
グリア細胞株由来神経栄養因子 (GDNF) の酵素免疫測定法 (EIA) の確立とラット脳発達過程における発現変化 第43回日本神経化学会コロキウム, 2000年10月18-20日 (金沢)
 - 2) 西岡博史, 新田淳美, 古川昭栄
イムノフィリンリガンドによるBDNF産生誘導作用と神経保護効果 第43回日本神経化学会, 2000年10月18-20日 (金沢)
 - 3) 西岡博史, 新田淳美, 古川昭栄
イムノフィリンリガンドおよびその関連ペプチドによる神経栄養因子誘導作用と神経保護効果 日本薬学会第121年会, 2001年3月28-30日 (札幌)
 - 4) 新田淳美, 西岡博史, 古川昭栄
イムノフィリンリガンドおよび関連化合物による神経栄養因子誘導を介した神経機能修復 日本薬学会第121年会ワークショップ, 2001年3月28-30日 (札幌)
 - 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日-4日 (東京)
 - 6) 福光秀文, 高瀬 (余田) 明, 渡辺里仁 レトロウイルス感染によるEAEの修飾 第41回日本神経病理学会総会学術研究会 2000年6月1日-3日 (米子)
 - 7) 高瀬 明, 後藤かつ美, 渡辺里仁 ラットの脳におけるエクトロピックマウスレトロウイルスレセプターの分布 第5回日本神経感染症研究会・第4回日本神経ウイルス研究会合同学術集会 2000年7月14-15日 (名古屋)
 - 8) 山川 圭, 池田富夫, 高瀬 (余田) 明, 渡辺里仁

A8 ウィルス env - RNA の不思議なスプライシング 第5回日本神経感染症研究会・第4回日本神経ウイルス研究会合同学術集会 2000年7月14-15日(名古屋)

- 9) 高瀬 明、渡辺里仁 マウス白血病ウイルスの中脳神経病原性および腫瘍原性を制御するウイルス遺伝子領域 第48回日本ウイルス学会総会 2000年10月12日-14日(三重県津市)

G. 知的所有権の取得状況

なし

神経保護作用をもつ新規イムノフィリンリガンドの開発と 4-メチルカテコールの新しい神経栄養活性

古川昭栄（岐阜薬科大学・薬学部・教授）

研究要旨 免疫抑制作用をもたず、神経保護作用を示す新規イムノフィリンリガンドとして、Leu-Ile ジペプチドと acetyl pipecolic acid ([A]物質)を開発した。Leu-Ile には BDNF と GDNF の、[A]物質には NT-3 の産生促進作用が見出された。一方、NGF と BDNF の産生促進活性をもつ 4-メチルカテコール (4MC) に、新たに MAP キナーゼの活性化作用を見出した。すなわち、4MC は神経細胞への直接作用と神経栄養因子の産生を介して神経細胞に間接的に作用する 2種類の活性をもつことを明らかにした。これらの活性物質は将来の神経疾患治療薬への応用が期待される。

A. 研究目的

パーキンソン病、ハンチントン舞蹈病、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らか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だされた。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が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、脳での効果が期待できないなど、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。

我々はすでに代表的な神経栄養因子である神経成長因子(nerve growth factor:NGF)の合成・分泌を誘導する化合物に、末梢神経障害を改善する作用や坐骨神経再生を著明に促進す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疾患モデルでの効果は報告されていない。その理由として中枢神経系では NGF 受容体の分布領域が狭く、仮に脳内 NGF の産生誘導を起こしても作用が及ばない可能性がある。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(brain-derived neurotrophic factor: BDNF)および作用濃度が低いグリア細胞由来神経栄養因子 (glial cell line-derived neurotrophic factor: GDNF) に重点をおき、末梢投与後に脳に移行して、脳でこれら神経栄養因子の合成を促進する低分子化合物の開発とその薬効評価および作用機構の解析を行ってきた。以下に、これまで（平成 10、11 年度）に得られた結果を要約する。

ア) 培養神経細胞と培養アストロサイトを使った *in vitro* スクリーニングにより約 200 種類の候補化合物を評価し、そのうち 12 種類の低分子活性物質を新しく同定した。すなわち、1) 免疫抑制剤であるシクロスポリン A、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) に BDNF の産生促進活性を、3) NO 合成酵素阻害物である L-NG-nitroarginine methyl ester (L-NAME)、フォスホリパーゼ C、A2 阻害物阻害物質である U-73122、ビタミン K₃ に GDNF 産生促進活性を見いだした。これらの活性物質のうち、FK506、シクロスポリン A、4MC について詳細に検討した。

イ) FK506 は培養海馬神経細胞の BDNF や GDNF 産生を促進し、培養中脳神経細胞のチロ

シン水酸化酵素 (tyrosine hydroxylase: TH) 陽性細胞を増加させた。パーキンソン病モデル動物に投与すると線条体での BDNF や GDNF 含量が増加しドパミン神経細胞の変性が抑制された。

ウ) シクロスポリン A は正常ラット脳の線条体、梨状葉皮質の NGF, NT-3, BDNF, GDNF の有意な増加を引き起こした。この条件で脳のホメオスタシスに与える影響を調べるため、種々の脳内薬物代謝酵素、アルカリフォスファターゼ、スーパーオキシドジスムターゼ活性を調べたところほとんど有意な変化を認めなかった。

エ) スオレプトゾトシン (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ニューロトロフィン産生が低下し、大皮質錐体細胞の形態変化、神経特異的タンパク質発現の低下が起こることを見出している。STZ 投与前後に 4-メチルカテコールをラット腹腔内に投与するとこれらの変化や低下が抑制され、空間認知能力の低下も抑制された。このように、神経栄養因子産生を高めると脳機能の低下が抑制されることを複数のモデルで明らかにした。

以上の成果を受け、最終年度である本年度は、1) 新しいイムノフィリンリガンドの創製とその薬効評価、2) 4-メチルカテコールの神経栄養作用、3) 新しい活性物質の探索、を行った。

脳神経変性疾患治療をめざす本研究のストラテジーの妥当性と、候補物質の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、血清を含む培養液で 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 (4MC, 免疫抑制剤など) を、正常または病態モデル動物の腹腔内へ投与し、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

麻酔下で 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-ヒドロキシドパミン (6-OHDA: 12.5 μ g/ μ l) をマイクロシリンジで注入した。このモデル動物は片側のドパミン神経細胞が障害されるため、ド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と著しい片側回転運動を起こす。回転数からド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) 脊髄損傷モデル

ペントバルビタールナトリウム (35mg/kg) 麻酔下で 7 週齢の Wistar 系雄ラットの脊部に正中切開を加え、傍脊柱筋を鈍的に剥離した。第 12 胸椎の椎弓を切除後、同部位において鋭利な刃物で左脊髄を切断した。切断 5 時間後、左後足麻痺の障害が確認できるものについて以下の実験を行った。脊髄損傷動物の歩行能力の評価は以下のように行った。

灰色に塗装した箱 (縦 1m \times 横 1m \times 高さ 30cm) にラットを入れ、自由に探索させ、The 21-Point Basso, Bestie, Bresnahan Locomotor Rating Scale (BBB Scale) に従って 21 段階で評価した。

4) 培養マウス脾臓細胞による IL-2 産生を指標とする免疫抑制作用の検討

T 細胞は活性化されるとインターロイキン (IL) -2 を遊離する。コンカナバリン A (ConA) でマウス脾臓由来 T 細胞を刺激し培養上清中の IL-2 濃度を測定した。脾臓細胞に ConA と同時に、Leu-Ile、[A] 物質または免疫抑制剤 (CsA, FK506) を加えて、48 時間培養し培養液をサン

ルとした。IL-2の定量はEndogen社のELISA kitのプロトコールに従い、反応終了後、マイクロプレートリーダーにて460 nmにおける吸光度を測定した。

C. 研究結果およびD. 考察

1) in vitro での神経栄養因子産生促進物質

a) 植物成分：分担研究者飯沼によってフタバガキ科生薬成分から単離された23種類 (FIC1-FIC23) のスチルベノイド化合物について培養海馬神経細胞のNGF、BDNF、NT-3、GDNF産生に及ぼす効果を調べた。その結果、NGF (FIC3, 4, 5, 9, 13, 14)、BDNF (FIC1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 20, 22)、NT-3 (FIC5, 9, 10, 11, 12, 20, 21, 22)、GDNF (FIC1, 2, 4, 5, 7, 10, 14, 17, 18, 20, 21) など、かなりの高率で活性を認めた。特にFIC4, 5, 6はBDNF、GDNF産生を低濃度で促進し、FIC7はGDNF産生を低濃度で強く刺激した。これらの中からFIC4, 5 (図1) を選び、飯沼によって多量に化学合成されたものをラットに投与してin vivoでの産生促進効果を評価した(飯沼分担研究報告書参照)。

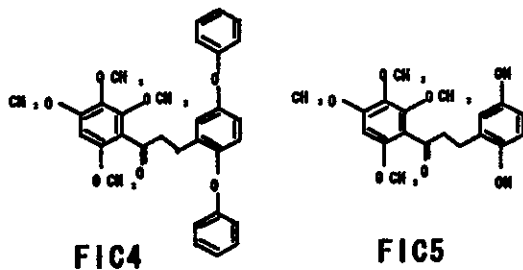


図1 神経栄養因子産生を促進する植物成分

b) 複素環化合物：分担研究者広田によって化学合成された31種類の複素環化合物について前項と同様に培養海馬神経細胞のNGF、BDNF、NT-3、GDNF産生促進に及ぼす効果を調べた。その結果、NGF (化合物番号No.7, 10, 12, 14, 16)、BDNF (No.7, 12, 28, 29)、NT-3 (No.3, 4, 11, 16, 23, 25)、GDNF (No.18) などに明らかな活性を認めた。特に興味深い化合物として、No.7, 12はNGF、BDNFの両方の産生を、No.18はGDNF産生を促進した。今後、動物実験でこの効果を確認する予定である。

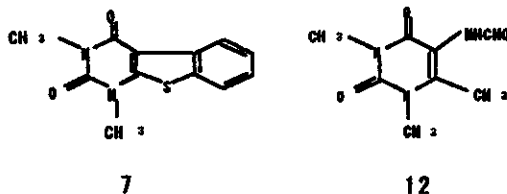


図2 神経栄養因子産生を促進する化合物

C) その他の検索化合物：いくつかのタイプの抗生物質(ニューキノロン系)について検索したが活性を認めなかった。

2) シクロスポリン A (CsA) による神経栄養因子産生と神経保護作用

a) CsAによる生存維持作用

分化した神経細胞は増殖能を失っており、死滅しても増殖によって補充されることはない。また、低密度で培養した神経細胞ほど神経栄養因子による作用を受けにくくなるため、死滅しやすくなる。本研究においても培養海馬神経細胞は、培養開始直後は 8×10^4 cells/cm²であったものが、経日的な細胞数の減少が観察され、培養開始後7-9日目には、培養開始時の25.2%まで生存細胞数が減少した。一方、培養液にCsAを添加した場合は、生存細胞数の減少は49.3%と有意に抑制されていた(図3)。しかし、細胞体の大きさや神経突起の長さには差が認められなかった。

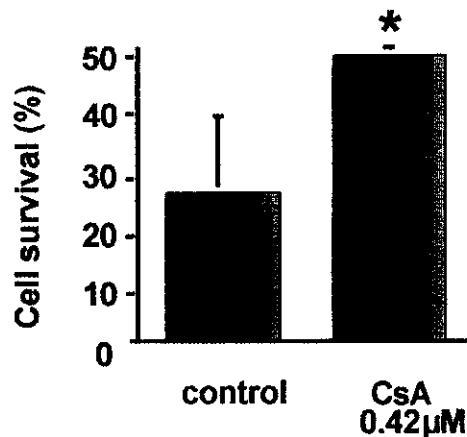


図3 培養海馬神経細胞の生存に及ぼすCsAの効果

海馬神経細胞を 7.8×10^4 cell/cm²の密度で3.5cmシャーレに培養した(37°C、5% CO₂)。培養開始1日後、培地にCsAを0.42 μMで添加し、9日間培養した後、シャーレ上の任意に選んだ9ヶ所(各0.39mm²)について生存細胞数を顕微鏡下で計測した。P<0.05

b) CsAによるBDNF、GDNFの産生増強

本研究で用いたEIA測定システムは、BDNFが0.1-10ng/mL、GDNFが1pg-3.3ng/mLの範囲で測定可能であり十分な測定感度を有していた。培養液に0.4 μMのCsAを添加すると培養液中のBDNFおよびGDNF濃度がそれぞれ23.3倍および3.4倍にそれぞれ増加した(図4)。

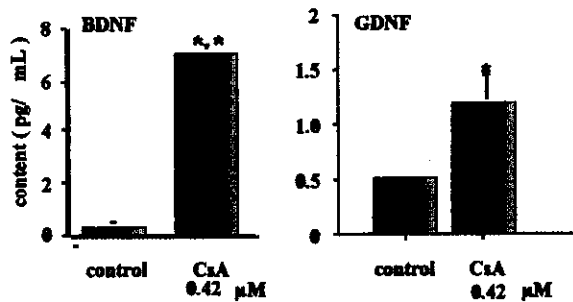


図4 培養海馬神経細胞のBDNF、GDNF産生に及ぼすCsAの作用

海馬神経細胞を 5.5×10^5 cell/cm²の密度で3.5cmシャーレに培養した(37°C、5% CO₂)。培養開始1日後、培地にCsAを0.42μMで添加し、5-7日間培養した後、細胞と培養液を集めた。*P<0.05, **P<0.01

この結果は培養下で経日的に起こる細胞死に対してCsAが生存維持効果を持つことを示したものである。BDNFおよびGDNFの細胞内含量を調べたところ、1nMから1pMのCsAの添加により有意に増加し、0.42μMで最も強い作用が観察された(図4)。本研究ではmRNAレベルについては検討していないが、他の実験結果を考え合わせるとこの結果は産生の促進によると判断された。海馬神経細胞はこれら因子の受容体を発現しており、オートクラインまたは局所パラクライン的にBDNF、GDNFに応答すると考えられる。

以上の結果より、CsAの生存維持効果にはBDNFおよびGDNFの産生量の増加が少なくとも部分的に寄与していると考えられた。

c) ラット脳のBDNF発現に及ぼすCsAの影響

ラットにCsA (1.2 μmoles/kg) を10日間腹腔内投与した。海馬、線条体、黒質におけるBDNFの免疫組織染色を行ったところいずれの脳部位でもCsA投与群でBDNFの染色性の増強が観察された。いずれも主に細胞体が染色され以前の報告と一致していた。海馬錐体細胞層に強いBDNF染色が観察されたが、CsAの投与によって特にCA2から3の領域の錐体細胞で染色性が増強された。コントロール群、CsA投与群いずれもグリア細胞には染色は確認できなかった。線条体、黒質でも陽性細胞数の増加および染色強度の増強が認められた。またTHの免疫組織染色によりドパミン神経細胞の分布を調べたところ、大脳皮質、黒質ともにTH陽性繊維の長さの増大が、黒質では陽性細胞数の増加、染色強度の増強が観察された。この結果は、CsAによって誘導されたBDNFがドパミン神経機能を亢進する可能性が示唆し、さらにCsAによって誘導されたBDNFがTHの

合成を亢進する可能性が考えられた。

3) 新しいイムノフィリンリガンド、Leu-Ileジペプチドによる神経保護効果

以上の結果より免疫抑制剤がパーキンソン病等の治療薬や予防薬として利用できる可能性が示唆された。しかし神経保護を目的とする際には免疫抑制作用は不利益になると考えられる。FK506はCsA同様に臨床でよく用いられる免疫抑制剤の一つである。CsAとFK506の免疫抑制作用機構には類似性があること、昨年度の本研究によりFK506にも神経保護効果を見いだしている。そこでFK506結合タンパク質FKBP12と相互作用するFK506の構造に着目しこれに類似するいくつかの疎水性ジペプチドについて神経保護効果を検討した。その結果以下に述べるようにLeu-Ileが最も強い作用を示した。

a) Leu-Ileの生存維持効果

培養下で海馬神経細胞は徐々に死滅し細胞数が減少する。培養直後は 8×10^4 cells/cm²の細胞が存在したが5日目には、その50.8%まで生存細胞数が減少した。一方、培養開始1日後にLeu-Ileを添加した場合は70.2%の細胞が生存した(図5)。しかし、Leu-Ileは生存細胞の細胞体の大きさや神経突起の長さには影響しなかった。

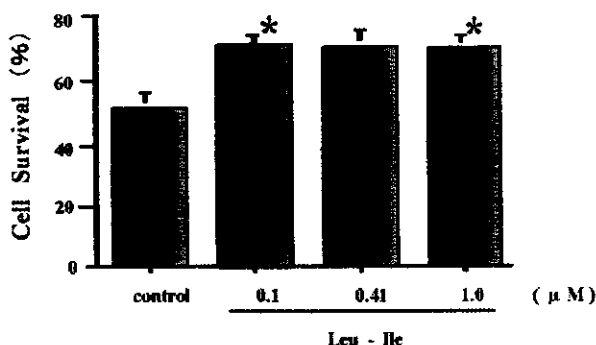


図5 培養海馬神経細胞の生存に及ぼすLeu-Ileジペプチドの効果

海馬神経細胞を 7.8×10^4 cell/cm²の密度で3.5cmシャーレに培養した(37°C、5% CO₂)。培養開始1日後、培地にLeu-Ileを添加した。1日培養した後、シャーレ上の任意に選んだ9ヶ所(各0.39mm²)について生存細胞数を顕微鏡下で計測した。P<0.05

b) BDNFおよびGDNFの産生に及ぼすLeu-Ileの効果

培養神経細胞の培養液にLeu-Ileを添加すると、無添加の場合に比べてBDNFおよびGDNF濃度がそれぞれ2.2倍、2.1倍に増加した(図6)。

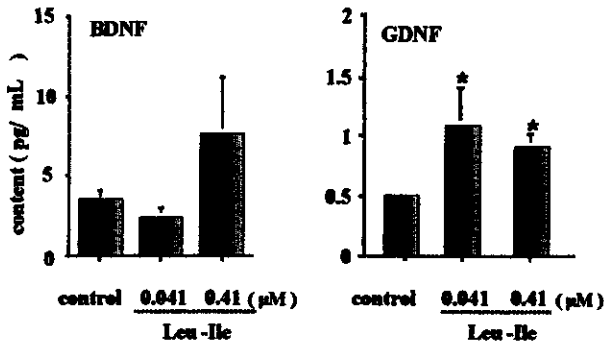


図6 BDNF および GDNF の産生に及ぼす Leu-Ile の効果

3.5cmシャーレに 5.5×10^5 cell/cm²の密度で培養した海馬神経細胞に培養開始1日後、Leu-Ile を添加して5-7日間培養した。細胞と培養液を集め、酵素免疫測定法でBDNF、GDNFを測定した。*P<0.05

c) マウス線条体の BDNF および GDNF 含量におよぼす Leu-Ile の影響

次に Leu-Ile を脳室内、腹腔内投与し、ラット脳の BDNF、GDNF 含量に及ぼす効果を調べた。

PBS に溶解した 0.4、4.0 および 37 μmoles の Leu-Ile をマウス脳室内に、PBS に溶解した 0.12、1.2 および 12 μmoles/kg の Leu-Ile をマウス腹腔内にそれぞれ1日1回、10日間投与し、最終投与から24時間後に断頭して線条体を摘出した。線条体の BDNF および GDNF 含量を EIA 法により測定した。コントロール動物には PBS のみを投与した。

①BDNF 含量の変化

Leu-Ile の脳室内投与量が 0.09、0.9 および 9 μmoles/day の時の BDNF 含量はそれぞれコントロール動物の 2.8、3.6、4.1 倍に増加した (図7 A)。腹腔内に 12.3 μmoles/kg/day の Leu-Ile を投与すると、コントロールに比べて、BDNF 含量は 8.7 倍に増加した (図7 B)。

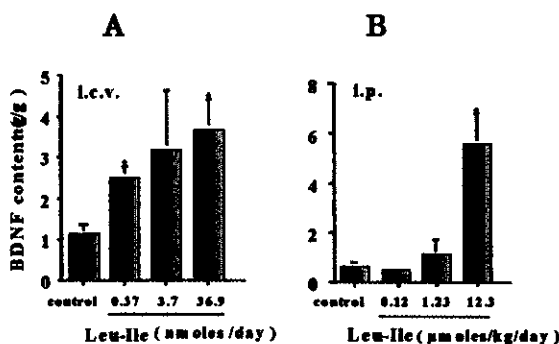


図7 Leu-Ile の脳室内投与 (A)、腹腔内投与 (B) による線条体内 BDNF 含量の変化 *P<0.05

②GDNF 含量の変化

脳室内に 9 μmoles/day の Leu-Ile を投与すると、コントロールに比べて GDNF 含量が 2.1 倍に増加した (図8 A)。腹腔内に 0.12、1.2 μmoles/kg/day の Leu-Ile を投与するとコントロールに比べて GDNF 含量はそれぞれ 1.7、1.3 倍に増加した (図8 B)。

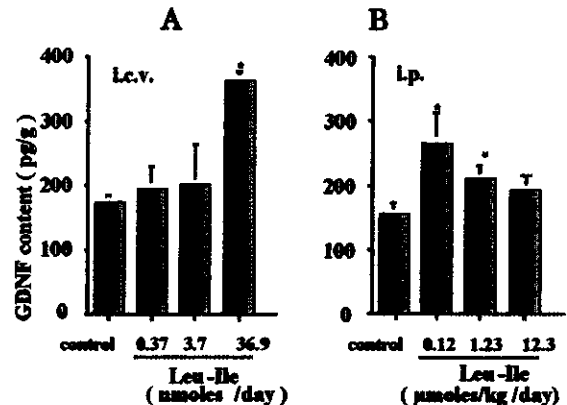


図8 Leu-Ile の脳室内投与 (A)、腹腔内投与 (B) による線条体内 GDNF 含量の変化 *P<0.05

BDNF の発現には核内転写因子 CREB のリン酸化が関与していることがわかっている。CREB はリン酸化されると、遺伝子の上流域に存在する CRE 配列に結合し、遺伝子の転写を促進する。BDNF 遺伝子も機能的な CRE 配列をもっており、リン酸化 CREB の結合を介して発現が促進されると考えられている。免疫ブロッティングの結果より、Leu-Ile は CREB のリン酸化を亢進することによって、BDNF の発現を高めると考えられる。また、CREB は BDNF 以外にもプロエンケファリンなどの遺伝子調節に関与している。従って、TH 遺伝子は誘導される BDNF や GDNF が間接的にドパミン神経細胞に作用する他に、Leu-Ile によってリン酸化された CREB によって直接遺伝子発現が増強される可能性がある。すなわち、ドパミン神経系を刺激する二つの異なるルートが存在することになり、その意味で Leu-Ile は強力なドパミン神経保護作用を発揮すると推定される。また、学習・記憶システムのモデルの一つである長期増強現象にも、CREB のリン酸化が必須であることが報告されており、Leu-Ile による CREB のリン酸化が複数の神経系の機能を亢進する可能性が示唆される。次に、ラットの腹腔内および脳室内へ Leu-Ile を投与したところ、いずれにおいても線条体の BDNF および GDNF の含量が増加した。腹腔内投与された Leu-Ile は、脳に移行し、作用したと考えられる。CsA や

FK506 と異なり、Leu-Ile は IL-2 の産生抑制効果がないので、免疫抑制作用を持たないイムノフィリンリガンドであることが示唆された。このようなイムノフィリンリガンドは、パーキンソン病などの中枢神経変性疾患の抜本的治療薬としての可能性を秘めており、今後の研究が期待される。

Leu-Ile は脳室内投与または腹腔内投与いずれの場合でも線条体で明瞭な BDNF、GDNF 含量の増加を引き起こした。腹腔内投与の場合、Leu-Ile は不安定であり、脳・血液関門通過性も問題があると推定されたが、脳室内投与に遜色のない効果を引き出した。今後これをリード物質としてより強力な誘導体の創製に希望を与える結果である。

4) 新しいイムノフィリンリガンド[A]物質の創製とその神経保護作用

免疫抑制剤 FK506 の活性部位の構造をもとに新たに新規化合物 acetyl picpecolic acid ([A]) を化学合成した。[A] は CsA や Leu-Ile とは異なり培養海馬神経細胞における BDNF、GDNF 産生の促進作用は示さないかわりに NT-3 の産生を促進した (結果は示さない)。CsA や FK506 は NT-3 の産生促進活性があり、化合物[A]はこの活性を部分的に発揮すると考えられる。細胞内で結合するイムノフィリン分子が異なっている可能性もある。そこでまずラットの線条体破壊モデルを使ってドパミン神経細胞に対する細胞保護効果を検討した。

a) 線条体破壊モデルに対する効果

5 週齢の ddy 系雄マウスの右側線条体に 6-OHDA (12.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) をマイクロシリンジで注入した。注入直後より、[A] を腹腔内に 1 日 1 回、10 日間投与した。ドパミンを遊離させるメタアンフェタミンアンを腹腔内投与し、観察される片側回転運動数を計測した。その結果、6-OHDA を投与したマウスは激しい回転運動を示したが、[A] を投与するとほぼ半数に減少した (図 9)。回転数を数えることによってドパミン神経細胞の障害の程度を推定できるので、[A] 物質によってドパミン神経細胞の障害が軽減されたと考えられた。

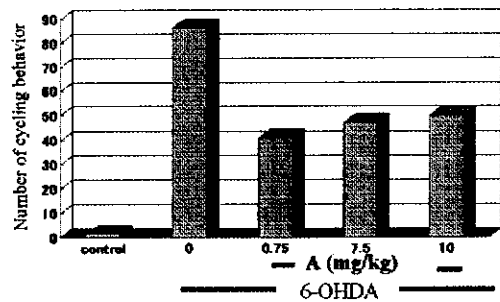


図 9 線条体破壊モデルにおけるメタアンフェタミン惹起性回転運動に及ぼす[A]の効果

b) 脊髄損傷修復に及ぼす効果

BBB Scale は、脊髄損傷直後には 0 まで低下した。2 日目までは[A]の投与の効果は観察されなかったが、3 日目からは歩行能力が回復した。[A]投与群では 23 日目にはほぼ損傷前のレベルにまで回復した。脊髄損傷群のラットも時間の経過に伴い緩やかに上昇し 16 日目にはスコア 15 まで上昇したが、その後、それ以上の回復はなかった (図 10)。

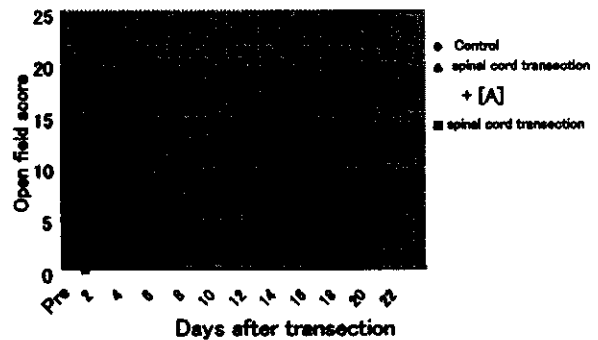


図 10 脊髄損傷に伴う運動機能障害に及ぼす[A]の効果

コントロール群、すなわち傍脊柱筋の剥離及び椎弓の切除では、BBB Scale は満点の 21 のままであり、これら偽手術は歩行には影響を及ぼさなかった。また[A]物質を投与したしないに関わらず、切断 3 日目から歩行障害の回復が観察された。[A]物質を脊髄切断モデルに投与することにより運動能の回復が促進され脊髄の機能の修復に[A]物質が効果的であることを示している。しかし、これらの動物における脳各部位及び脊髄での神経栄養因子含量を EIA 法で測定したところ海馬、小脳、脊髄の頭部側及び背部側のセグメントにおいて NT-3 含量の増加傾向が観察された以外は、[A]物質投与による各神経栄養因子の産生誘導は観察されなかった。その効果が神経栄養因子の産

生誘導作用を介しているかどうかは不明である。

5) 新しいイムノフィリンリガンド Leu-Ile と [A]の免疫抑制作用の評価

a) IL-2 の定量

マウス脾臓T細胞はConAの刺激によって活性化され、IL-2の産生が増加する。免疫抑制剤であるCsAやFK506を添加した細胞では、IL-2の産生が濃度依存的に抑制されたが、Leu-Ile、[A]を添加してもIL-2の産生誘導は抑制されなかった(図11)。この結果より、Leu-Ileおよび[A]物質の免疫抑制作用はあっても非常に微弱と考えられた。

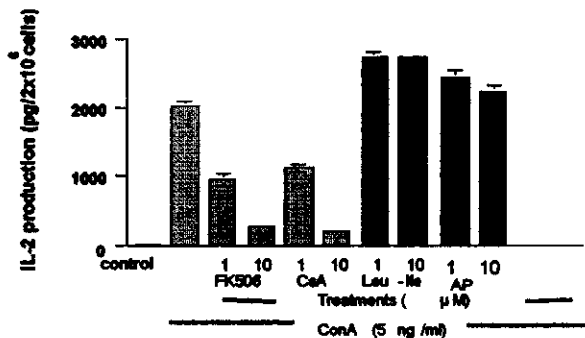


図11 各種イムノフィリンリガンドの免疫抑制活性

5) 4-メチルカテコールの神経栄養作用

これまでの研究から、4-メチルカテコール(4MC)には以下のような神経保護作用が見出されている。

4MCの in vivo 作用

- ・ 幼若ラット
末梢投与によりBDNF産生を促進
- ・ 成熟ラット
脳室内投与によりBDNF産生促進
- ・ STZ-惹起性糖尿病ラット
脳でのBDNF産生低下を抑制
脳特異的タンパク質発現の低下を抑制
記憶・学習能の低下を抑制
- ・ 6-OHDAによる線虫体破壊モデルラット
メタンフェタミン惹起性回転運動の抑制

強いニューロン保護作用 ニューロンに直接作用する？

図12 4MCの in vivo 生理作用

4MCの作用機構として、神経栄養因子の産生促進作用のほかに神経細胞になんらかの直接作用を持つのではないかと考え、細胞内タンパク質に対するチロシンリン酸化作用を検討した。

a) 4MCによる細胞内タンパク質のチロシンリン酸化

4MCの添加により大脳皮質神経細胞のいくつかのタンパク質が時間依存的にリン酸化された。そのうち分子量140kDaのタンパク質はニューロトロフィン受容体Trkファミリーの可能性が推定され、免疫沈降法で検討した(図13)。

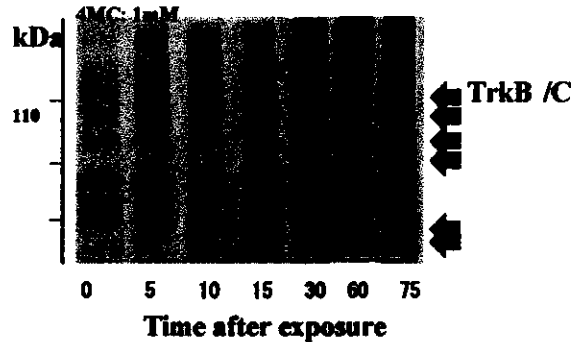


図13 4MCによる細胞内タンパク質のチロシンリン酸化

胎生18日齢ラットより大脳皮質を摘出し、[方法]の項で示したように細胞を分散し、血清を含む培養液中で1日培養した。その後、4MCを含む無血清培養液で適宜培養し、フォスファターゼ阻害物を含むlysis bufferにて細胞抽出液を作製した。ついで、SDSポリアクリルアミド電気泳動し、ゲル中のタンパク質をPVDF膜に転写した後、抗リン酸化チロシン抗体でイムノプロットした。

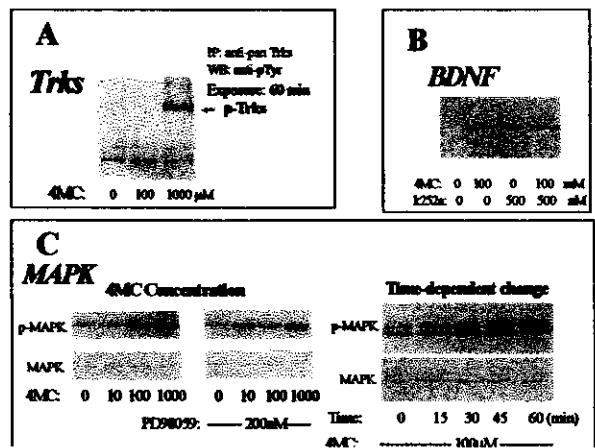


図14 4MCによるTrkファミリー及びMAPキナーゼのリン酸化

培養大脳皮質神経細胞を4MCで処理し、図13と同様の方法で細胞抽出液を作製した。これを(A)抗pan-Trk抗体と反応させた後proteinAカラムで沈降し、電気泳動した。PVDF膜に転写後、抗リン酸化チロシン抗体でイムノプロットした。(B)抗BDNF抗体による細胞抽出液のイムノプロット。(C)抗MAP抗体と抗リン酸化MAP抗体によるイムノプロット。

4MCで1時間処理するとTrkファミリーの著明なチロシンリン酸化が観察された。大脳皮質にはTrkAはほとんど存在せず、TrkCの存在量は

わずかであるため主にリン酸化されるのは豊富に存在する TrkB であると考えられた (図 14A)。

b) 4MC による MAP キナーゼのリン酸化

一方、MAP キナーゼは 4MC の用量依存的に強くリン酸化され、処理後 1 時間後も増強が続いた。MEK の選択的阻害剤である PD98059 の添加により阻害されることから、MEK 依存性のリン酸化であることがわかる (図 14C)。また、4MC の添加により BDNF の発現の増強は Trk ファミリーの選択的阻害剤である K252a では阻害されなかった (図 14B) ことより、TrkB のリン酸化は BDNF 産生増強と直接関連しないと推定された。また、MAP キナーゼのリン酸化が TrkB のリン酸化の下流にくるのか、独立した別の経路によるのか今のところはっきりしない。図 13、図 14 の結果より、4MC は MAP キナーゼを活性化しその下流の多彩な細胞応答を刺激する作用があると考えられた。

c) 4MC による神経細胞の生存維持

MAP キナーゼの活性化は神経細胞の生存維持、神経突起形成を促すと考えられる。そこで培養大脳皮質神経細胞に 4MC を添加し、生存に及ぼす影響を調べた (図 15)。

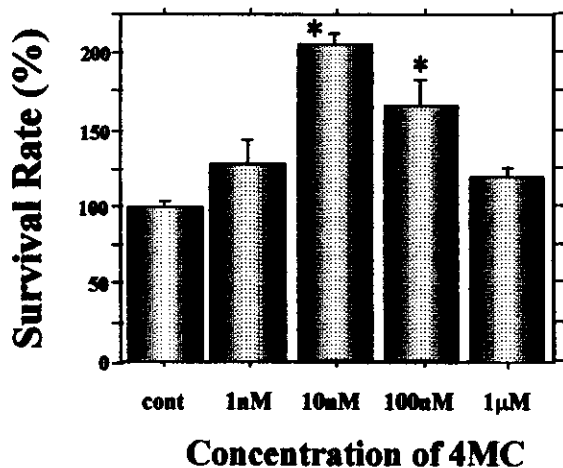


図 15 培養大脳皮質神経細胞の生存に及ぼす 4MC の効果

胎生 18 日ラット大脳皮質神経細胞を 8×10^4 cell/cm² の密度で 3.5cm シャーレに培養した (37°C, 5% CO₂)。1 日後、4MC を含む無血清培養液で 1 時間刺激し、その後 4MC を含まない無血清培養液に取り替え、さらに 1 日培養した。シャーレ上の任意に選んだ 9ヶ所 (各 0.39mm²) について生存細胞数を顕微鏡下で計測した。*P<0.05

その結果、10、100 nM の 4MC 存在下で、有意な生存細胞数の増加が認められた。すなわち、4MC は神経栄養因子の産生を亢進するだけでな

く、それ自身が神経栄養効果を持つと考えられた。4MC の示す、BDNF 産生促進活性、生存維持活性の作用機構を図 16 に模式的に示す。

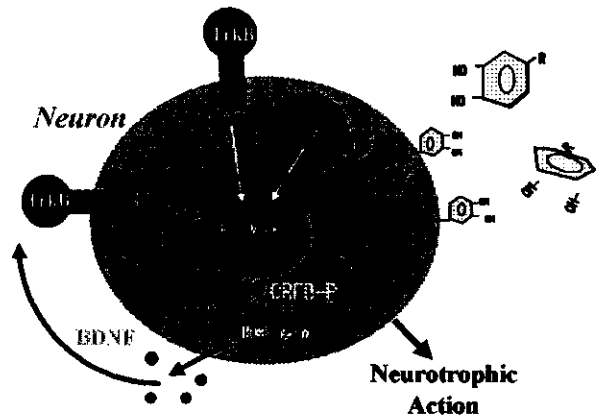


図 16 4MC の作用機構スキーム

4MC は細胞内へ受動的に取り込まれたのちなんらかの細胞内成分と相互作用し、その結果、TrkB、MAP キナーゼのリン酸化を起こす。その下流のカスケードには転写因子の一つである cAMP 応答配列結合タンパク質 (CREB) のリン酸化、活性化が含まれる。活性化された CREB は BDNF 遺伝子の上流の CRE に結合しその発現を増強する。さらに活性化された CREB は他の遺伝子発現を変化させ、生存維持効果さらには分化作用を示すと推定される。

E. 結論

免疫抑制作用をもたず、神経保護作用を示す新規イムノフィリンリガンドとして、Leu-Ile ジペプチドと [A] 物質を開発した。Leu-Ile には BDNF と GDNF の、[A] 物質には NT-3 の産生促進作用が見出された。一方、NGF と BDNF の産生促進活性をもつことが判明している 4-メチルカテコールに、新たに MAP キナーゼ活性化作用を見出した。すなわち、4-メチルカテコールは、神経細胞に直接作用する活性と、神経栄養因子の産生を介して間接的に作用する二つの面をもつことを明らかにした。これらの活性物質は将来の神経疾患治療薬としての応用が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Lee E. W., Shizuki K., Hosokawa S., Suzuki M., Suganuma H., Inakuma T., Li J., Ohnishi-Kameyama M., Nagata T., Furukawa S., Kawagishi H.: Two novel diterpenoids, Erinacines H and I from *Mycelia of Hericium erinaceum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64, 2402-2405, 2000

2) Kawakami H., Nitta A., Matsuyama Y., Kamiya M., Satake K., Sato K., Kondou K., Iwata H., Furukawa S.: An increase of neurotrophin-3 expression followed by

Purkinje cell degeneration in the adult rat cerebellum after spinal cord transection. J. Neurosci. Res. 62, 668-674, 2000

日本薬学会第121年会ワークショップ, 2001年
3月28-30日(札幌)

3) Fukumitsu, H., Ohmiya, M., Nitta, A., Furukawa, S., Mima, T., Mori, K.: Aberrant expression of neurotrophic factors in the ventricular progenitor cells of infant hydrocephalic HTX rats. Child's Nerv. Syst., 16, 516-521, 2000

G. 知的所有権の取得状況

なし

4) Nomoto, H., Tomotoshi, K., Ito, H., Furukawa, S.: Balance of two secretion pathways of nerve growth factor in PC12 cells changes during the progression of their differentiation, with a decrease in constitutive secretion in more differentiated cells. J. Neurosci. Res. 59, 632-642, 2000

5) Ohmiya M., Fukumitsu H., Nitta A., Nomoto H., Furukawa Y., Furukawa S.: Administration of FGF-2 to embryonic mouse brain induces hydrocephalic brain morphology and aberrant differentiation of neurons in the postnatal cerebral cortex. J. Neurosci. Res., 2001, in press

6) Furukawa S., Nitta A., Furukawa Y.: Stimulation of neurotrophin synthesis by 4-methylcatechol: a promising approach for neuroprotection. Biomed. Rev. 10, 45-54, 1999

7) 新田淳美、古川美子、古川昭栄: 神経栄養因子、ファルマメディカ、18, 87-93, 2000

8) 古川昭栄、古川美子: 神経栄養因子研究の最近の進歩、神経研究進歩、44, 339-349, 2000

2. 学会発表

1) 新田淳美, 堀琢也, 古川美子, 古川昭栄
グリア細胞株由来神経栄養因子 (GDNF) の酵素免疫測定法 (EIA) の確立とラット脳発達過程における発現変化 第43回日本神経化学会コロキウム, 2000年10月18-20日(金沢)

2) 西岡博史, 新田淳美, 古川昭栄
イムノフィリンリガンドによるBDNF産生誘導作用と神経保護効果 第43回日本神経化学会, 2000年10月18-20日(金沢)

3) 西岡博史, 新田淳美, 古川昭栄
イムノフィリンリガンドおよびその関連ペプチドによる神経栄養因子誘導作用と神経保護効果 日本薬学会第121年会, 2001年3月28-30日(札幌)

4) 新田淳美, 西岡博史, 古川昭栄
イムノフィリンリガンドおよび関連化合物による神経栄養因子誘導を介した神経機能修復

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、これまでの知見を基に 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 vivo* における NGF 産生効果について検討した。また、結合様式やスペーサー構造による薬物放出速度への影響についても検討した。さらに、能動的ターゲティング能を有する高分子プロドラッグ構築のため、グルコースを側鎖に有する高分子プロドラッグの開発に着手した。*in vivo* での有効な持続性のある NGF 産生活性を持つ高分子プロドラッグの構築には到っていないが、これまでの知見を活かすことにより目的とする高分子プロドラッグの構築が可能であることが示唆された。

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。

本研究は、4MC の脳内移行性を高め、かつ持続的薬理活性の発現を目的とし、十分な脂溶性を有する 4MC 誘導体の構築とメカノケミカル固相重合によるその高分子プロドラッグ化について検討した。平成 10 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) を合成し、その脂溶性を評価したところ 4MC よりも脳内移行性が大きいことが期待され、さらに *in vitro* における NGF 産生についても 4MC よりも高い活性が認められた。さらに、メカノケミカル固相重合法により 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実施し、本重合法の特徴である極めて分子量分布の狭い高分子プロドラッグの構築が可能であることを明らかにした。これらの知見を基に、平成 11 年度においては種々の組成比からなる本高分子プロドラッグの *in vitro* における薬物放出特性について検討し、共重合体組成比による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合成のスケールアップを目指し、より大

型の装置を用いての合成も検討し、スケールアップを行っても目的とする高分子プロドラッグが定量的に得られことを明らかにした。

本年度は、これまでに得られた知見を基にして、I を側鎖に有する高分子プロドラッグの *in vivo* における NGF 産生の評価とスペーサーあるいは結合様式による薬物放出速度の制御について検討を行った。また、より効率よく高分子プロドラッグを脳疾患部位に送達させることを目指し、高分子プロドラッグへの能動的ターゲティング能の賦与を試みた。すなわち、脳の毛細血管にはグルコースレセプターが存在することより、グルコースを高分子側鎖に有する高分子プロドラッグの開発に関しても検討を行った。

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、IV) は I と 2-(2-methacryloyloxy)ethyl isocyanate、あるいは methacryloyl chloride 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) およびグルコースのビニル誘導体 (V) を合成した。

2. メカノケミカル固相重合

化合物 (II) あるいは (IV) 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。