

#### 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 vivo における高分子プロドラッグからの薬物放出特性

平成11年度において、図1に示した高分子プロドラッグからの in vitro における薬物放出特性について検討した。その結果、高分子プロドラッグは徐放性を示し、かつ、定量的に薬物が放出された。また、共重合体組成比による放出速度の制御も可能であることが示された。高分子プロドラッグ中の I の含有率が 10mol% (Poly(10)) であるものは、本実験条件 (pH7.4 のリン酸緩衝液とアセトニトリルの混合溶媒、37℃) において半減期が約 2.3 時間であった。

本高分子プロドラッグの in vivo における NGF 産生効果について明らかにするために、共同研究者に Poly(10) を提供し、NGF 産生量の測定を依頼した。本実験は高分子プロドラッグあるいは 4MC の生理食塩水溶液をマウス腹腔内に投与し、所定の時間の後、脳内の NGF 量などを測定するものである。その結果、Poly(10) による脳内 NGF 量の経時変化は 4MC を投与した場合と類似の挙動を示し、有意な差異は認められなかった。この結果より、本高分子プロドラッグの生体内における加水分解反応が速く、十分な徐放性を持たないことが示唆された。

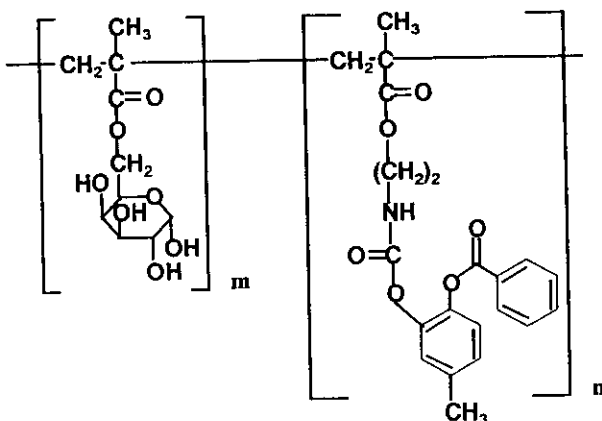


図1 1-Benzoyl-4-methylcatechol (I) を側鎖に持つ高分子プロドラッグ

#### 2. 結合様式による薬物放出速度制御

前年度の知見より、高分子プロドラッグ中の医薬品モノマー含有率を上げるにより放出速度を抑制することは可能であるが、反対に水溶性が失われるという問題があり、幅広い薬物放出特性を実現するには組成比による薬物放出の制御には限界がある

と考えられた。したがって、幅広い薬物放出特性の実現を目指し、結合様式およびスペーサー構造による薬物放出速度の制御を試みた。

まず、結合様式による薬物放出速度制御について検討するため、これまでのカルバモイル基による結合をエステル結合に換えた高分子プロドラッグ (PolyE(10)) を合成した。図2はその構造を示したものである。本高分子プロドラッグからの in vitro における薬物放出を前年度と同様の方法により実施した。図3は薬物放出の結果を示したものである。エステル体にするにより薬物放出速度は著しく低下し、その半減期は約 100 時間であった。

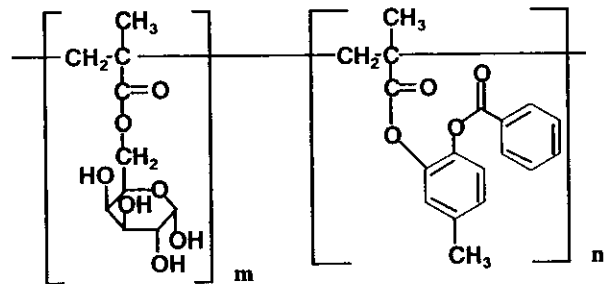


図2 エステル結合を介して主鎖に結合した 1-Benzoyl-4-methylcatechol (I) の高分子プロドラッグ

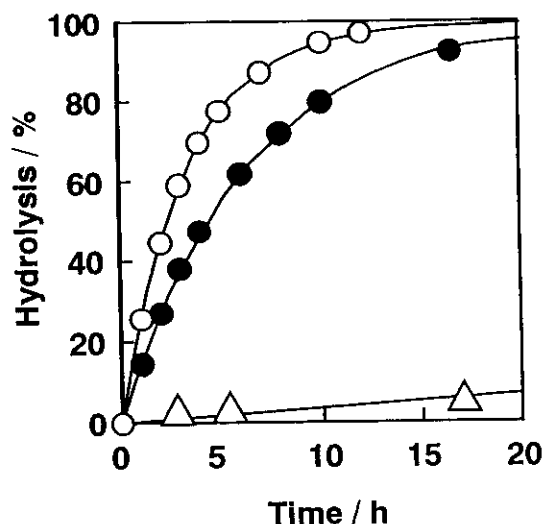


図3 1-Benzoyl-4-methylcatechol (I) を側鎖に持つ高分子プロドラッグからの薬物放出挙動

○; Poly(10), ●; Poly(20),  
△; PolyE(10).

本高分子プロドラッグについても in vivo における NGF 産生の測定をしていただいた結果、NGF 量の増加は認められず、薬物放出が極めて遅いこと

が示唆された。

現在、図4に示すより疎水性のスペーサー構造を持つ高分子プロドラッグの合成とその薬物放出特性について検討中である。

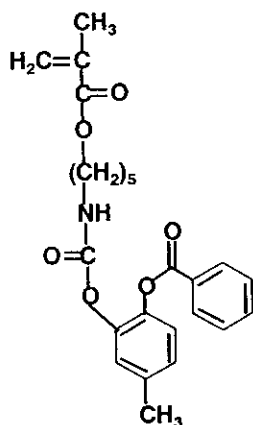


図4 スペーサーの長さが異なる 1-Benzoyl-4-methylcatechol (I) のビニル誘導体

### 3. 能動的ターゲッティング能を有する高分子プロドラッグの構築

近年、種々の糖類において細胞認識能があることが見出された。特に、脳の毛細血管においてはグルコースレセプターがあることがよく知られている。したがって、高分子側鎖にグルコースを結合させることにより脳の毛細血管に親和性の高い高分子プロドラッグの構築が可能であると期待される。かかる観点より、図5に示すグルコースのビニルモノマーの合成に着手した。

本研究では、文献既知の 0-acylglucose 合成法に従って、ピリジン中、グルコースとメタクリル酸クロライドとの反応により 6-methacryloyl glucose (V) の合成を行った。すでに目的物の機器スペクトルによる確認は終えており、現在、その精製と大量合成に着手している。

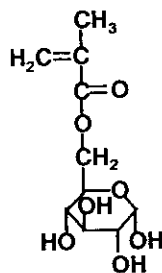


図5 グルコースのメタクリロイル誘導体 (V)

### 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ると考えられる。また、脳の毛細血管と親和性の高いグルコースを高分子プロドラッグ側鎖に導入することにより、能動的ターゲッティング能の賦与が可能であると考えられ、アルツハイマー治療薬としての有用性が期待される。

平成11年度に合成した化合物(I)の高分子プロドラッグ(Poly(10))について、in vivoにおけるNGF産生量の測定の結果、4MCを投与した場合と類似のNGF量変化を示した。生体内には様々な酵素があるため in vitroとは異なり、本高分子プロドラッグの加水分解反応が速やかに進行したため十分な徐放性が現れなかったことが示唆された。

かかる知見より、より徐放性を示す高分子プロドラッグの構築を目指し、カルバモイル基をエステル基に換えた高分子プロドラッグ(PolyE(10))を合成し、in vitroにおける薬物放出性および in vivoにおけるNGF産生量を比較検討した。エステル基に換えることにより in vitroにおける薬物放出速度は著しく遅くなり、半減期がカルバモイル基を用いたときの約40倍になった。一方、in vivoにおいてはPolyE(10)によるNGF産生量の増加は認められず、生体内においても加水分解反応が遅いことが示唆された。

以上の知見より、両高分子プロドラッグの中間の薬物放出速度を有する高分子プロドラッグの開発が必要であることが示唆された。かかる観点より、スペーサーのアルキル鎖長を長くした高分子プロドラッグの構築について取り組んでおり、現在、モノマーの単離を行っている。

さらに、高分子プロドラッグに能動的ターゲッティング能を賦与するため、高分子側鎖にグルコースを担持させた高分子プロドラッグの開発にも着手し、グルコースのメタクリロイル誘導体を合成した。現在、その精製と大量合成について検討を行っている。

### E. 結論

本研究により得られた知見を以下にまとめる。

NGF産生促進剤である4MCの脳内への移行性を高め、かつ持続的な薬理活性を目指し、本研究に着手した。4MCは十分な疎水性を持たないことから脳内への移行が低くこの点を改善するため、1位に疎水性基を導入した1-benzoyl-4-methylcatechol (I)を合成した。Iの in vitroにおけるNGF産生は4MCよりも高いことが示された。また、Iを側鎖に有する高分子プロドラッグをメカノケミカル固相重合により合成し、分子量分布の狭い高分子プロドラッグを得ることができた。

(平成10年度)

平成11年度には、数種の組成比の異なるIの水溶性高分子プロドラッグを構築し、in vitroにおける

薬物放出特性について検討した。その結果、組成比を変えることにより薬物放出速度の制御が可能であることを明らかにした。また、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。

これまでの知見を基に、本年度においては *in vivo* における本高分子プロドラッグの NGF 産生効果の評価および結合様式やスパーサー構造による薬物放出制御について検討を行った。現時点においては、*in vivo* において持続的に NGF 産生を示す高分子プロドラッグの構築には到っていないが、*in vitro* および *in vivo* の結果を考慮することにより、目的とする高分子プロドラッグの構築が可能であると大いに期待できる。また、能動的ターゲティング能を有する高分子プロドラッグの構築にも着手し、新たな展開が期待できる。

## 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回日本DDS学会 1999年7月8-9日(香川)
- 2) 近藤伸一、葛谷昌之、新田淳美、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(2) 第16回日本DDS学会 2000年7月28-9日(秋田)

## 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。

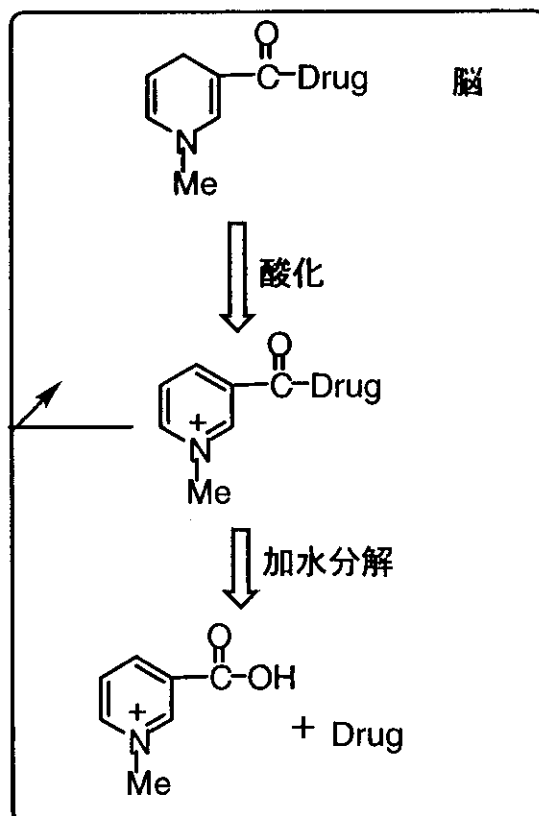
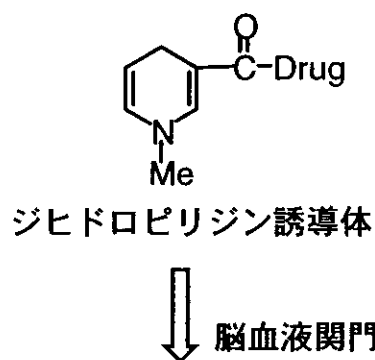
#### A. 研究目的

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。

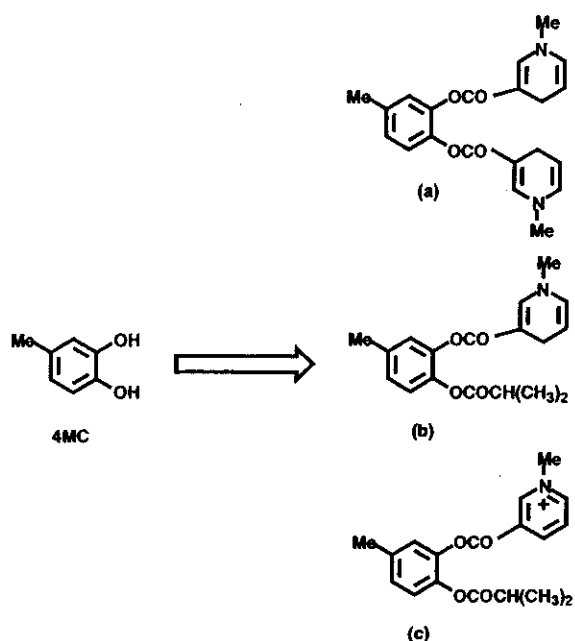
#### B. 研究方法

脳内移行補助基として高脂溶性で電荷を有さないジヒドロピリジン(脳内移行補助基)の導入により、血液側からのBBB透過性が向上する。一方、脳内に移行したプロドラッグは脳内の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、脳内からのBBB透過が抑制される。さらにこのエステルは容易に加水分解を受け、遊離薬物として作用を発現すると同時に脳内に滞留(BBBを透過しにくい)するため、持続性も得られるといった手法である。

4-メチルカテコールの脳内移行性プロドラッグの開発に関しては、すでに Bodor らによってカテコールのフェノール性水酸基に直接ニコチ



ン酸を導入する方法が実施されている。まず 4-メチルカテコールに直接ジヒドロピリジンが結合している誘導体を合成した。化合物 (a)、(b) についてのラット脳ホモジネート中及びラット全血液中での半減期、4-メチルカテコールも含めた mRNA レベルでの NGF 発現促進活性 (テーブル 1) が調べられた。また、化合物 (b) 及びその酸化体 (c) について pH 依存的な安定性が試された (図 6)。これらの結果より、末梢投与後の、4-メチルカテコールのジヒドロピリジン型プロドラッグ (a) の NGF 発現促進効果を 4-メチルカテコールを単独で投与したコントロールと比較すると、わずか 1.22 倍の NGF mRNA の増加しかみられなかったことから、プロドラッグ化による脳内移行性向上の効果はほとんどないと考えられる。したがって、ジヒドロピリジンと 4-メチルカテコール間の芳香族エステル (活性エステルに分類される) の生理学的条件下で不安定性、つまり血中で容易に加水分解を受け遊離のカテコールに変換している可能性が高いと推測された。そこで、本研究では 4-メチルカテコールとジヒドロピリジンをより安定な結合によって連結することを目的に、研究を開始した。



	(1)	(2)	(3)
(a)	53.3	49.5	0.462 ± 0.031
4MC	—	—	0.341 ± 0.051

- (1) ラット脳ホモジネート中半減期(分)  
 (2) ラット血液中半減期 (分)  
 (3) NGF mRNA レベル増加量 (ラット海馬)

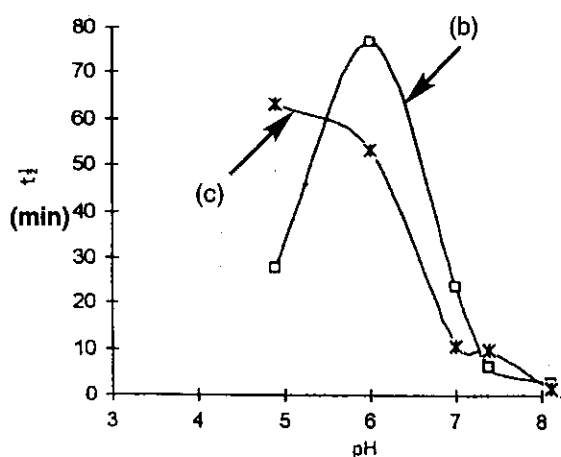
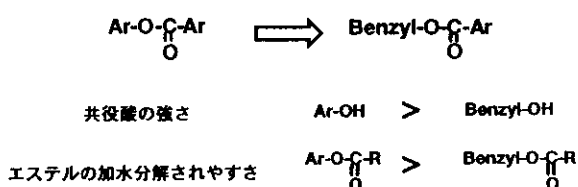


図6

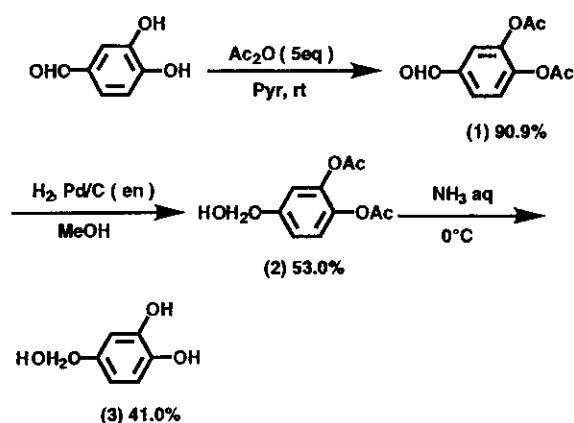
### C. 研究結果 • D. 考察

すでに述べたように、4-メチルカテコールとジヒドロピリジンの間を連結している芳香族エステルが生理学的条件下で加水分解を受けてい

る可能性が高いと推測できるので、より安定な結合で 4-メチルカテコールとジヒドロピリジンを連結しようと考えた。一般に、エステル結合の加水分解を考えた場合、脱離基の共役酸が強酸であるほど加水分解を受けやすい。例えば、 $\text{CH}_3\text{COCl}$  と  $\text{CH}_3\text{COOEt}$  を比べた場合、 $\text{CH}_3\text{COCl}$  の脱離基は  $\text{Cl}$  であり、 $\text{Cl}$  の共役酸は  $\text{HCl}$  ( $\text{pK}_a = -8$ ) で加水分解反応はきわめて容易におこる。しかし、 $\text{CH}_3\text{COOEt}$  の脱離基である  $\text{EtO}$  の共役酸は  $\text{EtOH}$  ( $\text{pK}_a = 16$ ) であり加水分解反応は起こりにくい。そこで、ジヒドロピリジン側の構造は換えられないので、4-メチルカテコールを 4-ヒドロキシメチルカテコールへと誘導することで芳香族エステルがベンジルエステルに変換でき、結合が強化され、加水分解されにくいと予測した。



そこで、Protocatechualdehyde を出発原料として  $\text{Ac}_2\text{O}$  で 2 つのフェノール性水酸基をアセチル保護し (1)、 $\text{Pd/C}$  (en) を用いて接触水素化することで 4-ヒドロキシメチルカテコールのアセチル保護体 (2) を 53% の収率で得た。さらにこれをアンモニア水 (28%) を用いて脱保護することで、4-ヒドロキシメチルカテコール (3) を 41% の収率で得ることができた



#### 4-ヒドロキシメチルカテコールの NGF 及び BDNF 発現促進作用

つぎに、胎児期 18 日のラット海馬を取り出し、トリプシンで分散させた後、神経細胞の培養を開始した。培養開始 48 時間後に (2)、(3) 及び 4-メチルカテコールを 0、0.01、0.05、0.1、0.25、0.5、1.0、2.5、5.0、10、20 及び 30m M を溶媒上清に加え 24 時間後の神経成長因子 (NGF) および脳由来神経栄養因子 (BDNF) の濃度を酵素免疫測定法 (Enzyme Immunoassay ; EIA) で測定した。

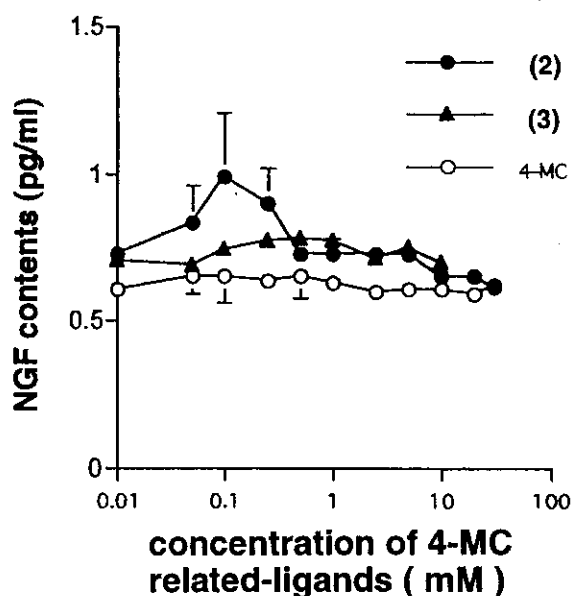


Fig. 3-2

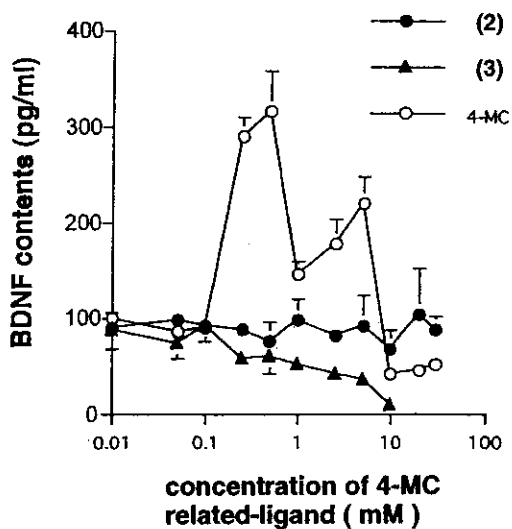


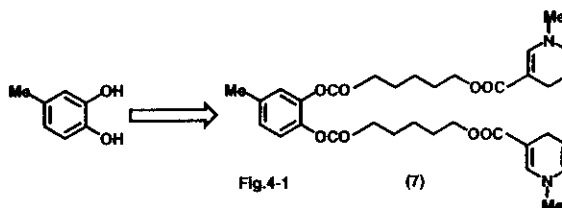
Fig. 3-3

上の Fig に示すように 4-メチルカテコール及びその誘導体は神経細胞上清中の NGF 含量について影響を及ぼさなかった。NGF を産生するとして知られているグリア細胞ではなく、神経細胞を用いたこともあって、4-メチルカテコールにおいても NGF 発現活性が観察されなかった。一方、BDNF 含量については 4-メチルカテコールは 0.1 から 1mM の濃度範囲で産生促進効果が観察されたが、化合物 (2)、(3) は培養上清中の BDNF 含量に変化は観察されなかった。このような結果から、親薬物である 4-ヒドロキシメチルカテコールに活性がない可能性が大きく、プロドラッグ誘導化はあまり意味がないと判断した。よって、4-メチルカテコールのフェノール性水酸基にリンカーを介してジヒドロピリジンを導入することを検討した。

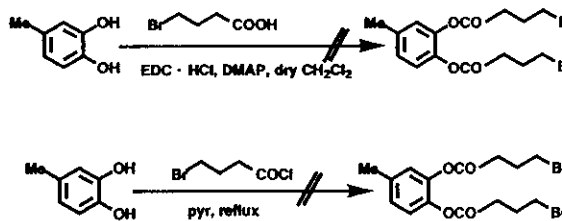
#### 4-Methylcatechl のジヒドロピリジン型プロドラッグの合成

#### ビス置換ジヒドロピリジン型プロドラッグの合成

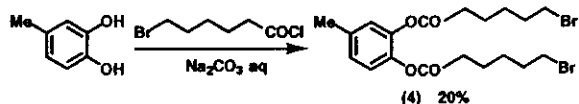
Bodor らの研究の結果によって、我々は芳香族エステルを介して 4-メチルカテコールとジヒドロピリジンを直接結合したものに代えて、より安定な結合によって 4-メチルカテコールとジヒドロピリジンを連結しようと考えた。すなわち、4-メチルカテコールとジヒドロピリジンの間への適当なリンカー（メチレン鎖）の導入を検討した



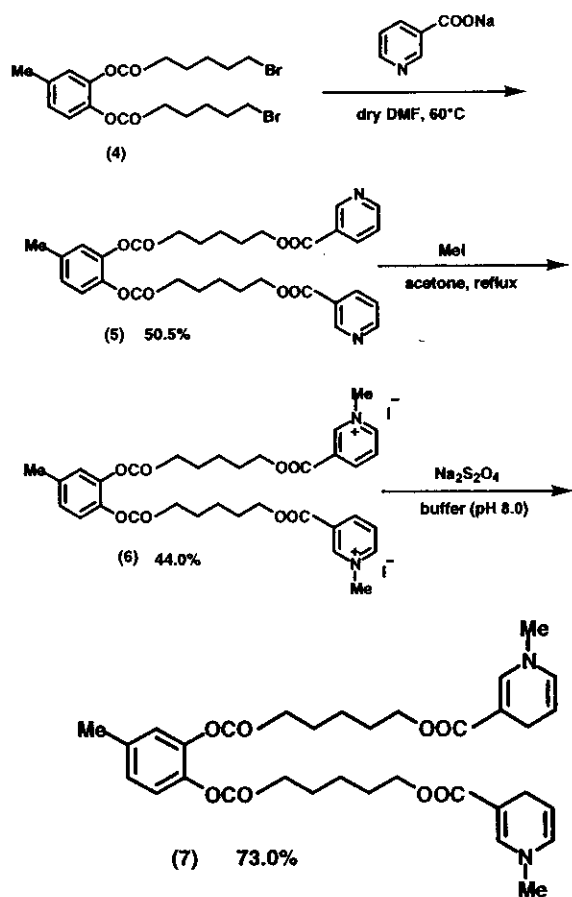
我々は当初、4-メチルカテコールの 2 つのフェノール性水酸基に同時に 4-Bromobutyric acid を縮合させようとしたが、反応が進行せず、原料を回収した。



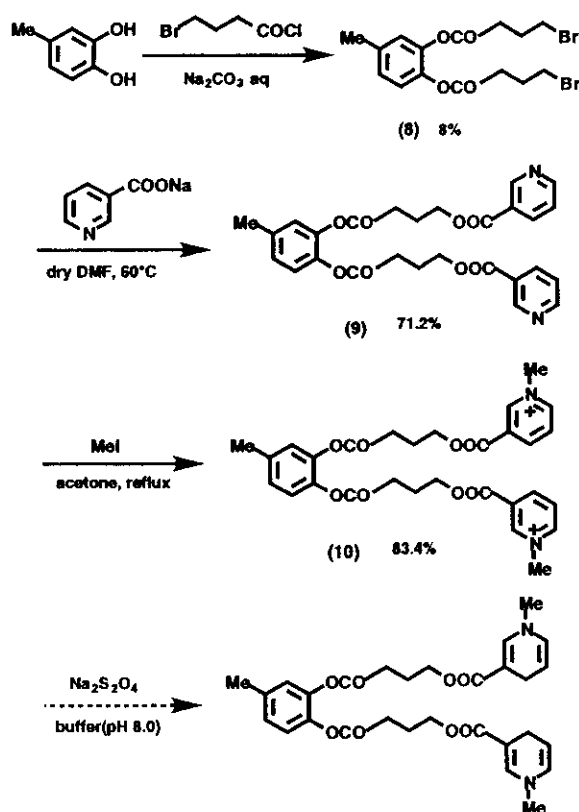
そこで、Schme 4-2 に示す反応、すなわち、4-メチルカテコールにあらかじめ調製してあった 6-Bromohexanoyl chloride を炭酸ナトリウム水溶液中で Schotten-Baumann 法<sup>28)</sup>を用いて縮合させたところ、6-Bromohexanoic acid が 4-メチルカテコールの両方のフェノール性水酸基に入った化合物を収率 20%で得ることができた。



この結果から以下に示す目的物 (7) の合成を開始した。化合物 (4) とニコチン酸ナトリウム塩を DMF 中、摂氏 60 度で反応させると、2 つのリンカーの末端にニコチン酸が結合した化合物 (5) を収率 50.5% で合成できた。この化合物をアセトン中、MeI を加えて還流することで、Pyridine 環の窒素がメチル基で四級化された化合物 (6) を収率 44% で得た。次にリン酸緩衝液中で Sodium hydrosulfite で還元<sup>29)</sup> し、目的とするプロドラッグ体 (7) を 73% の収率で得ることができた



また、4-メチルカテコールとジヒドロピリジンの間へメチレン3つのリンカーの導入を検討した。すなわち、4-メチルカテコールにあらかじめ調製してあった 4-Bromobutyryl chloride を炭酸ナトリウム水溶液中で縮合させ、4-Bromobutyric acid が 4-メチルカテコールの 2 つのフェノール性水酸基の両方に入った化合物 (8) を収率 8% で得た。以下、(7) の合成と同様にプロドラッグ体への合成を行い、現在ピリジニウム塩 (10) まで合成し、目的のジヒドロピリジン化合物への還元を検討中である。

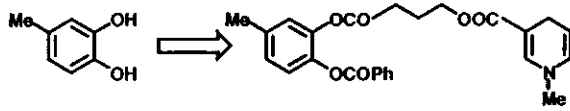


モノ置換ジヒドロピリジン型プロドラッグの合成

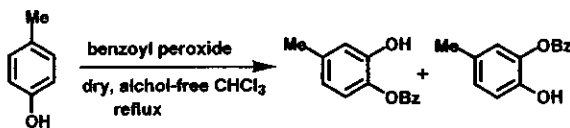
次に、4-メチルカテコールの 2 つのフェノー



ル性水酸基のうち1つを Benzoyl 基で保護した上で 4-Bromobutyric acid と縮合し、ジヒドロピリジン を 1 つ導入したモノ置換ジヒドロピリジン型 プロドラッグの合成を検討した。

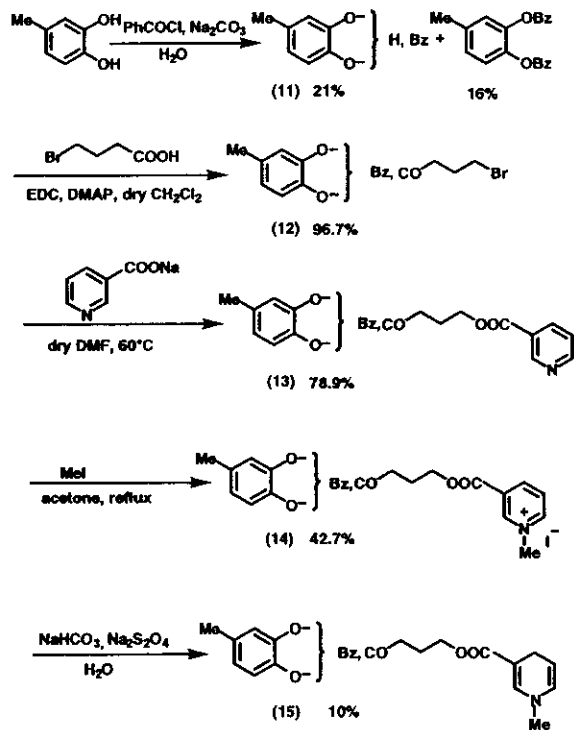


すなわち、4-メチルカテコールに、炭酸ナトリウム水溶液中 Schotten-Baumann 法により Benzoyl chloride を縮合し、Benzoyl 基が1つ導入された誘導体である 4-O-benzoyl 体と 3-O-benzoyl 体が位置異性体の混合物 (11) として 21% の収率で得られた。なお、この段階での位置選択的な合成法 (*J. Chem. Soc.* 1949, 3189-94) の検討を試みた。



この方法は、*p*-Cresol と Benzoyl peroxide をドライ、アルコールフリー クロロホルム中で還流することで 4-O-benzoyl 体のみが選択的に合成できる方法である。しかしながら、4-O-benzoyl 体と 3-O-benzoyl 体の混合物でしか得ることができなかった。混合物を分離精製することができなかったので次の縮合反応に使用した。EDC を縮合剤として 4-Bromobutyric acid と反応することで末端に臭素を有するリンカーが未保護の水酸基に入った化合物 (12) を 96.7% の収率で得た。ここでは、2 つのフェノール性水酸基の両方が未保護の場合は全く進行しなかったが、一方が保護

されている (11) の縮合は高収率で進行した。そこで、これを混合物のまま ニコチン酸ナトリウム塩と縮合することで 4-メチルカテコールとリンカー (メチレン 3 つ) を介して Pyridine 環が 1 つ結合した化合物 (13) を収率 78.9% で得た。Pyridine 環の窒素を MeI で四級化し (化合物 14 : 収率 42.7%)、炭酸水素ナトリウム水溶液中、Sodium hydrosulfite で還元することにより目的であるプロドラッグ体の位置異性体の混合物 (15) を 10% の低収率ながら合成することができた。混合物の分離を各段階で試みたが、成功に至らなかった



4-メチルカテコールの Dihydropyridine 型プロドラッグの NGF 及び BDNF 発現促進作用の測定

脳移行性の向上が期待されるプロドラッグ (7), (15) についてまず、プロドラッグ体自身の *in vivo*

での NGF 及び BDNF 発現促進作用を測定した。

神経細胞の初代培養を行い、培養開始 24 時間後に無血清培地に交換した。無血清培地で 24 時間培養した後に 4-メチルカテコール (4-MC)、(7) 及び (15) を 0.015mM から 100mM\*の濃度で含む培養上清に交換した。各被検体薬物を 24 時間作用させた後に、プレートごと凍結し、溶解後十分にピペティングを行って、酵素免疫測定法 (Enzyme Immunoassay ; EIA) のサンプルとした\*\*。

\* (7)、(15) は 100%エタノールを添加後超音波処理を行ったが、完全には溶解しなかった。したがって、今回の濃度は実際の濃度よりも低い可能性がある。

\*\* 細胞中及び上清中両方の神経栄養因子濃度をいっしょに測定していることになる。今回の薬物は顕微鏡で観察した限りでは、生存細胞数に影響を与えていなかったため、細胞 1 個あたりの合成量としては同一条件と考えてよいと考えられる。

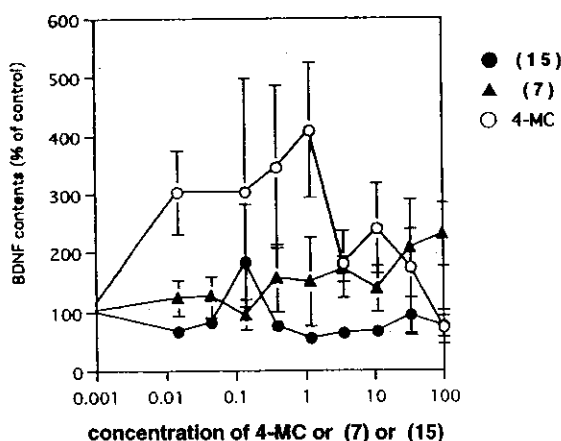
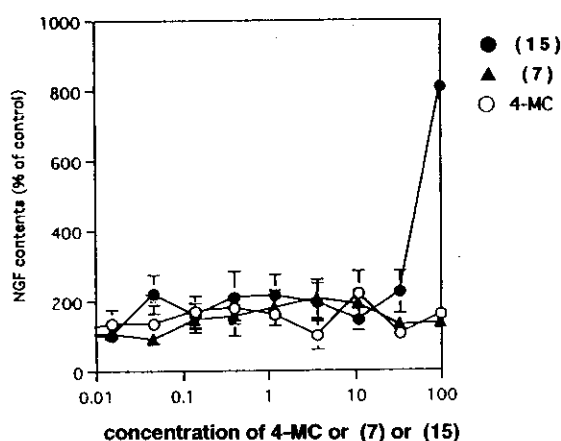
NGF 含量については、4-MC が 10mM 前後で効果が観察されている。注目すべき点としては、

(15) が 100mM で著しい NGF の発現を促進している。もともと NGF の発現作用は神経細胞自体よりもむしろグリア細胞のほうが強いので、活性の測定に後者を用いた場合、良い結果が得られる可能性がある。

BDNF 含量については、4-MC が効果が観察されている。(7) についても発現促進効果が観察され、しかも 4-MC よりも高濃度で作用が観察されているので、もっと高濃度または長時間

培養で検討したいと考えている。

今回測定した化合物はプロドラッグであるので、親薬物である 4-メチルカテコールよりも活性が大きく低下すると考えられたが、(15) の 100mM 付近での活性発現に興味もたれる。また、\*でも述べたように薬物が完全に溶解していないので、この点は、改良していく必要があると考えている。



## E. 結論

アルツハイマー型痴呆 (AD) の治療薬開発は様々な方面から行われているが、その一つに神経成長因子 (NGF) 関連薬がある。これは、NGF 相

当薬あるいは NGF 発現促進作用を有する薬剤のことである。AD の症状の一つに前脳基底部コリン作動性神経細胞の脱落が知られている。NGF は、中枢では前脳基底部コリン作動性神経細胞に選択的に作用することから NGF 発現促進作用を持つ 4-メチルカテコール (4-MC) に注目した。4-MC は脳内に移行し難いため、本研究では、4-MC の脳内移行性の向上を目的にプロドラッグ化を検討し、以下の結果を得たので要約する。

- 1) まず、4-MC を脳内移行補助基として知られているジヒドロニコチン酸とメチレンリンカーで結合したハイブリッド型構造をデザインした。
- 2) 2 つのフェノール性水酸基の 1 つを安息香酸エステルとし、もう 1 つの水酸基にトリメチレン鎖を介してエステル結合でジヒドロニコチン酸を導入した 2 種類の位置異性体の混合物を合成することができた。
- 3) 4-MC の両方の水酸基にメチレン鎖を介してエステル結合でジヒドロニコチン酸エステルを導入したプロドラッグ体を合成できた。
- 4) 4-MC の 4 位メチル基に水酸基を導入した 4-ヒドロキシメチルカテコール (4-HMC) を合成し、4 位ヒドロキシメチル基でのプロドラッグ化を検討したが、合成した 4-HMC には期待された NGF 及び BDNF 誘導活性が見られなかったため、プロドラッグ体の合成を中断した。

以上、脳内移行性の向上が期待される 2 種の 4-MC プロドラッグ体の合成に成功した。現在、これらの化合物の安定性を検討中であり、脳内移行性測定に十分な量のサンプルを合成中である。これらの化合物の良好な脳内移行性と作用

の発現が達成された場合にはさらに他の NGF 発現促進作用を有する化合物の脳内移行性プロドラッグ化を検討したいと考えている。

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 飯沼宗和 岐阜県保健環境研究所 所長

研究要旨

メタ或いはパラ位に酸素官能基を部分構造として有するフラボノイド化合物の中で、2,5-dibenzyloxy-2',3',4',6'-tetramethoxydihydrochalcone に培養神経細胞における神経栄養因子（NGF, BDNF, NT-3, GDNF）の産生誘導効果が観察された。また、本化合物にはコントロールに比べて脳部位の神経栄養因子含量の増加又は増加傾向認められた。

A. 研究目的

培養神経細胞における神経栄養因子の産生誘導効果の観察された 2,5-dibenzyloxy-2',3',4',6'-tetramethoxychalcone, 2,5-diisopropoxy-2',3',4',6'-tetramethoxychalcone 及び 2,5-dibenzyloxy-2',3',4',6'-tetramethoxydihydrochalcone についてラット脳部位の神経栄養因子含量の増減について研究する。

B. 研究方法

研究用として上記3種のカルコン類の大量合成とラットを使つての動物実験（倫理面への配慮）所属施設が定める動物実験諸規程に従う。

C. 研究結果

2,5-Dibenzyloxy-2',3',4',6'-tetramethoxydihydrochalcone にはコントロールに比べて脳部位の神経栄養因子含量が増加又は増加傾向が認められた。また、本化合物を連続末梢投与したラットの線条体でのBDNFの含有量が有意に増加した。他にも増加のある因子や部位が

見受けられたが、各群の個体数が少なくバラツキのため有意な結果を得ることができなかった。

D. 考察

2,5-Dibenzyloxy-2',3',4',6'-tetramethoxydihydrochalcone に照準を合わせて本化合物を大量合成し、個体数を増やしたラットで追加実験することにより本化合物の脳の各部位における神経栄養因子の増加と先導化合物としての有用性について明確にすることができる。

E. 結論

十数種の伝承薬物（補養性生薬、活血性生薬）、50種を超える天然ポリフェノール（主としてスチルベノイド化合物）及び30余種の合成化合物（主としてパラ位に酸素官能基を有するフラボノイド）について神経栄養因子の産生誘導活性を検討した。その結果、合成化合物 2,5-Dibenzyloxy-2',3',4',6'-tetramethoxydihydrochalcone に期待できる活性が認められた。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

なし。

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

## レトロウイルスベクターによる神経栄養因子の 遺伝子導入・発現に関する研究

渡辺里仁（創価大学・生命科学研究所・教授）

**研究要旨** BDNF 脳内分布とその軸索輸送の検索からBDNF の神経繊維の遠位部での存在は、神経活動に応じて迅速に BDNF を供給するために重要な役割を果たすものと考えられた。ベクター構築の面では、目的とする遺伝子上流のプロモーターや融合タンパク質との組み合わせにより、遺伝子発現が弱められた。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必要なポリAシグナルの構造周囲の部位決定をした。

### 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) 脳由来神経栄養因子（BDNF）を検出するための免疫染色法の改良を行った。パラフィン切片をクエン酸に浸し、オートクレーブをかけることによって、従来法を改変した。抗体は anti-BDNF antibody (Santa Cruz Biochemistry) を用いた。BDNF が軸索ではなく樹状突起内に分布することを証明するために、軸索輸送を止めるコルヒチンを脳固定機を用いて側脳室内に投与後、24、48、78時間で組織を取り出し、BDNF の免疫染色性を比較した。
- 2) 昨年までに作成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 の部分ペプチドをタグとして付加した BDNF およびオワンクラゲ緑色蛋白質の cDNA を LxA ベクターに導入した。高レベルで安定した蛋白発現を誘導するために内部プロモーターとして

CMV ウイルスのエンハンサー・プロモーターおよびCMV のエンハンサーの下流にベクターアクチンのプロモーターをつないだ（CAG プロモーター）およびコントロールとして内部プロモーターを含まないものを作成した。

#### 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  $\Psi$ FrC6/NIH 及び  $\Psi$ 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  $\Psi$  を除き更に下流のLTRをSV40のスーパーサイジング型ポリA付加シグナルで置換して得たベクター pA8( $\Psi$ -)bをNIH3T3 細胞に導入し、パッケージング細胞  $\Psi$ FrC6-bを樹立した。安定したエンベロープ蛋白遺伝子 (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ーパーサイジ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、異常スーパーサイジ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) 大脳皮質では、BDNF 抗原は樹状突起遠位部にまで見られたのに対し、その軸索の投射領域や通過領域には見られなかった。これは、コルヒチンにより軸索輸送を止めても変化しなかった。一方、海馬でも、CA1-4 の錐体細胞、歯状回において BDNF 抗原の染色性が細胞体と樹状突起に見られた。大脳皮質との大きな相違点は、CA3-4 の内層 (Stratum radiatum) における線維状の染色性が軸索輸送を止めることによって減弱されることである。このことから、CA3-4 にかけての

BDNF 陽性線維の多くは軸策突起であると考えられる。コルヒチン投与によって染色性の失われる海馬 CA3-4 の内層においては脳組織の空胞変性がみられた。

2) 内部プロモーターとして CAG を使用した場合、パッケージング細胞内の蛋白の発現は良好であったが、ウイルス感染した細胞での発現が見られなかった。一方、CAG の上流に組み込んだ neomycin 耐性遺伝子の発現はウイルス感染細胞でも良好であった (1ml 当たり10 の 4 乗)。内部プロモーターを含まない構造では、蛋白の発現が弱く、特に BDNF の発現は免疫染色法の感度以下であった。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、蛋白の発現量は良好であった。ウイルス感染した細胞での蛋白発現は現在検討中である

## 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プ蛋白 (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。BDNF の神経繊維の遠位部での存在は、神経活動に応じて迅速に BDNF を供給するために重要な役割を果たすものと考えられる。また、近年、クロイツフェルトヤコブ病のモデルマウスで脳の空胞化に先立ち BDNF mRNA が減少することが報告されている。今回、コルヒチンによるスポンジオーシスの形成部位で BDNF が減少していることをあわせると、BDNF が減少することがスポンジオーシスの形成初期に何らかの原因を作っている可能性が示唆される。

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、b-gal の発現が弱められたと考えられる。CAG プロモーターは、配列内にスプライシングアクセプターサイトを含んでいるため、完全長の偽ウイルスが産

生されなかったと考えられる。内部プロモーターを含まない場合、本来のレトロウイルスの LTR で蛋白発現が誘導されるが、このプロモーターでの蛋白発現量では免疫染色法で観察するには十分な量でないことが分かった。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て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

### 1. 論文発表

1) 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

2) 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

3) 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

4) 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

### 2. 学会発表

1) 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)

2) 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)

3) 高瀬 明、後藤かつ美、渡辺里仁 ラットの  
脳におけるエコ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)

4) 山川 圭, 池田富夫, 高瀬 (余田) 明, 渡辺里  
仁 A8ウイルス 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)

5) 高瀬 明、渡辺里仁 マウス白血病ウイルス  
の中核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



# 厚生省科学研究費補助金（脳科学研究事業）分担研究報告書

## ジペプチドによる神経栄養因子の産生・分泌促進作用の研究

大井長和（宮崎医科大学内科学第3講座助教授）

免疫抑制剤であるサイクロスポリンAに構造が類似するLeu-Ileuジペプチドを、ラット不死化シュワン細胞の培養系に添加して神経栄養因子の産生・分泌効果を調べた。NGFとBDNFは、培養液中のジペプチド濃度10 $\mu$ g/mlにて最大値を示し、GDNFは1 $\mu$ g/mlにて最大値であった。Leu-Ileuジペプチドは、NGF, BDNFとGDNFの産生・分泌促進作用を有すると考えられた。

### A. 研究目的

変性性神経疾患の加療の一つとして神経栄養因子(NTFs)の補充投与が考えられる。NTFsは、蛋白質が多く生体の血液・脳関門や血液・神経関門を通過して目的臓器に到達することは困難である。そこで、上記疾患で障害されない脳や神経の非神経細胞に作用してNTFsの産生・分泌の促進作用を持ち、しかも血液・脳および血液・神経関門を通過しうる小分子量物質の開発が望まれている。免疫抑制剤であるサイクロスポリンAやタクロリムスは、神経細胞保護作用を示し、この機序としてNTFsの産生をいたすことが主任研究者の古川らにより報告されている。今回、上記免疫抑制剤に構造が類似するも免疫抑制作用を持たないLeu-IleuジペプチドがNTFsの産生・分泌の促進作用を有するかどうかの検討を行った。

### B. 研究方法

1. 細胞培養系：米国 NIH, NINDS の Dr. Richard H. Quarles から供与していただいたラット不死化シュワン細胞株(S16)を2cm培養皿に10%FCSを含むDMEMにて、5%CO<sub>2</sub>37°Cの条件で培養を行った。コンフルエントになった後に、DMEMを捨てPBS(-)で洗浄後に、0.5%BSAを含むDMEM中にLeu-Ileuジペプチドを培養液中に0,

0.1ng/ml, 1ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml, 1 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ g/mlの各濃度となるように添加した。24時間の培養後に、写真撮影を行い、細胞数の計測および培養液を採取して、ディープフリーザー内で-80°CでNTFsの測定まで保存した。各濃度当り、3枚の培養皿を使用した。

2. NTFsの測定：培養液中のNGF, BDNF, GDNF量をEIA法にて測定し、結果を1細胞当りの産生・分泌量で表現をした。有意差検定は、多変数解析法(Bonferroni法)にて行った。

### c. 結果

NGFとBDNFは、Leu-Ileu濃度10 $\mu$ g/mlで最大値を認め、それぞれ(2.69 $\pm$ 0.04) $\times$ 10<sup>-5</sup>(M $\pm$ SE)pg/cell, (45.85 $\pm$ 6.29) $\times$ 10<sup>-5</sup>pg/cellを示した(図1、図2)。GDNFはLeu-Ileu濃度1 $\mu$ g/mlで最大値(7.36 $\pm$ 2.33) $\times$ 10<sup>-3</sup>pg/cellを認めた(図3)。

### D. 考察

サイクロスポリンAやタクロリムスは、これらの生体内受容体蛋白質であるイムノフィリンのコンフォメーションの変化をもたらし、細胞内カルシウムを遊離させてNTFsの産生刺激効果をもたらすと考えられている。そこで、イムノフィリン上のカ

ルシウムチャンネル結合部位に類似した構造をもつ Leu-Ileu ジペプチドを作成し、NTFs の応答を末梢神経系の非神経細胞であるラット不死化シュワン細胞株で検討した。

シュワン細胞は、末梢神経の損傷時に、神経の再生と修復のため各種の NTFs を産生・分泌することが知られている。この促進物質として、4-メチルカテコール、アルドース還元酵素阻害剤などが報告されているが、Leu-Ileu ジペプチドの報告はない。今回の実験で Leu-Ileu ジペプチドが、BDNF, GDNF に加えて NGF の産生・分泌刺激効果を示したことから、このジペプチドが末梢神経障害に対する治療薬となる可能性が考えられる。今後、in vivo の条件で Leu-Ileu ジペプチドが末梢神経系で NTFs の産生・分泌促進作用を示すかどうかの検討が必要である。

#### E. 結論

Leu-Ileu ジペプチドは、ラット不死化シュワン細胞に対して NGF, BDNF および GDNF の産生・分泌促進効果を示した。

#### F. 研究発表

なし

#### G. 知的所有権の取得状況

なし

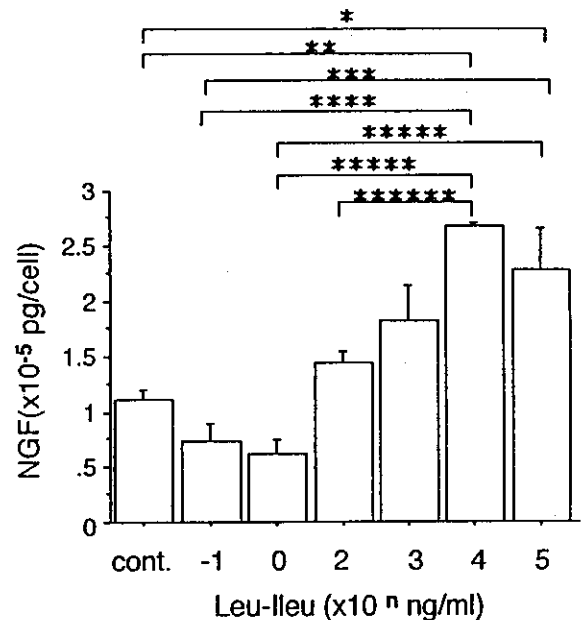


図1、培養液中の NGF

NGF は Leu-Ileu ジペプチド濃度  $10^4$  ng/ml で最大量を示した。( \*  $P=0.0008$ , \*\*  $P=0.0002$ , \*\*\*  $P=0.0001$ , \*\*\*\*  $P<0.0001$ , \*\*\*\*\*  $P=0.0002$  )。

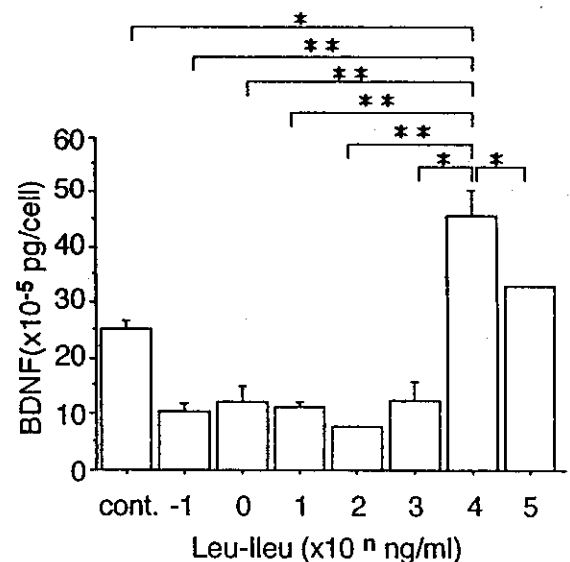


図2、培養液中の BDNF

BDNF は、Leu-Ileu ジペプチド濃度  $10^4$  ng/ml で最大量を示した。( \*  $P<0.0001$ , \*\*  $P<0.0001$  )。

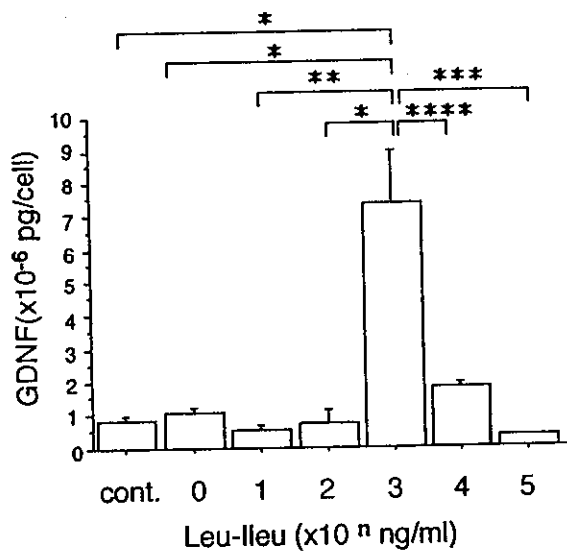


図3、培養液中のGDNF

GDNF は Leu-Ileu ジペプチド濃度  $10^3$  ng/ml で最大量を示した。(\*P=0.0002, \*\*P<0.0001, \*\*\*P=0.0005, \*\*\*P=0.0004)。