

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第4分野

稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

目 次

課題番号		
20000989A 990A 41156	テオフィリンの未熟児無呼吸発作に対する臨床的研究	小川雄之亮 …… 1
986A 41203	門脈血行異常症（門脈圧亢進症）に対する適応外使用医薬品（塩酸プロプラノロール）の臨床研究に関する研究	杉町 圭蔵 …… 4
987A 42003	潰瘍性大腸炎およびクローン病緩解維持に対するアザチオプリンの有効性に関する臨床研究	日比 紀文 …… 11
988A 42020	多発性筋炎・皮膚筋炎に合併する間質性肺炎に対するシクロスポリン療法に関する研究	宮坂 信之 …… 18
991A 42140	難治疾患・稀少疾患を主とした医薬品の適応外使用のエビデンスに関する調査研究	津谷喜一郎 …… 23
992A 42204	輸入熱帯病・寄生虫症に対するオーファンドラッグの臨床評価に関する研究	大友 弘士 …… 34
42230	脊髄小脳変性症に対する適応外使用医薬品「ワクシニアウイルス接種家兔炎症皮膚抽出液製剤（ノイロトロピン）」の開発研究	米田 良三 …… 37

脊髄小脳変性症に対する適応外使用医薬品「ワクシニアウイルス接種家兎炎症皮膚抽出液製剤（ノイロトロピン）」の開発研究

所 属 日本臓器製薬株式会社 開発本部
研究者 米田良三

分担研究者

(1) 名古屋大学大学院生命農学研究科 織田銃一

要 旨

脊髄小脳変性症モデルマウス (Rolling mouse Nagoya, RMN) を用いた薬効薬理試験および培養小脳顆粒細胞を用いた作用機序研究により、ノイロトロピンの脊髄小脳変性症への臨床応用の可能性が示唆された。現在、幼若期 RMN のアポトーシス発現に及ぼす影響を検討中である。

1. 研究目的

脊髄小脳変性症 (spinocerebellar degeneration, SCD) は難治性の神経変性疾患であり、小脳や周辺の神経を中心とした脳組織の変性が起こり、歩行失調や構音障害等の症状がみられる。その発症機序については不明な点が多いが、遺伝性と非遺伝性のものがあり、遺伝性 SCD についてはトリプレットリピート、特にポリグルタミンをコードする CAG リピートがその原因とされている。SCD 治療薬として認められているのは、現在、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (thyrotropin releasing hormone, TRH) の誘導体のみである。

一方、ワクシニアウイルス接種家兎炎症皮膚抽出液 (ノイロトロピン) は下行性疼痛抑制系神経賦活型の慢性疼痛治療剤として広く使用されている。さらに基礎研究において、鎮痛作用以外に PC12 細胞の神経突起伸長を促進する作用や低酸素でのラット海馬 CA1 pyramidal cell の異常興奮を抑制する作用が報告されており、神経細胞機能の異常に対する保護作用が期待できる。さらに臨床において、SCD 患者の構音障害や失調歩行等の諸症状を改善するとの報告があることから、ノイロトロピンの SCD 治療薬としての可能性を基礎研究レベルで明らかにするために、脊髄小脳変性症モデルマウス (RMN) の効率的生産と遺伝子クローニングによる RMN における突然変異の塩基配列の決定、そのモデル動物に対する効力検討、さらに作用機序解明を目的とした培養小脳顆粒細胞を用いた基礎研究により、ノイロトロピンの脊髄小脳変性症への臨床応用の可能性を検討した。

2. 研究方法

1) RMN の効率的生産

リッターサイズが大きく、かつ子育ての上手な Slc:ICR マウスの雌 (+/+) にオリジナルの RMN の維持系統である PROD 系ヘテロ雄 (rol/+) を交配し、F1 を生産した。さらに、この F1 の雌に PROD 系ヘテロ個体雄を交配し、この交配から発症個体 (rol/rol) を出産した雌をヘテロと判定し、PROD 系ヘテロ個体雄と交配することによって、発症個体の生産に用いた。

2) カルシウムイオンチャンネル α 1A サブユニットの遺伝子クローニング

マウスは PROD 系統から正常型 (+/+) とヘテロ型 (rol/+)、ホモ型 (rol/rol) の遺伝子型を選び、RT-PCR 法によりカルシウムイオンチャンネル α 1A サブユニットをコードする cDNA を単離した。さらに、これから PCR primer を設計して genomic DNA をクローニングし、塩基配列を決定した。こうして正常型 (+/+) とホモ型 (rol/rol) のカルシウムイオンチャンネル α 1A サブユニットを比較することにより、突然変異の位置を確定した。

3) 行動薬理的検討

①使用薬物

被験物質としてノイロトロピンを、比較対照薬として TRH-T (酒石酸プロチレリン、ヒルトニン 2mg 注射液、武田薬品) を用いた。いずれも目的の濃度に調製し、ノイロトロピンは 100、200、400 NU/10 mL/kg、TRH-T はプロチレリンとして 25 mg/12.5 mL/kg の用量で、それぞれ経口および腹腔内投与した。また、対照として

注射用蒸留水を 10 mL/kg の容量で経口投与した。

②使用動物

試験には RMN を用いた。RMN は本研究の分担研究者である名古屋大学大学院生命農学研究科の織田銃一助教授より提供を受けた（ほぼ同数の雌雄両性を使用）。動物は 12 時間明暗サイクル（明期：8:00～20:00）に設定した飼育室で、固型飼料 および水道水を自由に摂取させて飼育した。

③失調歩行の測定法（オープンフィールド法）

失調歩行の測定にはオープンフィールド法を用いた。すなわち、オープンフィールド装置として一辺が 70 cm の正方形で、周囲を高さ 15 cm の柵で囲ったフィールドを用いた。さらに、フィールド内は縦横を 10 cm ずつ 7 等分し、対極する各辺の 6 箇所に 10 cm 毎に 6 対、縦横で合計 12 対の赤色光の発光/受光センサーを取り付け、動物が移動して光を遮ることにより移動量を自動的に計測出来る装置を取り付けた。マウスにフィールド内を 10 分間自由歩行させ、10 cm 毎の区画を横切った回数を移動量として自動計測した。また、腰部あるいは背部が床に接した場合を転倒とみなし、10 分間の転倒回数を手動で計測した。失調歩行の指標として、転倒回数を移動量で除した転倒指数を用いた。

④被験物質の投与および効果判定日

被験物質の投与は群分け当日から開始し、1 日 1 回、28 日間連日投与した。失調歩行に対する被験物質の効果判定は被験物質投与開始前ならびに投与 1 日、7 日、14 日、21 日および 28 日目にオープンフィールド法にて実施した。各測定日のオープンフィールド法による測定は、被験物質投与後、経時的に実施した。なお、被験物質投与前値は投与開始前 3 回の測定値の平均値とした。

4) ノイロトロピンの投与とアポトーシスの測定

14 日齢前後の発症および正常マウスを用い、ノイロトロピンを 100 NU/10 mL/kg の用量で 7 日間連日腹腔内投与した。それぞれの対照群には生理食塩液を同様に投与した。投与終了翌日に、ネンブータル麻酔下にて左心室から 4%パラホルムアルデヒド-0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) を注入し、全身灌流固定した後、全脳を摘出した。アポトーシスは、TUNEL 法により組織化学的に測定した。

5) 培養神経細胞を用いた検討

①使用薬物

被験物質としてノイロトロピンを、比較対照物質として brain derived neurotrophic factor (BDNF, Sigma) を用いた。ノイロトロピンは滅菌蒸留水で用時希釈し、最終濃度 10、50、250 mNU/mL となるように、培地中に 5%の割合で添加した。BDNF は、0.1% BSA 含有 PBS で希釈した後、最終濃度 50 ng/mL となるように添加した。

②小脳顆粒細胞の初代培養

7 日齢の Wistar 系ラット新生仔（日本エスエルシー）から無菌的に小脳を分取し、髄膜剥離後、酵素処理 (0.25%トリプシン、室温、15 分間) によって分散させた後、70 μ m メッシュを通過させ顆粒細胞を得た。細胞は、10% FCS/30 mmol/L KCl 含有 DMEM/F12 培地に再分散させ、poly-L-lysine でコートした 48 ウェルおよび 6 ウェルプレートにて 1×10^6 個/cm² あるいは 5×10^5 個/cm² 濃度で培養し、培養開始 24 時間後に非付着性細胞を除去してから、10 μ mol/L の cytosine β -D-arabinofuranoside (Ara-C, Sigma) 含有 MEM 培地 (10% FCS/30 mmol/L KCl 含有) に交換培養し、培養開始 7 日目の細胞を実験に用いた。なお、この細胞の同定を行うため、ホルマリン固定後、神経細胞マーカーである microtubule associated protein-2 (MAP-2) とグリア系細胞マーカーである vimentin、さらにアストロサイトマーカーである glial fibrillary acidic protein (GFAP) に対する特異的抗体および FITC 標識化二次抗体で染色後、蛍光顕微鏡下で観察した。

③低カリウム誘発細胞死と効果判定

培養開始 7 日目に培地中のカリウム濃度を 30 mmol/L から 5 mmol/L へと低下させ、さらに 48 時間後の細胞生存率を、WST 試薬 (同仁化学) を用いた MTT 変法による吸光度測定により、もしくは細胞二重染色法 (Calcein AM/Ethidium homodimer, Molecular Probes) にて染色し、蛍光顕微鏡観察下に計数することにより、それぞれ生/死細胞を求めた。また、死細胞に対して Hoechst 33258 (Molecular Probes) 染色を行い、一定面積当りの染色陽性細胞数を蛍光顕微鏡観察下に計数した。いずれの実験においても、ノイロトロピンは細胞死誘発の 48 時間前から培地中に添加して効果を検討した。

3. 研究成果

1) RMN の効率的生産方式の確立

平成 11 年度と同様に、種々の試験に用いる RMN マウスの効率的生産と供給体制を確立した。

2) カルシウムイオンチャネル α 1A サブユニットの遺伝子変異

ノーザンブロット法によるカルシウムイオンチャネル α 1A サブユニット mRNA のレベルにおいて、正常型 (+/+) とホモ型 (rol/rol) の遺伝子型の間で変異は発見できなかった。そこで、RT-PCR 法によってクローニングを行った結果、ホモ型 (rol/rol) の塩基配列の 3784 番目の塩基がシトシンからグアニンに変異していた。すなわち、アミノ酸ではアルギニンがグリシンに変化していたが、その他の変異はみられなかった。また、ヘテロ型 (rol/+) においてはシトシンまたはグアニンが見い出された。

3) ノイロトロピンおよび TRH-T の 4 週間連日投与の失調歩行に及ぼす効果

ノイロトロピンを 4 週間連日経口投与して、RMN の失調歩行に及ぼす効果を検討した。投与初日 (day 1) から最終投与日 (day 28) まで経日的かつ経時的に転倒指数を測定したところ、投与前値と比較し、投与 2 週間後から投与 30 分後をピークとして、軽度な失調歩行改善作用がみられた。一方、TRH-T の腹腔内投与では、投与前値あるいは対照群との比較において投与 15 分後をピークとする一過性の顕著な改善効果がいずれの測定日においても認められた (Fig. 1 & 2)。

次に、連投による効果だけを見るために、投与開始前ならびに投与開始後では各測定日の 0 分値をプロットした。その結果、TRH-T の投与 7 日目に有意な転倒指数の低下がみられた以外、効果の増幅など連投による影響は見られなかった (Fig. 3)。

4) RMN の生後成長期における小脳顆粒細胞のアポトーシスとノイロトロピンの影響

ノイロトロピンの効果については現在測定を積み上げ中であり、最終結果は得られていない。従って、最終的な結論を現時点で出すことはできないが、RMN と正常マウスとの比較ではアポトーシスの出現数に明らかな差が認められている。すなわち、RMN では正常マウスに較べて多くのアポトーシスが観察されている。

5) ノイロトロピンの低カリウム誘発初代培養小脳顆粒細胞死に対する効果

培養開始 7 日後の細胞は、約 90% 以上が MAP-2 陽性であり、GFAP 陽性アストロサイトおよび vimentin 陽性グリア系細胞はいずれも 5% 前後であったことから、主に小脳顆粒細胞であると判断した。これらの細胞を低カリウム条件下で培養すると、培養 1 日目以降、カリウム濃度に依存した細胞障害が認められ、この場合の細胞死機序は、死細胞が Hoechst 33258 染色されることから、アポトーシスであることを確認した。

このような培養条件下における低カリウム誘発細胞死に対して、ノイロトロピン (10~250 mNU/mL) および BDNF (50 ng/mL) は、48 時間前培養することによって細胞死保護作用を示し、同時にアポトーシスの抑制も認められた (Fig. 4)。

4. 考 察

SCD モデルマウスである RMN は繁殖能力が弱く、比較的大量の動物を使用する薬理実験を実施するためには、それに適した生産方式を開発する必要がある。今回我々が確立した方式は、大量の発症マウスを比較的短期間に用意することを可能にした。また、生後成長期の RMN の小脳顆粒細胞におけるアポトーシスが正常マウスに較べて多数みられ、さらに遺伝子クローニングの結果から判明した遺伝子変異はカルシウムイオンチャネル α 1A サブユニット・ドメイン III の S4 に相当する部分にあった。後者についてはヒトにおける episodic ataxia type 2 (EA2, hereditary periodic ataxia with nystagmus) や家族性片麻痺性片頭痛 (familial hemiplegic migraine, FHM) の遺伝子座と共通していることから、今後の一層の展開が期待される。従って、RMN は、今後薬効スクリーニングへの利用はもちろんのこと、種々の解析ツールとしてもますます重要な疾患モデル動物になるものと考えられた。

ノイロトロピンは、RMN における失調歩行を軽度に改善するとともに、培養小脳顆粒細胞の細胞死を抑制した。RMN に対する改善機序は、現段階では明確ではないが、今回の神経細胞死抑制作用がその作用機序の一つである可能性が示唆された。この細胞死制御機構はさらに詳細な検討が必要であるが、予備検討としてグルタミン酸誘発小脳細胞死にも保護作用を示す可能性もあることから、細胞死での共通経路であるアポトーシスを經由した、いずれかのステップに作用している可能性が考えられた。さらに、これまでの基礎実験において、ノイロトロピンは PC12 細胞において神経突起伸長促進作用を示すことから、神経栄養因子を介した何らかの神経賦活化作用を有している可能性も考えられる。このような *in vitro* での一連の神経細胞を用いた検討により、ノイロトロピンはある種の細胞脆弱化反応に対して、生体防御能を亢進させる効果が期待できる。

一方、TRH-TはRMNにおける失調歩行を一過性ではあるが、顕著に改善した。TRH-Tの失調歩行改善作用機序として、脳内ノルエピネフリン代謝亢進作用あるいは小脳および ventral tegmental area (VTA) の local cerebral glucose utilization 促進作用を介した機能の活性化が報告されている。ノイロトロピンのこれらの作用については今後の検討課題であるが、神経細胞死抑制作用がノイロトロピンのRMNにおける歩行障害改善作用に関与している可能性が示唆される。従って、ノイロトロピンとTRH-Tとは作用動態が異なるものと考えられる。

5. 結 論

平成11年度と同様に、種々の試験に用いる脊髄小脳変性症(SCD)モデルマウスであるRMNの効率的生産と供給体制を確立した。また、RMNにおいてカルシウムイオンチャネル $\alpha 1A$ サブユニットの遺伝子クローニングを実施した結果、遺伝性の脊髄小脳変性症の一つとして知られているEA2と共通の特有の塩基配列の変異を見出した。

次に、RMNを用いてノイロトロピンの4週間連日経口投与による失調歩行に対する効果を検討し、軽度の改善効果を認めた。また、小脳顆粒細胞の初代培養系においてアポトーシスによる低カリウム誘発細胞死を抑制したことから、神経細胞死抑制作用がその作用機序の一つである可能性が示唆された。一方、比較対照薬として用いた酒石酸プロチレリンは一過性ではあるが、RMNの失調歩行に対して顕著な改善作用を示した。

さらに、途中経過ではあるが、RMNと正常マウスでの小脳顆粒細胞のアポトーシスを生後成長期において比較すると、RMNに多くのアポトーシスがみられた。なお、ノイロトロピンの効果については測定した例数がまだ少なく、評価できる段階に至っていない。

以上、RMNに対する効力検討及び作用機序解明を目的とした培養小脳顆粒細胞を用いた研究により、ノイロトロピンの脊髄小脳変性症への臨床応用の可能性が示唆された。今後も、神経変性疾患に注目して研究を継続したい。

6. 研究発表

該当なし。

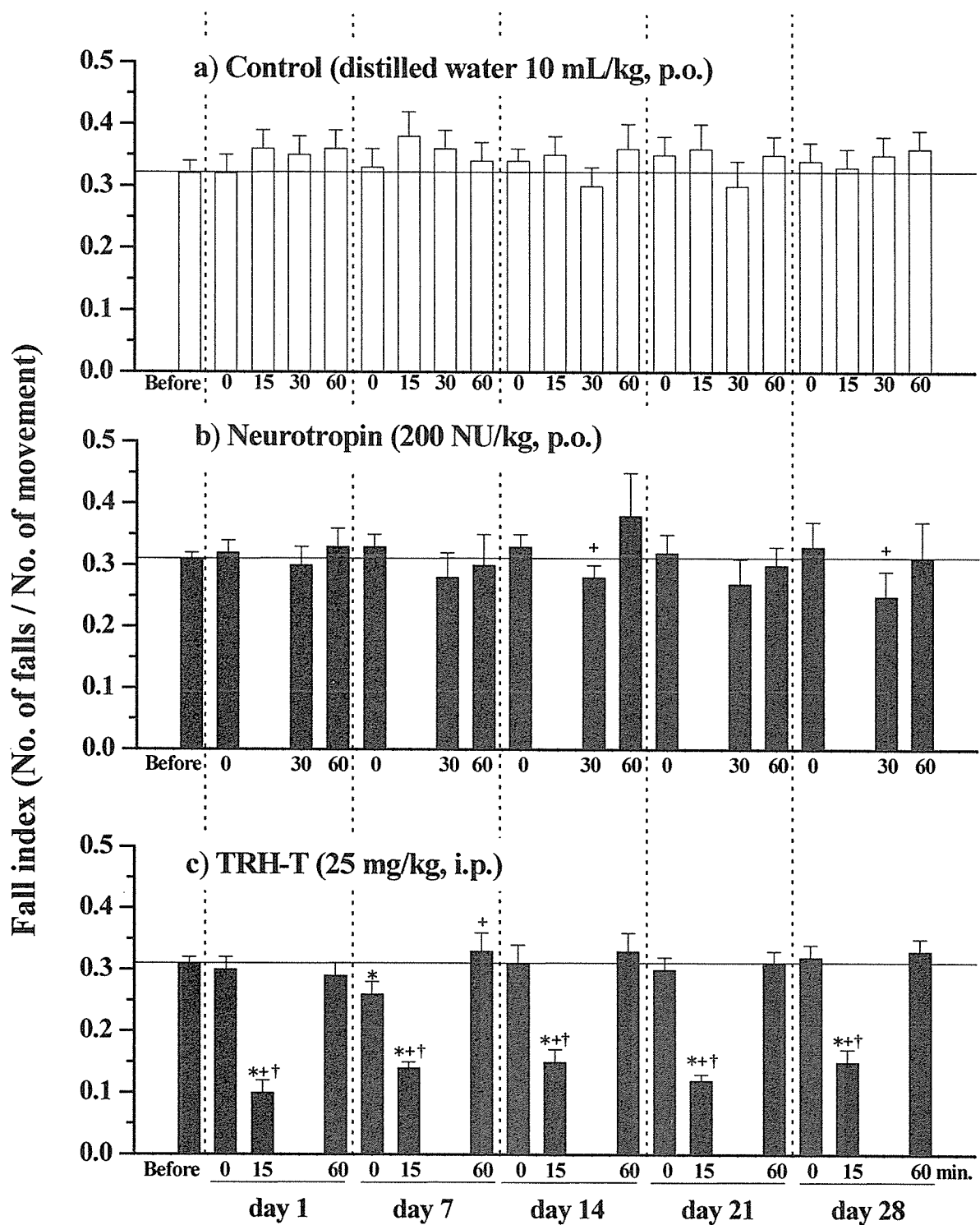


Fig.1 Effects of oral administration of Neurotropin and TRH-T (i.p.) on ataxic gait in Rolling mouse Nagoya

Data are shown as mean ± S.E. (n=10).

*: P<0.05 vs. before the administration (paired t test).

+: P<0.05 vs. 0 min. (paired t test).

†: P<0.05 between Control and TRH-T group (unpaired t test).

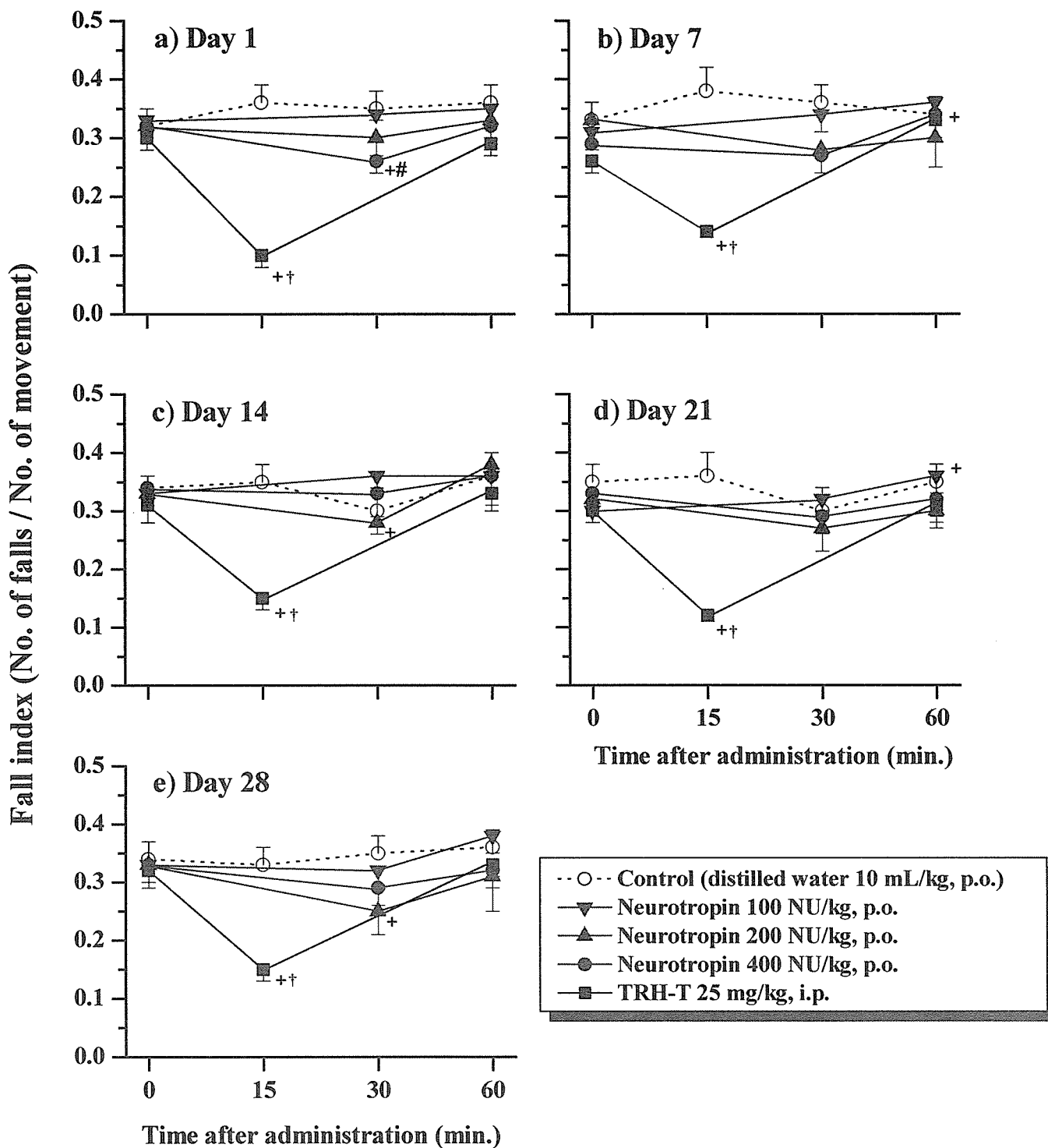


Fig.2 Time course changes in fall index after oral administration of Neurotropin and TRH-T(i.p.) in Rolling mouse Nagoya

Data are shown as mean \pm S.E. (n=10).

†: P<0.05 vs. 0 min. (paired t test).

#: P<0.05 vs. control group (Dunnett's multiple comparison test).

††: P<0.05 between control and TRH-T group (unpaired t test).

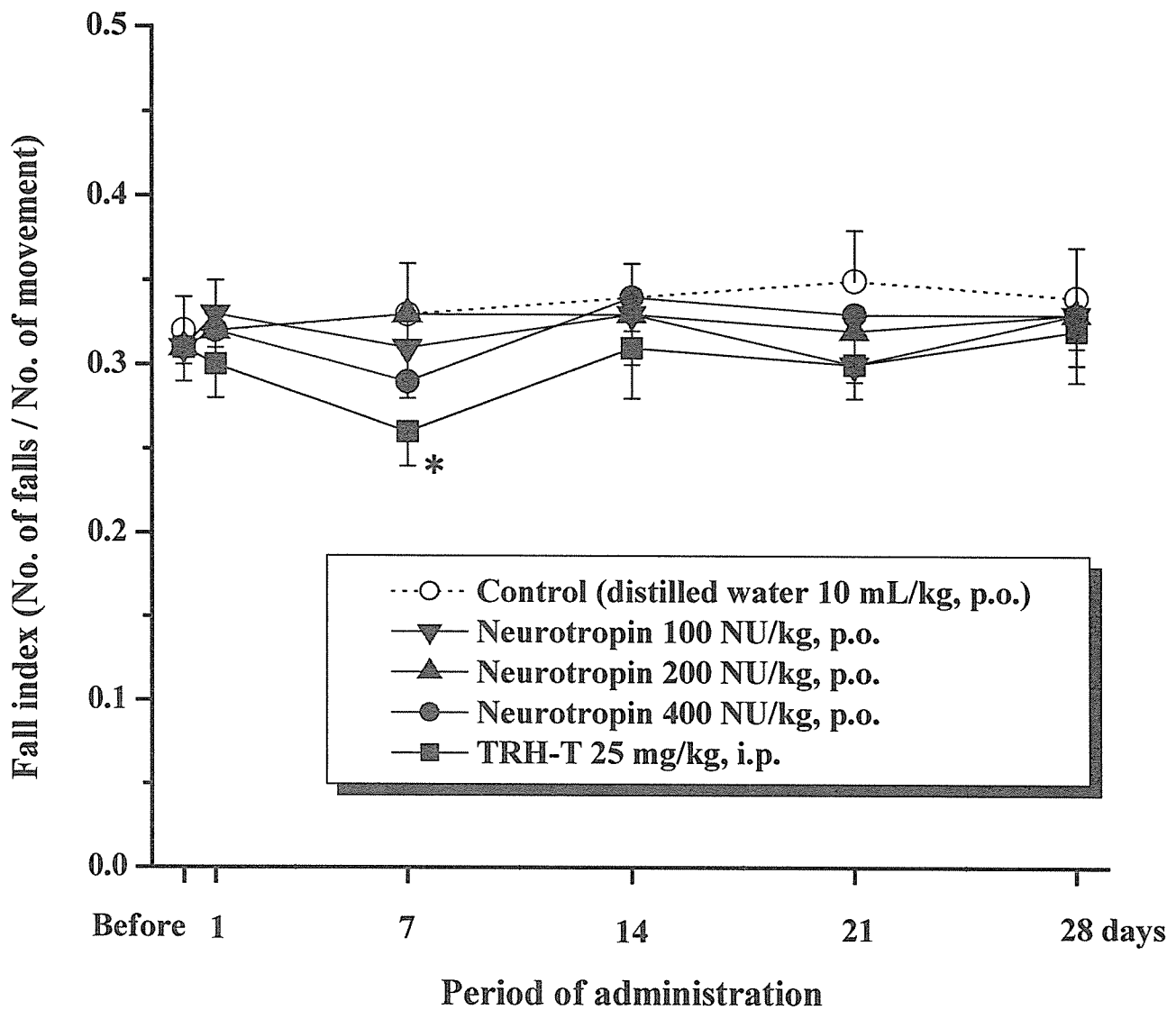


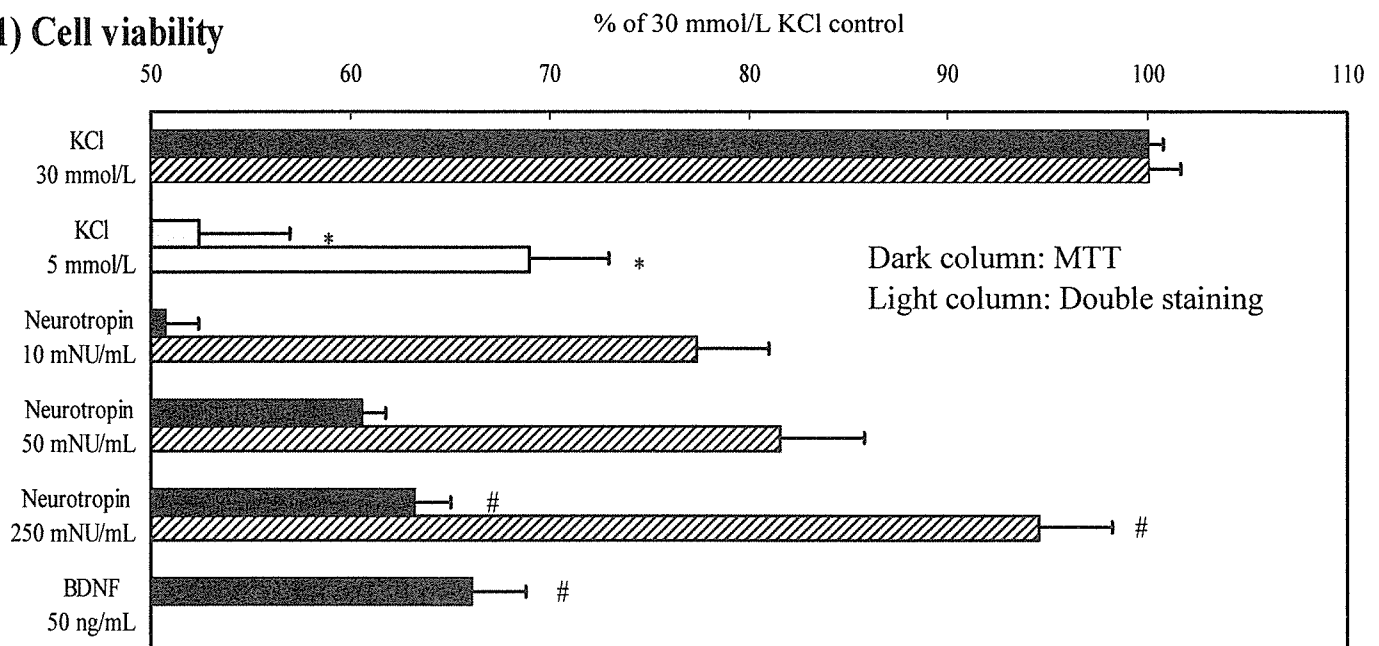
Fig.3 Influence of continuous administration of Neurotropin (p.o.) and TRH-T (i.p.) on ataxic gait in Rolling mouse Nagoya

Data are shown as mean \pm S.E. (n=10).

*: $P < 0.05$ vs. before the administration (paired t test).

Neurotropin or TRH-T treated groups showed no difference compared to control (Dunnett's multiple comparison or unpaired t test).

1) Cell viability



2) Apoptosis

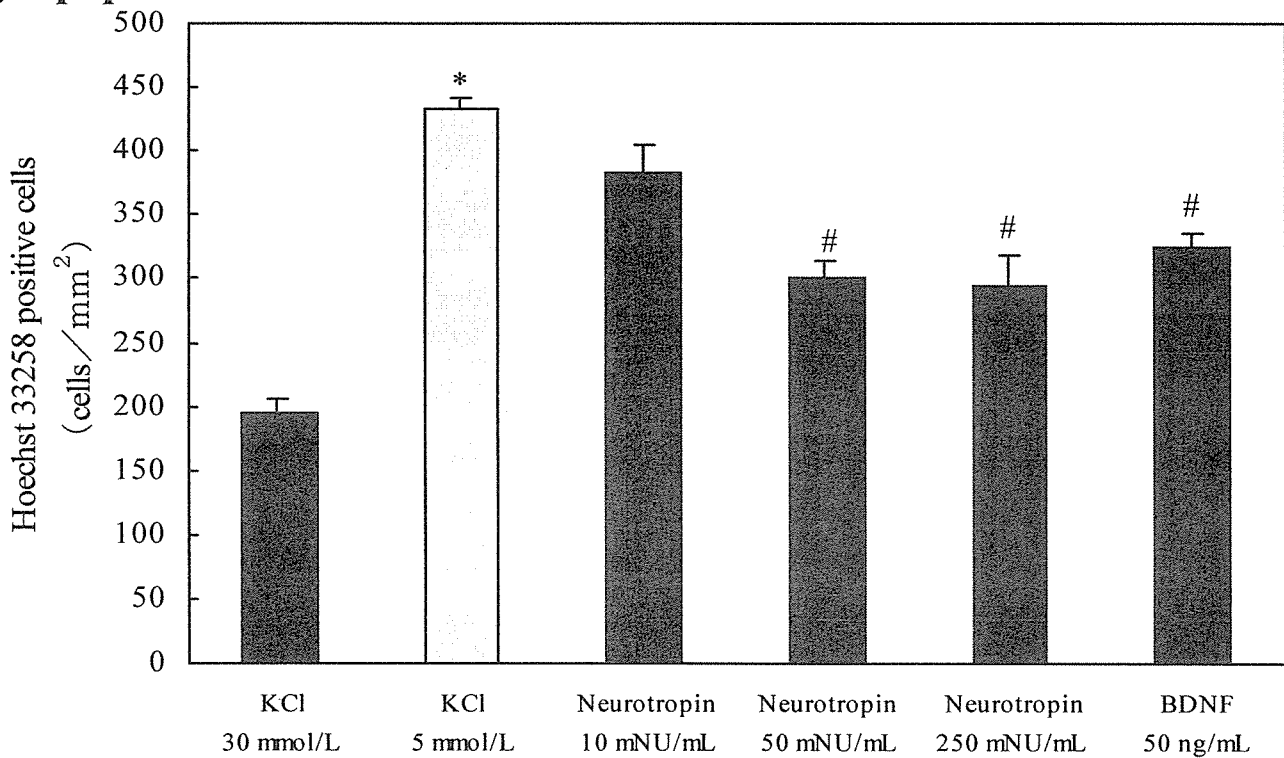


Fig. 4 Effects of Neurotropin on low potassium-induced cell death of rat primary cultured cerebellar neurons

Data are shown as mean \pm S.E.

* : $P < 0.05$ vs. 30mmol/L KCl (paired t test).

: $P < 0.05$ vs. 5mmol/L KCl (Dunnett's multiple comparison test).

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第4分野

稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社