

氏名	いわしたあきのり 岩下明令
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	論薬博第723号
学位授与の日付	平成17年1月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	選択的 poly (ADP-ribose) polymerase 阻害薬の中枢神経保護作用に関する薬理学的研究
論文調査委員	(主査) 教授 赤池昭紀 教授 金子周司 教授 佐治英郎

論文内容の要旨

脳梗塞やパーキンソン病等の神経変性疾患に伴うニューロン死には、ラジカルストレスが関与することが指摘されてきている。ラジカルストレスにより DNA が損傷されると、その修復過程の一つとして核内酵素である poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) が活性化されるが、過剰な PARP 活性化は基質である nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) の過剰消費によるエネルギー欠乏から細胞死を惹起する。グルタミン酸神経毒性やパーキンソン病モデル動物において、PARP 活性化がニューロン死の要因として働くことが示唆されてきたが、特異的な PARP 阻害薬が見出されていなかったことから、脳虚血やドパミン神経毒により惹起されるニューロン死での PARP の役割については不明な点が多かった。そこで著者は選択的な PARP 阻害薬を探索し、脳虚血障害およびドパミン神経毒誘発ニューロン死における PARP 活性化の関与と選択的 PARP 阻害薬の保護効果を明らかにする目的で薬理学的研究を行い、以下の新知見を得た。

第一章 選択的 PARP 阻害薬の探索と in vitro 細胞保護作用の解析

著者が研究を着手した時点では、PARP を選択的に阻害する化合物は見出されていなかったことから、PARP に選択的で且つ強力な阻害活性を示す薬物の創出を目指し、ヒト組み替え PARP を用いた poly (ADP-ribose) polymer アッセイ系を確立した。このアッセイ系を用いて化合物ライブラリーを探索し、その中から得られたプロトタイプを基に、新規ギナゾリノ誘導体である FR247304 (5-chloro-2-[3-(4-phenyl-3,6-dihydro-1(2H)-pyridinyl)propyl]-4(3H)-quinazolinone, IC₅₀=65 nM) および FR255595 (2-[3-[4-(4-chlorophenyl)-1-piperazinyl]propyl]-4(3H)-quinazolinone, IC₅₀=11 nM) を見出した。さらに骨格の異なる新規キノキサリン誘導体である FR261529(2-(4-chlorophenyl)-5-quinoxalinecarboxamide, IC₅₀=33 nM) を見出した。これらの3化合物は、PC12細胞を用いた過酸化水素誘発の細胞死モデルにおいて濃度依存性に細胞死を抑制したことから、PARP 阻害活性に依存した保護作用を発現することが明らかとなった。以上の結果より、新規に見出された3つの選択的 PARP 阻害薬は、何れも PARP 阻害活性によりラジカルストレス誘発細胞死を抑制することが示された。

第二章 脳虚血モデルにおける選択的 PARP 阻害薬の保護作用

一過性脳虚血により誘発されるニューロン死における PARP 活性化の役割と PARP 阻害薬の作用を明らかにする目的で、ラット中大脳動脈虚血再灌流モデルを用いた研究を行った。PARP 活性化は抗 poly (ADP-ribose) 抗体を用いた免疫組織染色および NAD 定量法により検討した。その結果、正常の大脳皮質および線条体においては poly (ADP-ribose) 陽性細胞は観察されず、虚血再灌流により再灌流1時間後から陽性細胞が観察されるようになり、その数は6時間後に最大となり、15時間後にはほぼ消失した。脳内 NAD 量も虚血再灌流により著明に減少した。月商虚血により PARP 過剰活性化が生じることが示唆されたことから、新規選択的 PARP 阻害薬である FR247304 の作用を検討した。その結果、FR247304 の腹腔内投与は用量依存性に脳梗塞巣を縮小した。さらに FR247304 は脳虚血により誘発される poly (ADP-ribose) polymer 産生を抑制すると共に NAD 量の減少も抑制した。以上の結果より、脳虚血により誘発されるニューロン死には PARP 活性化に伴うエネルギー枯渇が関与し、選択的 PARP 阻害薬は虚血性ニューロン死に対する保護作用を発現することが示唆さ

れた。

第三章 中脳ドパミンニューロン死に対する選択的 PARP 阻害薬の保護作用

代表的な難治性神経疾患の一つであるパーキンソン病は、中脳黒質ドパミンニューロンの変性・脱落を特徴とする。パーキンソン病動物モデルに汎用される MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) は中脳ドパミンニューロンを特異的に変性するが、PARP ノックアウトマウスでは MPTP 神経毒性が軽減されることから、MPTP 神経毒性における PARP の関与が指摘されてきた。そこで、経口吸収性に優れた FR295595 に着目して、PARP 阻害薬の MPTP 誘発ドパミンニューロン死モデルでの作用を検討した。線条体ドパミン含量とドパミントランスポーター量の低下をドパミンニューロン死の指標として検討した結果、FR255595 の経口投与は用量依存性に MPTP 神経毒性を抑制することが明らかとなった。一方、FR255595 はモノアミン酸化酵素 B 型 (MAO-B) およびドパミントランスポーターに対する阻害作用を示さず、ラジカル消去作用も示さなかった。ついで、高用量のメタンフェタミンにより誘発されるドパミンニューロン死に対する FR255595 および骨格の異なる FR261529 の作用を検討した。高用量のメタンフェタミンをマウスに投与することにより線条体ドパミン含量は減少し、FR255595 の経口投与は用量依存性に抑制した。さらに、メタンフェタミン神経毒性に対する作用の詳細について FR261529 を用いて検討した結果、FR261529 はメタンフェタミンによる線条体ドパミン含量およびドパミントランスポーター量の減少を抑制し、中脳黒質における PARP 活性化を抑制した。以上の結果より、選択的 PARP 阻害薬は MPTP およびメタンフェタミンで誘発されるドパミンニューロン死に対して保護作用を発現することが示された。

以上、著者は、選択的 PARP 阻害薬がラジカル誘発細胞死に対する抑制作用を発現し、一過性脳虚血およびドパミン神経毒により誘発される障害に対して保護作用を示すことを見出した。本研究の成果は神経変性疾患におけるニューロン死のメカニズムの解明において有用な知見となると共に、神経変性疾患治療薬の開発において重要な基礎的資料を提供するものである。

論文審査の結果の要旨

ラジカルストレスにより DNA が損傷されると、その修復過程の一つとして核内酵素である poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) が活性化されるが、過剰な PARP 活性化は基質である nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) の過剰消費によるエネルギー欠乏から細胞死を惹起する。近年、PARP 活性化がニューロン死の要因として働くことが示唆されてきたが、特異的な PARP 阻害薬が見出されていなかったことから、脳虚血やドパミン神経毒により惹起されるニューロン死における PARP の役割については不明な点が多かった。そこで、申請者は、選択的な PARP 阻害薬を探索し、脳虚血障害およびドパミン神経毒誘発ニューロン死における PARP 活性化の関与と選択的 PARP 阻害薬の保護効果を明らかにする目的で薬理学的研究を行った。

第一章 選択的 PARP 阻害薬の探索と *in vitro* 細胞保護作用の解析

PARP に選択的で且つ強力な阻害活性を示す薬物の創出を目的として、ヒト組み替斉 PARP を用いた poly (ADP-ribose) polymer アッセイ系を確立し、化合物シイブラリーから得られたプロトタイプを基に、新規キノゾリノン誘導体である FR247304 (5-chloro-2-[3-(4-phenyl-3,6-dihydro-1(2H)-pyridinyl)propyl]-4(3H)-quinazolinon) および FR255595 (2-[3-[4-(4-chlorophenyl)-1-piperazinyl]propyl]-4(3H)-quinazolinone), さらに新規キノキサリン誘導体である FR261529 (2-(4-chlorophenyl)-5-quinoxalinecarbolxamide) を見出した。これらの化合物は、PC12 細胞を用いた過酸化水素誘発の細胞死モデルにおいて濃度依存性に細胞死を抑制し、PARP 阻害活性に依存した保護作用を発現することが明らかとなった。

第二章 脳虚血モデルにおける選択的 PARP 阻害薬の保護作用

一過性脳虚血により誘発されるニューロン死における PARP 活性化の役割と PARP 阻害薬の作用を明らかにする目的で、ラット中大脳動脈虚血再灌流モデルを用いた研究を行った。その結果、正常の大脳皮質および線条体においては poly (ADP-ribose) 陽性細胞は観察されず、虚血再灌流により再灌流後に陽性細胞が観察されるようになり、6 時間を最大として次第に消失した。脳内 NAD 量も虚血再灌流により著明に減少した。脳虚血により PARP 過剰活性化が生じることが示唆されたことから、新規選択的 PARP 阻害薬である FR247304 の作用を検討した。その結果、FR247304 の腹腔内投与は用

量依存性に脳梗塞巣を縮小した。さらに FR247304 は脳虚血により誘発される poly (ADP-ribose) polymer 産生を抑制すると共に NAD 量の減少も抑制した。以上の結果より、脳虚血により誘発されるニューロン死には PARP 活性化に伴うエネルギー枯渇が関与し、選択的 PARP 阻害薬は虚血性ニューロン死に対する保護作用を発現することが示唆された。

第三章 中脳ドパミンニューロン系に対する選択的 PARP 阻害薬の保護作用

PARP 阻害薬の MPTP 誘発ドパミンニューロン死モデルでの作用を明らかにする目的で、線条体ドパミン含量とドパミントランスポーター量の低下をドパミンニューロン死の指標として検討した。その結果、FR255595 の経口投与は用量依存性に MPTP 神経毒性を抑制することが明らかとなった。ついで、高用量のメタンフェタミンにより誘発されるドパミンニューロン死に対する FR255595 および骨格の異なる FR261529 の作用を検討し、両薬物が高用量のメタンフェタミンをマウスに投与による線条体ドパミン含量減少を抑制すること、さらに、FR261529 がメタンフェタミンによる線条体ドパミン含量およびドパミントランスポーター量の減少を抑制し、中脳黒質における PARP 活性化を抑制することを明らかにした。以上の結果より、選択的 PARP 阻害薬は MPTP およびメタンフェタミンで誘発されるドパミンニューロン死に対して保後作用を発現することが示された。

以上、申請者は、選択的 PARP 阻害薬がラジカル誘発細胞死に対する抑制作用を現し、一過性脳虚血およびドパミン神経毒により誘発される障害に対して保護作用を示すことを明らかにした。本研究の成果は神経変性疾患におけるニューロン死のメカニズムの解明において有用な知見となるとともに、神経変性疾患治療薬の開発において重要な基礎的資料を提供するものである。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものとして認める。

更に、平成16年11月16日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。