

氏 名	まえもと たくや 前 本 琢 也
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	論 薬 博 第 726 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	新規ピラゾロピリジン系拮抗薬を用いた脳内アデノシン A ₁ 受容体の生理機能に関する薬理学的研究
論文調査委員	(主 査) 教 授 金 子 周 司 教 授 赤 池 昭 紀 教 授 辻 本 豪 三

論 文 内 容 の 要 旨

アデノシンは DNA や ATP などの生体材料であるほか、神経細胞のシナプスに存在する膜 7 回貫通型受容体を介して神経伝達物質の遊離を調節する神経調節因子でもある。アデノシン受容体には A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃ の 4 つのサブタイプが知られているが、そのうち A₁ は G_i タンパクと共役し、脳内に広く分布してグルタミン酸やアセチルコリンの放出を抑制することから記憶学習や精神症状に関与している可能性が提唱されている。本研究では、脳内におけるアデノシン A₁ 受容体の機能を明らかにするため新規ピラゾロピリジン系拮抗薬を用いた薬効評価を行い、以下に述べる新知見を得た。

第 1 章 新規ピラゾロピリジン系 A₁ 受容体拮抗薬の *in vitro* での薬理評価

アデノシン A₁ 受容体には DPCPX (1,3-dipropyl-8-cyclopentylxanthine) などのキサンチン系拮抗薬が知られているが、^[3H]DPCPX 結合を指標にマウス、ラット、モルモットと比較しながらヒト脳 A₁ 受容体に対する親和性を調べたところ、ヒトに対してはマウス、ラットに比べて 10 分の 1 程度の親和性しか示さないことを見いだした。また、Gpp(NH)p(5'-guanylylimidodiphosphate) 等を用いて受容体の G タンパク共役状態を変化させたとき、キサンチン系拮抗薬は親和性が大きく影響された。

そこで、これらとは全く構造の異なるピラゾロピリジン関連物質の中からアデノシン A₁ 受容体に特異的な拮抗薬を新たに探索したところ、FK453 (2-[(2*R*)-1-[(2*E*)-3-(2-phenylpyrazolo[1,5-*a*]pyridin-3-yl)-2-propenoyl]-2-piperidinyl]ethanol), FK838 (4-[6-oxo-3-(2-phenylpyrazolo[1,5-*a*]pyridin-3-yl)-1(6*H*)-pyridazinyl]butanoic acid), FK352 ([[(2*R*)-1-[(2*E*)-3-(2-phenylpyrazolo[1,5-*a*]pyridin-3-yl)-2-propenoyl]-2-piperidinyl]acetic acid) を見いだした。^[3H]DPCPX 結合実験でこれら化合物はヒト脳 A₁ 受容体に対しそれぞれ 0.49 nM, 12 nM, 30 nM の K_i 値を示した。この親和性は齧歯類を用いた場合でもほとんど変わらず、大きな種差が認められるキサンチン系拮抗薬とは異なる部位に結合することが示唆された。また、^[35S]GTPγS (guanosine 5'-(γ-thio)triphosphate) を用いた結合実験では、これら 3 化合物が機能的にも拮抗作用を持つことも確認された。

第 2 章 新規ピラゾロピリジン系 A₁ 受容体拮抗薬の *in vivo* での薬理評価

ラットにアデノシン A₁ 受容体作用薬である CPA (N⁶-cyclopentyladenosine) を腹腔内投与すると用量依存的に自発運動量の低下が観察された。FK453 や FK352 は単独では自発運動量に影響しなかったが、CPA (0.064 mg/kg) による自発運動量低下をそれぞれ ID₅₀ 値 0.064 mg/kg および 0.012 mg/kg で抑制した。脳内移行性が確認されている DPCPX などのキサンチン系拮抗薬でも同様の抑制が見られたが、移行性の低い薬物では抑制されなかった。また、薬物投与後のラット脳を用いた ^[3H]DPCPX 結合競合実験によって各薬物の脳内濃度を求めたところ、自発運動量の変化を起こす濃度は *in vitro* で求められた各薬物の A₁ 受容体親和性とよく一致していた。以上より、A₁ 作用薬による自発運動量の低下は脳内 A₁ 受容体を介したものであり、この実験系は中枢性 A₁ 受容体拮抗薬の *in vivo* 機能評価系として使えることが示された。

第 3 章 ピラゾロピリジン系 A₁ 受容体拮抗薬 FR194921 を用いた A₁ 受容体の生理機能の検討

経口吸収性を高め体内動態を向上させたピラゾロピリジン系化合物 FR194921 (2-(1-methyl-4-piperidinyl)-6-(2-

phenylpyrazolo[1,5-*a*]pyridin-3-yl)-3(2*H*)-pyridazinone) はヒト A₁ 受容体に対して 2.9 nM という K_i 値を示し、A_{2A}、A₃ 受容体に対しては 1 μM で全く結合しなかった。*In vivo* においてはラット経口投与で良好な脳移行性を示し、長い持続性も認められた。また、A₁ 受容体親和性に種差はほとんどなく、CPA による自発運動量低下を抑制することも確かめられた。

痴呆モデルであるラット受動回避反応試験では、スコポラミン (1 mg/kg) により誘発される記憶障害に対し FR194921 は 0.1 及び 0.32 mg/kg (i. p.) で有意な改善作用を示した。不安モデルのひとつである social interaction test において FR194921 は 3.2 mg/kg (p. o.) で自発運動量に影響することなく有意な抗不安作用を示し、高架式十字迷路試験でも 10 mg/kg (p. o.) で抗不安作用を発揮した。一方鬱病モデルであるラット強制水泳試験においては、FR194921 は何ら効果なかった。すなわち、A₁ 受容体拮抗薬 FR194921 はこれらの病態モデルにおいて抗痴呆作用および抗不安作用を示すが鬱状態には影響しないことが示された。

以上、本研究を通して著者は脳内アデノシン A₁ 受容体の機能を受容体レベルから個体レベルで解析する方法を構築するとともに、その手法を用いて薬物スクリーニングを行った結果、これまでのキサンチン系拮抗薬とは全く化学構造の異なる新規ピラゾロピリジン系拮抗薬 FR194921 を見だし、その薬効評価を通じて記憶障害や不安の発症といった脳内アデノシン A₁ 受容体の新しい生理機能を明らかにした。本研究の成果は、脳内アデノシン受容体のさらなる生理機能の解明や新たな脳疾患治療薬の創出に有益な情報を与えるものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

アデノシンは DNA や ATP などの生体材料であるほか、神経細胞のシナプスに存在する膜 7 回貫通型受容体を介して神経伝達物質の遊離を調節する神経調節因子でもある。アデノシン受容体には A₁、A_{2A}、A_{2B}、A₃ の 4 つのサブタイプが知られているが、そのうち A₁ は G_i タンパクと共役し、脳内に広く分布してグルタミン酸やアセチルコリンの放出を抑制することから記憶学習や精神症状に関与している可能性が提唱されている。そこで申請者は、脳内におけるアデノシン A₁ 受容体の機能を明らかにするため新規ピラゾロピリジン系拮抗薬を用いた薬効評価を行った。

第 1 章 新規ピラゾロピリジン系 A₁ 受容体拮抗薬の *in vitro* での薬理評価

DPCPX (1,3-dipropyl-8-cyclopentylxanthine) 結合を指標にマウス、ラット、モルモットと比較しながらヒト脳 A₁ 受容体に対する各種キサンチン系拮抗薬の親和性を調べ、ヒトに対してはマウス、ラットに比べて 10 分の 1 程度の親和性しか示さないことを見いだした。そこで、これらとは全く構造の異なるピラゾロピリジン関連物質の中からアデノシン A₁ 受容体に特異的な拮抗薬を新たに探索したところ、FK453 (2-[(2*R*)-1-[(2*E*)-3-(2-phenyl-pyrazolo[1,5-*a*]pyridin-3-yl)-2-propenoyl]-2-piperidinyl] ethanol), FK838 (4-[6-oxo-3-(2-phenylpyrazolo[1,5-*a*]pyridin-3-yl)-1(6*H*)-pyridazinyl] butanoic acid), FK352 ([(2*R*)-1-[(2*E*)-3-(2-phenylpyrazolo[1,5-*a*]pyridin-3-yl)-2-propenoyl]-2-piperidinyl] acetic acid) を見いだした。³H]DPCPX 結合実験でこれら化合物はヒト脳 A₁ 受容体に対しそれぞれ 0.49 nM, 12 nM, 30 nM の K_i 値を示した。この親和性は齧歯類を用いた場合でもほとんど変わらず、大きな種差が認められるキサンチン系拮抗薬とは異なる部位に結合することが示唆された。

第 2 章 新規ピラゾロピリジン系 A₁ 受容体拮抗薬の *in vivo* での薬理評価

ラットにアデノシン A₁ 受容体作用薬である CPA (N⁶-cyclopentyladenosine) を腹腔内投与すると用量依存的に自発運動量の低下が観察された。FK453 や FK352 は単独では自発運動量に影響しなかったが、CPA (0.064 mg/kg) による自発運動量低下をそれぞれ ID₅₀ 値 0.064 mg/kg および 0.012 mg/kg で抑制した。脳内移行性が確認されている DPCPX などのキサンチン系拮抗薬でも同様の抑制が見られたが、移行性の低い薬物では抑制されなかった。また、薬物投与後のラット脳を用いた ³H]DPCPX 結合競合実験によって各薬物の脳内濃度を求めたところ、自発運動量の変化を起こす濃度は *in vitro* で求められた各薬物の A₁ 受容体親和性とよく一致していた。以上より、A₁ 作用薬による自発運動量の低下は脳内 A₁ 受容体を介したものであり、この実験系は中枢性 A₁ 受容体拮抗薬の *in vivo* 機能評価系として使えることが示された。

第 3 章 ピラゾロピリジン系 A₁ 受容体拮抗薬 FR194921 を用いた A₁ 受容体の生理機能の検討

経口吸収性を高め体内動態を向上させたピラゾロピリジン系化合物 FR194921 (2-(1-methyl-4-piperidinyl)-6-(2-

phenylpyrazolo[1,5-*a*]pyridin-3-yl)-3(2*H*)-pyridazinone) はヒト A₁ 受容体に対して 2.9 nM という K_i 値を示し、A_{2A}、A₃ 受容体に対しては 1 μM で全く結合しなかった。*In vivo* においてはラット経口投与で良好な脳移行性を示し、長い持続性も認められた。また、A₁ 受容体親和性に種差はほとんどなく、CPA による自発運動量低下を抑制することも確かめられた。

痴呆モデルであるラット受動回避反応試験では、スコポラミン (1 mg/kg) により誘発される記憶障害に対し FR194921 は 0.1 及び 0.32 mg/kg (i. p.) で有意な改善作用を示した。不安モデルのひとつである social interaction test において FR194921 は 3.2 mg/kg (p. o.) で自発運動量に影響することなく有意な抗不安作用を示し、高架式十字迷路試験でも 10 mg/kg (p. o.) で抗不安作用を発揮した。一方鬱病モデルであるラット強制水泳試験においては、FR194921 は何ら効果がなかった。すなわち、A₁ 受容体拮抗薬 FR194921 はこれらの病態モデルにおいて抗痴呆作用および抗不安作用を示すが鬱状態には影響しないことが示された。

以上、申請者は脳内アデノシン A₁ 受容体の機能を受容体レベルから個体レベルで解析する方法を構築するとともに、その手法を用いて薬物スクリーニングを行った結果、これまでのキサンチン系拮抗薬とは全く化学構造の異なる新規ピラゾロピリジン系拮抗薬 FR194921 を見だし、その薬効評価を通じて記憶障害や不安の発症といった脳内アデノシン A₁ 受容体の新しい生理機能を明らかにした。本研究の成果は、脳内アデノシン受容体のさらなる生理機能の解明や新たな脳疾患治療薬の創出に有益な情報を与えるものと考えられる。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

更に、平成16年12月21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。