

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460204

研究課題名(和文)ドラッグリプロファイリングによる新規メカニズムを持つ抗パーキンソン病薬の開発

研究課題名(英文)Development of the antiparkinsonian drug with novel mechanism by drug-reprofiling.

研究代表者

田崎 嘉一 (TASAKI, YOSHIKAZU)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：60374807

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの私達の研究で、非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)のうちオキシカム系骨格構造を持つ薬剤だけが、Akt細胞生存シグナル保持という新規作用メカニズムで神経細胞死抑制作用を示し、meloxicamはin vivoパーキンソン病モデル動物での有効性を示している。しかし、他のオキシカム系NSAIDsについてはまだ検討しておらず、今回検討を行ったが、meloxicam以外の薬剤については、神経細胞死抑制作用を見出すことができなかった。また、そのメカニズムについても新知見が得られてきている。meloxicamは、新規のパーキンソン病進行抑制薬として期待できる。

研究成果の概要(英文)：Non-steroidal anti-inflammatory Drugs (NSAIDs) with oxicam structure have been reported to show neuroprotection via a novel mechanism which is to maintain cell-survival Akt signal in our research. Meloxicam, one of the oxicams, showed neuroprotection in a parkinsonian animal model. However, other oxicams had been investigated regarding antiparkinsonian effects. We examined other oxicams in the animal model. No drugs except meloxicam show neuroprotection. We obtained some new findings in relation to the mechanism of meloxicam for neuroprotection. Meloxicam is expected as a novel antiparkinsonian drug with disease-modifying effect.

研究分野：医療薬学・神経科学

キーワード：パーキンソン病治療薬 オキシカム系非ステロイド性抗炎症薬 メロキシカム 新規進行抑制薬 神経細胞死抑制

1. 研究開始当初の背景

(1) 概要

開始前までの研究で、非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)のうちオキシカム系に分類される meloxicam だけが、パーキンソン病関連 in vitro 培養神経細胞死モデルと in vivo パーキンソン病動物モデルの両モデルで有効性を示している。この神経細胞死抑制作用は、シクロオキシゲナーゼ (COX) 阻害作用ではなく、Akt 細胞生存シグナルの保持という新規作用メカニズムによることもわかっている。さらに、本研究は、既存医薬品の利用 (ドラッグリプロファイリング) を行うため、低コストでの開発と早い臨床応用が可能であると考えられた。

(2) 学術的背景

① パーキンソン病 (PD) 薬物治療では、ドパミン神経細胞死を抑制できる進行抑制薬の登場が切望されている。

パーキンソン病 (PD) 薬物療法の問題点は、L-dopa 製剤の長期使用により薬効が減弱し、安定した薬効が得られなくなって症状のコントロールが難しくなるということである。現在の薬物療法は、すべて対症療法であり、PD の進行を抑制することはできない。これまでも多くの PD 進行抑制薬が研究開発されてきているが、開発費がかかるなどの進行抑制薬開発の難しさのため、現在までに上市されたものはなく、PD 進行抑制薬の登場が強く望まれている (Koller and Tse, 2004; Meissner WG et al., 2011.)

② オキシカム系 NSAIDs は、新規メカニズム Phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) / Akt 経路の活性化低下を抑制して in vitro および in vivo 神経細胞死を抑制する。

一方、NSAIDs 中のオキシカム系骨格を有する数種の NSAIDs だけが、パーキンソン病関連神経毒である MPTP の毒性代謝物 MPP⁺ 誘発の細胞死系で、細胞死抑制作用を有することを我々の研究で見出した。その細胞死抑制作用は、NSAIDs の主作用であるシクロオキシゲナーゼ (COX) 阻害活性とは無関係であった。すなわち、他の強力な COX 阻害剤の indomethacin, ibuprofen および COX-2 選択的阻害剤の NS-398, CAY10404 は細胞死を抑制しなかったが、オキシカム系 NSAIDs の meloxicam, piroxicam, tenoxicam は、細胞死を抑制した。これらのオキシカム系 NSAIDs による細胞死抑制作用は、PI3K 阻害剤の LY294002 を共存させた場合、細胞死抑制作用が見られなくなり、PI3K 下流の Akt の活性化レベル (リン酸化 Akt) を検討したところ、meloxicam は、細胞死に伴う Akt 活性化低下を抑制することにより細胞死抑制作用を発揮していた。さらに、私たちの最新の研究により meloxicam は、MPTP を反復投与した PD モデルマウスにおいて、ドパミン神経細胞死のマーカー

である Tyrosine hydroxylase 量の減少を抑制することを報告し、治療薬としての可能性が高まった

③ パーキンソン病の病変部位である脳黒質ドパミン神経細胞では、Akt 活性化低下が起こっており、この低下がドパミン神経細胞死を引き起こしている。

Malagelada ら(2008)は、パーキンソン病患者の黒質神経細胞で Akt の活性化(リン酸化)が低下していることを見出し、その低下が細胞死を引き起こしていることを報告した。また、Timmons ら(2009)も同様にリン酸化 Akt および Akt の減少を PD 患者で見出しており、Akt シグナリングの低下を阻害することが新規の神経細胞死抑制薬、すなわち PD 進行抑制薬になりうることを示唆している。以上の知見よりオキシカム系骨格を持つ医薬品は、パーキンソン病の神経細胞死を抑制する進行抑制薬になる可能性が高いと考えられる。④ 既存医薬品において適応外の薬効を見出し、臨床応用するドラッグリプロファイリングは、臨床開発期間を短縮し開発費を下げることができる効果的な方法の一つである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、オキシカム系医薬品に見出された新規の神経細胞死抑制作用を検証し、パーキンソン病進行抑制薬として、薬効と動態の優れた臨床開発化合物を見出すことである。これまでに我々の研究で、非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)のうちオキシカム系に分類される meloxicam だけが、パーキンソン病関連 in vitro 培養神経細胞死モデルと in vivo パーキンソン病動物モデルの両モデルで有効性を示している。この神経細胞死抑制作用は、シクロオキシゲナーゼ (COX) 阻害作用ではなく、Akt 細胞生存シグナルの保持という新規作用メカニズムによることもわかっている。さらに、本研究は、既存医薬品の利用 (ドラッグリプロファイリング) を行うため、低コストでの開発と早い臨床応用が可能であると考えられる。

3. 研究の方法

(1) オキシカム系 NSAIDs の中で最も神経細胞死効果の強い薬剤を臨床開発化合物として見出す。

具体的には、in vitro 細胞培養系で神経細胞死抑制効果の見られているオキシカム系 NSAIDs の薬効を、in vivo 動物モデルで黒質神経細胞死抑制作用、PI3K/Akt シグナル活性化保持作用、パーキンソン様症状の改善作用で評価する。

細胞培養系としては、ヒト神経線維芽細胞である SH-SY5Y 細胞にパーキンソン病関連神経毒の MPTP の毒性代謝物である MPP⁺ を用い神経細胞死が抑制されるかを測定する。測定には、生細胞を見る WST-8 または、死細胞を見る LDH (lactate dehydrogenase) 漏出測定キットを使う。

また、パーキンソン病動物モデルとしては、マウス MPTP 反復投与モデルにおける、オキシカム系 NSAIDs の黒質線条体神経細胞死抑制作用、リン酸化 Akt 減少の抑制作用、行動異常改善作用を検証する。

マウスの MPTP 単回投与モデルにおいて、meloxicam が細胞死抑制作用を持つことは文献的にも報告されている (P. Teismann and B. Ferger, 2001) が、この単回投与の系では、炎症反応が主となる細胞死であり、本来のパーキンソン病で起こる神経細胞死の初期メカニズムとは異なっていると考えられている。一方、我々はより実際の病態に近い MPTP 反復投与モデルで初めて meloxicam が、行動異常改善とドパミン神経変性の抑制、Akt シグナルの活性維持を示していることを見出した (Tasaki et al., 2012)。この meloxicam のドパミン神経変性は、ドパミン神経のマーカーである Tyrosine hydroxylase のタンパク量をウエスタンブロットで定量しているが、より直接的な評価系としてモデルマウスの脳黒質神経組織切片を作製し、ドパミン神経細胞数の定量系を立ち上げる。さらに、本マウスモデルにおける行動異常に関しては、主に pole test にて薬効評価を行う。ま

(2) オキシカム系 NSAIDs の神経細胞死抑制作用メカニズムを明らかにする。

すなわち PI3K/Akt シグナル経路のどの分子に作用しているかについて、上流の候補分子を主に前述の in vitro SH-SY5Y 細胞系で検討する。また in vitro で可能性を見出した分子について、in vivo モデルでの検証を行う。

方法は、Western blot によってタンパク量あるいは、活性と相関するリン酸化タンパク量を測定し比較検討を行う。PI3K を活性化する TrkA 等にオキシカム系 NSAIDs が作用しているかを、Tyrosine kinase inhibitor の K-252a などを使いオキシカム系 NSAIDs の作用が抑制されるかを検討する。

4. 研究成果

(1) パーキンソン病動物モデルでの検討

これまでに動物モデルで黒質神経細胞死抑制作用、PI3K/Akt シグナル活性保持作用、パーキンソン様症状の改善作用が見られたものは meloxicam のみであった。そこで、in vitro の細胞培養系で細胞死抑制作用の見られたオキシカム系 NSAIDs である piroxicam および tenoxicam についてパーキンソン病動物モデルでの検討を行った。その結果、両化合物ともに上記の細胞死抑制作用やパーキンソン様症状改善作用は見られなかった。

組織切片の系は、パラフィン包埋法を立ち上げ、TH 染色が線条体および黒質で可能にはなったが、meloxicam の評価は検討中であり、引き続き検討している。

(2) 作用メカニズム解明

①Akt 下流シグナル mTOR の関与

meloxicam の細胞死抑制作用に Akt シグナルの保持が関与していることはわかっていたが、その下流シグナルについては不明であった。今回、Akt 下流の mTOR に注目し活性の変化が起こっているか否かについて検討を行った。培養神経線維芽細胞の SH-SY5Y 細胞に MPP⁺ を添加すると、Akt と共に mTOR の活性は低下し、meloxicam を共存させるとどちらの活性も MPP⁺ 非存在下と同様に保持された。また、MPP⁺ による細胞死を meloxicam は抑制するが、これに mTOR 阻害剤の rapamycin, everolimus を加えると meloxicam の神経細胞死抑制作用が阻害され、細胞死が再び起こるようになった。したがって、meloxicam の神経細胞死抑制作用は、Akt / mTOR を介して発現されるものであることが明らかとなった。

② Akt 上流シグナルの関与を検討

Akt より上流のシグナルである PI3k が関与していることがわかっていたので、さらに上流の候補シグナルである Trk A 受容体関与の検討を行った。Trk A 受容体から PI3k の伝達には、Trk A 受容体 tyrosine kinase 部分が関与しているが、その阻害剤の K252a を共存させて meloxicam の細胞死抑制作用がどのように変化するかを検討した。しかし、K252a には、単独でも細胞死誘発作用があり、明確な作用が見られなかった。Trk A siRNA を用いて Trk A をノックダウンして効果を検討したが、その効果は見られなかった。したがって Trk A の関与は低いと考えられた。

③ その他のシグナル分子の関与

細胞生存シグナル Bcl-2 および細胞死促進因子の BAD の検討を行ったが、meloxicam の作用を説明できる変化は起こっていなかった。一方、細胞生存シグナルである mcl-1, PKCdelta には関与が認められた。特に mcl-1 は、細胞死の直前に減少するが meloxicam により mcl-1 量の減少が抑えられた。

<引用文献>

- ① [Tasaki Y, Yamamoto J, Omura T, Sakaguchi T, Kimura N, Ohtaki K, Ono T, Suno M, Asari M, Ohkubo T, Noda T, Awaya T, Shimizu K, Matsubara K. Meloxicam ameliorates motor dysfunction and dopaminergic neurodegeneration by maintaining Akt-signaling in a mouse Parkinson's disease model, Neurosci Lett 521\(1\), 15-19, 2012](#)
- ② [Tasaki Y, Yamamoto J, Omura T, Noda T, Kamiyama N, Yoshida K, Satomi M, Sakaguchi T, Asari M, Ohkubo T, Shimizu K, Matsubara K. Oxycam structure in non-steroidal anti-inflammatory drugs is essential to exhibit Akt-mediated neuroprotection against 1-methyl-4-phenyl pyridinium-induced cytotoxicity. Eur J Pharmacol 676, 57-63, 2012.](#)
- ③ [Meissner WG et al., 2011. Priorities in Parkinson's disease research. Nat Rev Drug](#)

Discov. 10, 377-393.

- ④ Tasaki Y, Omura T, Yamada T, Ohkubo T, Suno M, Iida S, Sakaguchi T, Asari M, Shimizu K, Matsubara K. Meloxicam protects cell damage from 1-methyl-4-phenyl pyridinium toxicity via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells, *Brain Res* 1344, 25-33, 2010.
- ⑤ Takeuchi H et al., 2009. Nicotinic receptor stimulation protects nigral dopaminergic neurons in rotenone-induced Parkinson's disease models. *J Neurosci Res.* 87, 576-585.
- ⑥ Timmons S. et al., 2009. Akt signal transduction dysfunction in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 467, 30-35.
- ⑦ Malagelada C. et al., 2008. RTP801 is induced in Parkinson's disease and mediates neuron death by inhibiting Akt phosphorylation/Activation. *J. Neuroscience* 28, 14363-14371.
- ⑧ Koller and Tse, 2004. Unmet medical needs in Parkinson's disease. *Neurology* 62, S1-8.
- ⑨ P. Teismann and B. Ferger, 2001. Inhibition of the cyclooxygenase isoenzymes COX-1 and COX-2 provide neuroprotection in the MPTP-mouse model of Parkinson's disease. *Synapse* 39, 167-174.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計2件)

- ① 坂口智己, 小野尚志, 海東和麻, 山本譲, 神山直也, 高橋恭子, 栗屋敏雄, 福土将秀, 大江知之, 増野匡彦, 田崎嘉一、Cyclooxygenase (COX) 阻害作用を持たない meloxicam 類縁体も MPP⁺ 誘発 SH-SY5Y 神経細胞死を抑制する、日本薬学会年会、2015年3月25日-28日、神戸市
- ② Y. Tasaki, J. Yamamoto, T. Ohkubo, T. Noda, T. Omura, T. Ono, M. Suno, T. Sakaguchi, and K. Matsubara. Mammalian target of rapamycin (mTOR) mediates neuroprotection by oxicam nonsteroidal anti-inflammatory drugs against MPP⁺-induced SH-SY5Y cell death. Society for Neuroscience 2013、2013年11月9日-13日、San Diego (USA)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田崎 嘉一 (TASAKI, Yoshikazu)
旭川医科大学・医学部・教授
研究者番号：60374807

(2) 研究分担者

福土 将秀 (FUKUDO, Masahide)
旭川医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60437233

神山 直也 (Kamiyama, Naoya)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：20431398