

令和元年6月21日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08389

研究課題名(和文) 新規パーキンソン病進行抑制薬開発の非臨床POC試験

研究課題名(英文) Preclinical Proof-of-Concept research targeting development of novel neuroprotective drugs for Parkinson's disease.

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの私たちの研究でmeloxicamを含むオキシカム系NSAIDsが、新規メカニズムで細胞および動物のパーキンソン病モデルでドパミン神経細胞死抑制作用を見出している。本研究では、前臨床試験において薬効を判断する最も重要な評価系として動物の病態モデルにおける免疫組織学的な神経細胞死測定系を構築した。この系を用いてmeloxicamを評価したところ、パーキンソン病で傷害される脳黒質におけるドパミン神経細胞死の抑制が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、初めてパーキンソン病モデル動物において、パーキンソン病関連神経毒による黒質ドパミン神経細胞死をmeloxicamが抑制することが明らかとなった。現在のパーキンソン病薬物治療において、神経細胞死を抑制する薬剤は開発されておらず、対症療法薬が長期処方されることによる問題があり、パーキンソン病振興抑制薬の開発が望まれており、本成果はその要望に応えるものになると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In our previous studies, oxicam NSAIDs including meloxicam have been found to prevent dopaminergic neuronal death with a novel mechanism in the cell-based and animal models of Parkinson's disease. We constructed an immunohistological assay in the animal disease model as the most important evaluation system to judge the efficacy of the drug in preclinical studies. In this assay, meloxicam was confirmed to protect against dopaminergic neuronal death in the substantia nigra of the brain, usually damaged in Parkinson's disease.

研究分野：神経科学、医療薬学

キーワード：パーキンソン病 Akt 進行抑制薬 オキシカム系NSAIDs meloxicam

1. 研究開始当初の背景

研究開始当初の背景には以下の状況があった。

(1) パーキンソン病 (PD) 治療薬には、ドパミン神経細胞死を止める進行抑制薬の開発が必要であった。

現在の PD に対する薬剤は、すべて対症療法薬やそれに関連するものであり、ドパミン神経細胞死の進行を抑制できるものはない。しかも、治療薬の中心である L-dopa 製剤を長期に使用すると、薬効が減弱・不安定となり、症状のコントロールが難しくなり、臨床上の問題となっている。これまでにも多くの PD 進行抑制薬が研究されてきているが、その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。

(2) 私たちのそれ以前の研究において、オキシカム系 NSAIDs は、新規のメカニズムである Phosphatidyl inositol-3 kinase(PI3K)/Akt 経路の活性低下を抑制(保持)することで *in vitro* および *in vivo* ドパミン神経細胞変性を抑制することを見出していた。

NSAIDs 中のオキシカム系骨格を有する meloxicam, piroxicam, tenoxicam は、パーキンソン病関連ドパミン神経毒 MPP⁺誘発の培養神経細胞系で、細胞死の抑制作用を有することを我々の研究で見出していた。さらに、オキシカム系 NSAIDs の神経細胞死抑制作用は、NSAIDs の主作用である COX 阻害活性とは無関係であり (Tasaki et al., 論文 1,2)、PI3K 下流の Akt の活性化レベル (リン酸化 Akt 量) と相関していた。以上のことから、これらのオキシカム系 NSAIDs は、細胞死に先立って低下する PI3K/Akt 経路の活性を維持することで、神経細胞死を抑制するという新規のメカニズムであることが見い出された。さらに meloxicam は、MPTP (MPP⁺の前駆体) の毒性代謝物を反復投与した PD モデルマウスの行動異常を改善し、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た (Tasaki et al., 論文 3)。その後の研究で、オキシカム系薬剤の中で meloxicam は、臨床開発候補化合物として最初に POC 試験 (POC; コンセプト証明) を行うべきと考えられたこと。

(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 活性低下が起っており、この低下がドパミン神経細胞死を引き起こしているという報告があった。

Malagelada ら(2008)の報告によれば、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ポジショニングは、臨床開発期間を短縮し開発費を下げるができる効果的な方法の一つであること。

以上、冒頭で述べたように、パーキンソン病進行抑制薬はその早い臨床応用が切望されている。しかし、現在のところ有望な新薬の登場は見込めていない。また進行抑制薬の治療には時間がかかるため、開発が進まない状況にある。したがって、本研究のような既存医薬品より見出したドパミン神経細胞死抑制という新規薬理作用を臨床応用することが、一刻も早く患者に有効な治療薬を提供できる方法の一つと考えられた。

本研究の特色・独創的な点をまとめると、以下の通りである。

1. すでに市販されている薬剤を用いて適応外の臨床応用を目指すいわゆる「ドラッグリポジショニング」研究であり、毒性試験や Phase I 試験などの必要がなく、臨床開発費を低コストに抑えられ、早期の臨床応用が可能であること。

2. オキシカム系 NSAIDs の新規な機序によるドパミン神経細胞死抑制作用は、申請者ら独自の研究として発表しており、他に報告がないこと。

3. オキシカム系 NSAIDs が細胞死抑制作用を発揮する PI3K/Akt 活性保持は、近年の研究 (Malagelada et al., 2008, Timmons et al., 2009) でパーキンソン病患者においてドパミン神経細胞死を抑制する最も可能性のある機序の一つであることが言われており、本研究計画はその報告に合致したものであること。

これらの背景があることで、以下の研究に着手した。

<参考論文>

1. Tasaki Y et al., 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.
2. Tasaki Y et al., 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. Tasaki Y et al., Meloxicam ameliorates motor dysfunction and dopaminergic neurodegeneration by maintaining Akt-signaling in a mouse Parkinson's disease model. *Neurosci. Lett.* 521: 15-19, 2012.

2. 研究の目的

本研究の目的は、新規メカニズムによるオキシカム系医薬品の神経細胞死抑制作用を検証して前臨床 POC 試験とし、それによりパーキンソン病進行抑制薬としての臨床試験へ速やかにつなげることである。これまでの我々の研究で、非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) のうちオキシカム系骨格構造を持つものだけが、Akt 細胞生存シグナル保持という新規作用メカニズムで *in vitro* で神経細胞死抑制作用を示し、一部の薬剤は *in vivo* パーキンソン病モデルで有効性を示している。このオキシカム系医薬品のうち、現段階で臨床開発に最も近い薬剤は meloxicam であり、動物モデルでは、行動異常改善、ドパミン神経変性抑制を見出している。そこで本研究では、前臨床 POC 試験と位置づけられる免疫組織学的な神経細胞死抑制作用を明確に示す実験を行う。さらに本研究は既存医薬品から別の薬効を見出す (ドラッグリポジショニング) 研究であるため、早い臨床応用が可能であると考えられた。

3. 研究の方法

以下の検討を行った。

(1) 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 (特に、meloxicam について前臨床 POC 試験である免疫組織学的なドパミン神経細胞死検証実験)、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。 (*in vivo* PD モデルでの薬効確認とメカニズム検証)

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、申請者らはより実際の病態に近い MPTP 30mg/kg を 5 日間反復腹腔内投与するモデルで初めて meloxicam の薬効を見出した。具体的には、行動異常改善とドパミン神経変性の抑制、Akt シグナルの活性保持作用である。この時のドパミン神経変性を測定する実験は、ドパミン神経のマーカーである Tyrosine hydroxylase (TH) のタンパク量をウエスタンブロットで検出・定量しているが、より直接的で前臨床 POC 試験となる評価系として、モデルマウスの脳黒質神経細胞切片を作製し、ドパミン神経細胞数の定量を行い、確かに細胞死が抑制されていることを見出すことが重要である。この前臨床 POC 試験では、薬効が幅広く見られている meloxicam を優先して評価する。他のオキシカム系 NSAIDs についても検討を行う。さらにメカニズム検証の目的で、作製した切片をリン酸化 Akt や Akt の抗体でも染色を行い、ドパミン神経毒 MPTP による Akt 活性低下が、オキシカム系 NSAIDs によって抑制されることで細胞死から保護されていることを検証する。さらに、本マウスモデルにおける行動異常に関しては、これまでと同様、pole test にて薬効評価を行う。またロータロッド試験を使った評価方法も検討する。これは、回転する棒をマウスにつかまらせ徐々に回転を速くして、マウスが棒の上から落ちる時間を測定する系である。MPTP を投与する前に 3 回ほど 1 日おきに訓練を行ってから薬剤の投与を開始するものである。

(2) 薬効のあるオキシカム系 NSAIDs の脳内移行性を中心とした体内動態の検討
オキシカム系医薬品の開発過程において、脳内移行性は知られているが、モデル動物において十分な薬効が得られる濃度に達しているかなど詳細な検討はなされていない。本研究では、モデル動物でのオキシカム系 NSAIDs の脳内濃度、血中濃度を検討し、ヒトでの臨床試験 (First in human 試験) の際の投与量を決める基礎データを得る。

4. 研究成果

(1) 上記の MPTP 5 日間反復投与のパーキンソン病モデルマウスにおいて、オキシカム系医薬品を評価した。Meloxicam については、10 mg/kg を 1 日 1 回 15 日間投与した群は、行動薬理学的評価である Pole test で有意な改善を示し、脳の黒質および線条体の TH 量が MPTP 単独群に比べて改善していた。同様の方法でモデル動物を作製し、meloxicam の脳黒質ドパミン神経細胞死に対する薬効を確認するために、脳切片で TH 抗体による免疫組織学的な評価を行ったところ、meloxicam による顕著な細胞死抑制作用が見出された。これにより前臨床 POC 試験の構築が完了した。なおロータロッド試験では、MPTP 単独投与群において、棒の上での滞在時間が生理食塩水投与の群に比べて短くなったが、meloxicam では改善し、この系においても行動異常を改善することが明らかとなった。

次に上記と同じ系で Ampiroxicam を評価した。生化学的な TH 量、行動薬理学的な Pole test およびロータロッド試験、免疫組織学的な組織切片でも検討を行ったが、Pole test では効果が見出されたものの、それ以外のいずれの試験においても薬効は見出されず薬効は低いと考えられた。

(2) Meloxicam 10 mg/kg 腹腔内投与時における血漿中および脳内濃度を測定した。脳内濃

度は、1, 4, 8 時間後に測定したが、それぞれ 0.711, 0.261, 0.100 nmol/g であった。血漿中の濃度は高く脳内移行性は低いと考えられた。しかし、この脳内濃度で薬効が見られるため、今後の新規化合物の基準値になると考えられた。Meloxicam 10 mg/kg を経口投与した場合には、腹腔内投与の場合とほぼ同じ濃度であった。しかし Meloxicam を病態モデルに経口投与で反復投与した場合に、毒性が出て死亡例が多く別の副作用が出ていると考えられた。パーキンソン病治療薬を考えた場合に、経口投与で薬効を示す薬剤が必須であり、今後は経口投与で有効な薬剤を探索する必要があると考えられた。Meloxicam 以外のオキシカム系医薬品は、顕著な薬効が見出されなかった

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：二環式骨格を有する

発明者：田崎嘉一、増野匡彦、大江知之、高橋恭子、安田大輔

権利者：学校法人慶應義塾、国立大学法人旭川医科大学

種類：特許願

番号：Y 2 C - 0 6 8 0

出願年：2019

国内外の別：国内

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。