様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　３年　６月１１日現在

機関番号：１０１０７
研究種目：若手研究
研究期間：2018～2020
課題番号：１８Ｋ１４９７３

研究課題名（和文）アカデミア創薬を目指したメロキシカムのパーキンソン病進行抑制メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of mechanism the anti-parkinsonian drug of meloxicam with progression inhibition in academia

研究代表者
眞鍋　貴行（Manabe, Takayuki）

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：６０４６０６９８

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,200,000円

研究成果の概要（和文）：非ステロイド性抗炎症薬であるメロキシカムの新規作用である神経細胞死抑制作用の細胞内シグナル伝達メカニズムはPI3K/Aktが関与することはわかっていたが、その他については不明であった。本研究では、メロキシカムの神経細胞死抑制メカニズムの解明を試みた。その結果、メロキシカムの神経細胞死抑制に関与するタンパク質を同定した。本解明はパーキンソン病進行抑制薬の開発に貢献できると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義
現在、パーキンソン病の治療薬は対症療法薬で治療が行われており、病状の進行を抑制できず、臨床において病状進行を抑制する治療薬の開発が強く望まれている。本研究より、メロキシカムの神経細胞死抑制メカニズムを明らかにした。本成果は、今後のパーキンソン病治進行抑制薬開発に貢献できると考えている。

研究成果の概要（英文）：Intracellular signaling mechanism of meloxicam is found to involve Akt/PI3K molecules for inhibition of Parkinson's disease progression, but the other mechanisms are unknown. In this study, applicant attempted to elucidate the mechanism of action of meloxicam, and identified the proteins involved in the mechanism of action of meloxicam. This clarification has advanced the development of meloxicam as a novel drug for the inhibition of Parkinson's disease progression.

研究分野：医療薬学

キーワード：メロキシカム　パーキンソン病進行抑制薬　神経細胞死抑制　パーキンソン病　作用メカニズム

※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、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

現在、パーキンソン病の薬物治療は、主にレボドパを用いたドパミンの補充が行われているが、長期間の使用により、薬効の減弱、症状のコントロールが困難となり、臨床上問題となっている。現在、多くのパーキンソン病進行抑制薬の研究が行われているが、パーキンソン病の進行を抑制する医薬品は開発出来ていない。従って、パーキンソン病進行抑制薬、すなわち神経細胞死抑制薬の開発が強く求められている。我々のこれまでの研究より、オキシカム骨格を有する非ステロイド性抗炎症薬であるメロキシカムが新規作用機序をもち、神経細胞死を抑制することを *in vitro*, *in vivo* で明らかにしている。メロキシカムは *in vitro* でのパーキンソン病モデルであるドパミン神経毒である MPP^+誘導性の神経細胞死を抑制すること。さらに、メロキシカムが MPP^+によって引き起こされる Akt のリン酸化レベルの低下を抑制することを見出している。しかしながら、メロキシカムの細胞内シグナル経路の詳細は明らかになっていなかった。従って、メロキシカムの新規作用機序による神経細胞死抑制作用のメカニズムの解明は、パーキンソン病進行抑制薬の開発につながる、現在の医療ニーズに合致していると考えられる。

２．研究の目的

本研究はパーキンソン病進行抑制作用を有するメロキシカムの神経細胞死抑制作用の分子メカニズムを明らかにすることを目的に実施した。本研究の成果は、メロキシカムのパーキンソン病進行抑制薬へのドラッグリポジショニングに向けた基礎研究の前進及び、パーキンソン病進行抑制作用の新規メカニズムを明らかにすることとなり、パーキンソン病進行抑制薬としての様々なターゲット分子の候補の発見となる。

３．研究の方法

ヒト神経芽細胞 SH-SY5Y 細胞を用いて、ドパミン神経毒である MPP^+誘導性細胞死をメロキシカムが抑制する条件下(MPP^+ 5 mM, 18 h)で、様々な分子の阻害剤を用いて、メロキシカムによる MPP^+誘導性神経細胞死の抑制をキャンセルするものを探索した。その測定には生細胞を検出する WST-8 と死細胞を検出する LDH の漏出量を測定した。メロキシカムは MPP^+による Akt のリン酸化レベルの低下を抑制することで、神経細胞死を抑制することがわかっているため、Akt が関わるタンパク質について、そその阻害剤を用いて、スクリーニングを WST-8 assay 及び LDH leakage assay で行った。メロキシカムによる MPP^+誘導性神経細胞死の抑制をキャンセルした阻害剤については、さらに、メロキシカムによる Akt のリン酸化保持作用が抑制されるかどうかも検証した。その方法は、Western blot により、Akt 及びリン酸化 Akt のタンパク質量を測定し、その量を比較した。

siRNA によるノックダウン法を用いて、タンパク質 X をノックダウンする条件検討を行った。

４．研究成果

　メロキシカムによる MPP$^+$誘導性神経細胞死の抑制メカニズムを解明する。タンパク質 A に対する基本骨格が異なる 3 種類の阻害剤 X，Y，Z それぞれを用いて、メロキシカムの MPP$^+$誘導性神経細胞死の抑制作用がキャンセルされるか WST-8 法及び LDH 漏出法により測定した。その結果、WST-8 法及び LDH 漏出法ともに 3 種の阻害剤すべてで、メロキシカムの神経細胞死抑制作用が、阻害剤濃度依存的にキャンセルされた。さらに阻害剤 X，Y については western blot 法にてリン酸化 Akt 量を調べたところ、MPP$^+$処理により減少した Akt のリン酸化量はメロキシカム処理により回復した。さらに阻害剤の添加により、リン酸化 Akt 量は減少した。これらの結果より、メロキシカムの MPP$^+$誘導性神経細胞死の抑制作用には、タンパク質 A が関与していることが考えられた。　次に、タンパク質 A には複数のシグナル経路が存在するため、どの経路が、神経細胞死の抑制に関与しているか、明らかにするため、それぞれの経路に関与するタンパク質の阻害剤及び活性化剤を用いて調べた。その結果、タンパク質 B に対する阻害剤濃度依存的にメロキシカムの神経細胞抑制作用がキャンセルされた。さらに、Akt のリン酸化量についても同様の結果が得られた。同手法を用いてタンパク質 B の下流タンパク質 Z についても検討したとこと、タンパク質 Z の阻害剤により、メロキシカムの神経細胞死の抑制がキャンセルされ、Akt のリン酸化量が減少した。また、タンパク質 A には内因性リガンドが存在するため、その内因性リガンドを用いて、MPP$^+$誘導性神経細胞死が抑制されるか検討したが、内因性リガンドでは、抑制されなかった。さらにメロキシカムの作用が内因性リガンドによって競合的に阻害されるか WST-8 法で検討したが、メロキシカムの神経細胞死抑制作用は阻害されなかった。従って、メロキシカムはタンパク質 A に対して、バイアス型リガンドとして働いている可能性が示唆された。一方、タンパク質 A に対して、siRNA によるノックダウン法の検討を行った。しかしながら、神経芽細胞である SH-SY5Y 細胞のノックダウン効率が低いことやタンパク質 A の半減期が長いことが示唆され、十分なノックダウン条件が決定出来ておらず、現在も条件検討を継続している。

本研究の結果より、メロキシカムの MPP+誘導性神経細胞死の抑制作用にはタンパク質 A が関与しており、その下流のタンパク質 B 及び C に刺激が伝わり Akt のリン酸化の保持につながり、神経細胞死を抑制していると考えられた。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計1件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 眞鍋　貴行
２．発表標題 メロキシカムのMPP+誘導性神経細胞死抑制に関与する分子の探索
３．学会等名 薬学会年会
４．発表年 2020年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

－

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考

７．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関