

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月16日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590129

研究課題名（和文） 新規の抗パーキンソン病作用を有するオキシカム系骨格医薬品の開発

研究課題名（英文） Development of oxicam-bearing non-steroidal anti-inflammatory drugs with novel anti-parkinsonian mechanism.

研究代表者

田崎 嘉一（TASAKI YOSHIKAZU）

旭川医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60374807

研究成果の概要（和文）：本研究において、メロキシカム、ピロキシカム、テノキシカムの3個のオキシカム系 NSAIDs が、SH-SY5Y 神経線維芽細胞に対する MPP⁺誘発毒性に対し、PI3K/Akt シグナル経路の維持という新規のメカニズムで神経保護作用を持つことを見出した。他の骨格の NSAIDs は、同じ系で神経保護作用を示さなかった。パーキンソン病モデルマウスの慢性パーキンソン病モデルでは、メロキシカムが Akt シグナルを維持することにより運動障害とドパミン神経変性を改善した。以上より、メロキシカムは、パーキンソン病原因療法薬としての候補薬剤になると思われる。

研究成果の概要（英文）：In this study, three oxicam-bearing non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), such as meloxicam, piroxicam and tenoxicam, were identified to have novel neuroprotective mechanism of maintaining phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt signaling against MPP⁺-induced toxicity using neuroblastoma SH-SY5Y cells. The other types of NSAIDs did not show neuroprotection in the same assays. In a chronic mouse model of Parkinson's disease, meloxicam ameliorated motor dysfunction and dopaminergic neurodegeneration by maintaining Akt-signaling. These results suggest that meloxicam would be a candidate agent as a disease-modifying drug for Parkinson's disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医療系薬学

キーワード：臨床薬学, パーキンソン病進行抑制薬

1. 研究開始当初の背景

- (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。PD 薬物療法の問題点は、治療が L-dopa 製剤を中心としたドパミンアゴニスト作用に基づく

ものが主体のため、長期にわたると徐々に薬効が減弱した上に、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。これらドパミン補充療法は、あくまでも対症療法であり、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。

(2) meloxicam 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することで神経細胞死を抑制する。

一方、われわれは、数種の非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) の中からオキシカム系骨格を有する meloxicam が、神経細胞死を抑制することを *in vitro* SH-SY5Y 細胞系で見出し、その細胞死抑制作用が、meloxicam 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ることを見出した。すなわち、SH-SY5Y 細胞を用い、パーキンソン病誘発神経毒である MPTP の毒性代謝物 MPP⁺ を用いた細胞死系で、meloxicam が細胞死をほぼ完全に抑制するが、他の COX 阻害剤の indomethacin, ibuprofen, COX-2 選択的阻害剤の NS-398, CAY10404 は細胞死を抑制しなかった。この meloxicam の細胞死抑制作用は、MEK-1, 2, 5 の阻害剤である PD098059 を共存させても、細胞死抑制作用に変化は見られなかったが、PI3K 阻害剤の LY294002 を共存させた場合、meloxicam の細胞死抑制作用は見られなくなった。さらに、PI3K 下流で PI3K 活性化の指標でもある Akt の活性化を検討したところ、meloxicam の細

胞死抑制作用は、細胞死に先立って起こる Akt 活性低下を抑制することによることが明らかとなった。なお、meloxicam は、MPTP を用いた急性 PD モデルマウスにおいて黒質神経細胞死を抑制することがわかっている (Teisman *et al.*, 2001) が、メカニズムについては COX-2 阻害によるとしか説明されていない。

(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。2008 年、Malagelada らは、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示唆した。また、Timmons ら (2009) も同様にリン酸化 Akt および Akt の減少を見出し、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している。以上の知見より meloxicam あるいは、オキシカム系骨格を持つ医薬品は、パーキンソン病の脳黒質神経細胞死を抑制する可能性が高いと考えられる。

2. 研究の目的

それまでの我々の研究で新規に見出したオキシカム系抗炎症薬の 1 つである meloxicam の神経細胞死抑制作用を *in vitro* および *in vivo* でメカニズム検証し、その他のオキシカム系医薬品の中からパーキンソン病進行抑制薬としての最も作用の強い臨床試験候補化合物を見出すことを目的とした。すでに市販されている医薬品の適応拡大を目指すため、早い臨床応用が可能である。

3. 研究の方法

(1) meloxicam 類縁体のオキシカム系 NSAIDs の中で最も神経細胞死効果の強い薬剤を見出す。

すなわち、in vitro で神経細胞死抑制効果および PI3K/Akt シグナル低下の抑制作用について薬効の強い化合物を見出し、in vivo マウスパーキンソン病モデル系で、黒質神経細胞死およびパーキンソン様症状の改善効果を検証する。また、その細胞死抑制効果が PI3K/Akt シグナル活性化（または維持）によって発揮されているかを検討しコンセプト検証とする。

(2) meloxicam 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、上流の候補分子を検討する。また、類縁体においても同様の作用があるかを検討する。

上記検討により臨床試験の候補化合物を見出す。

4. 研究成果

meloxicam 以外のオキシカム系 NSAIDs について、SH-SY5Y 細胞を用いた MPP⁺誘発細胞死系 (WST-8 法・LDH 法) で評価した。オキシカム系医薬品である tenoxicam, piroxicam は、これらの系において細胞死抑制作用を持つことが明らかとなり、抑制活性の程度は、meloxicam と同程度であった。また、抑制メカニズムについても meloxicam と同様に PI3kinase/Akt 経路を介していることが Western blot 法によるリン酸化 Akt 量の改善により示され、オキシカム系医薬品は、共通したメカニズムで神経細胞死抑制作用を持つことがわかった。

一方、piroxicam の誘導体で、オキシカム系構造が一部失われた化合物を 3 種類評価したところ、これら 3 種の化合物で細胞死抑制作用が消失していた。また、celecoxib などの COX-2 選択性の高いコキシブ系 NSAIDs においても、細胞死抑制作用は見られなかった。したがって、神経細胞死抑制作用を持つ NSAIDs は、オキシカム構造を有する NSAIDs のみであることが明らかとなった。

また、パーキンソン病神経毒である MPTP を用いたマウスパーキンソン病モデルにおいて、メロキシカムがドパミン神経細胞死抑制作用とリン酸化 Akt 減少の抑制作用を有し、行動薬理的にもポールテストで有意に改善していることを見出した。他のオキシカム系の NSAIDs についても検討を行ったが、今のところ十分な結果は得られていない。また、オキシカム系 NSAIDs による細胞死抑制作用が、どのような細胞内シグナル伝達により作用発現しているかについても検討した。ドパミン神経線維芽細胞の SH-SY5Y を用いて細胞死抑制に関与する Bcl-2 ファミリーの分子の中で、Mcl-1 の減少が MPP⁺による細胞死と関連していることを見出した。他のリン酸化 Bcl-2 や BAX などに変化はなかった。また siRNA を用いて Mcl-1 をノックダウンすると、MPP⁺による神経細胞死は増強し、メロキシカムによる神経細胞死抑制作用は減弱した。以上のことから、このパーキンソン病に関連した神経細胞死とメロキシカムによる細胞死抑制作用は Mcl-1 を介していることが明らかとなった。

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)

[雑誌論文] (計 4 件)

① 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.

doi: 10.1016/j.brainres.2010.04.085.

- ② 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, 15-19 (2012).

doi: 10.1016/j.neulet.2012.05.045.

- ③ 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).

doi: 10.1016/j.ejphar.2011.11.046.

- ④ 田崎嘉一, 山本讓, 大村友博, 坂口智己, 木村周古, 大滝康一, 小野尚志, 須野 学, 浅利 優, 大久保知子, 野田敏宏, 栗屋 敏雄, 清水恵子, 松原和夫., メロキシカムは, マウスパーキンソン病モデルにおいて, Akt シグナル維持により運動障害とドパミン神経変性を改善する. *北海道医学雑誌* 88(1), 45, 2013

[学会発表] (計5件)

- ① 田崎嘉一ら, オキシカム系 NSAIDs による神経細胞死抑制作用は Akt/mTOR 経路を介する, 日本薬学会第 131 年会 (2011 年 3 月, 静岡)
- ② Tasaki Y, Yamamoto J, Omura T, Noda T, Kamiyama N, Yoshida K, Satomi M, Sakaguchi T, Asari T, Ohkubo T, Shimizu K and Matsubara K., Structural specificity of Akt-mediated neuroprotection by oxycam non-steroidal anti-inflammatory drugs against 1-methyl-4-phenyl pyridinium-induced cell death, PDRD2011 (上海, 中国)

- ③ 田崎嘉一ら, オキシカム系 NSAIDs は, MPTP 反復投与パーキンソン病モデルにおいて黒質線条体神経を保護し, 行動異常を改善する., 日本薬学会第 132 年会 (2012 年 3 月, 札幌)

- ④ Tasaki Y, Yamamoto J, Ohkubo T, Noda T, Omura T, Ono T., Kimura N., Suno M., T. Sakaguchi, and Matsubara K., Oxycam non-steroidal anti-inflammatory drugs ameliorate motor dysfunction and dopaminergic degeneration by maintaining Akt-signaling in a mouse Parkinson's disease model., *Neuroscience 2012* (2012 年 11 月, シカゴ, 米国)

- ⑤ 田崎嘉一, Myeloid cell leukemia-1 (Mcl-1) は SH-SY5Y 細胞の MPP⁺誘発アポトーシスに対して保護作用を持つ, 日本薬学会第 133 年会 (2013 年 3 月 28 日, 横浜)

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・准教授
研究者番号: 60374807

(2) 研究分担者

松原 和夫 (MATSUBARA KAZUO)
旭川医科大学・医学部・教授 (H22-23)
研究者番号: 20127533

(3) 連携研究者

松原 和夫 (MATSUBARA KAZUO)
京都大学・医学部・教授 (H24-)
研究者番号: 20127533