新規神経栄養因子様低分子化合物 T-817MA の 薬効薬理

福島 哲郎

要約: アルツハイマー病 (AD) は進行性の神経変性疾患であり、アミロイド β ($A\beta$) やタウの凝集・蓄積に起因する神経変性が病態に関与すると考えられている。T-817MA は、神経栄養因子様作用を有する低分子化合物であり、AD の進行抑制と症状改善を目指す治療薬として、現在北米で臨床試験が進められている。T-817MA は、培養ラット神経細胞において神経突起伸長を促進し、 $A\beta$ が誘発する神経細胞死を抑制した。また、AD 病態モデルとして知られているラット脳室内 $A\beta$ 持続注入モデルにおいて、 $A\beta$ 持続注入 4 週目にみられる認知機能の低下に対して T-817MA は抑制作用を示した。さらに、 $A\beta$ 持続注入 8 週間後から T-817MA の投与を開始した場合でも低下した認知機能を回復させた。一方、病理学的観察においても T-817MA は $A\beta$ 持続注入による海馬歯状回領域の神経細胞変性を抑制し、神経新生の減少を回復させることが確認された。これらの結果により、T-817MA は神経保護効果に加え、神経ネットワークを再構築することにより症状を改善する効果を有すると示唆された。また、ヒト変異タウ (P301L) トランスジェニックマウスにおける海馬歯状回領域のシナプトフィジンの低下を抑制し、認知機能の低下を改善するなど、T-817MA の神経保護効果の作用メカニズムは、軸索変性に対する抑制作用が関与していることが示唆されている。以上より、T-817MA は AD の進行を抑制し、認知機能を回復させる治療薬として期待される。

はじめに

アルツハイマー病 (AD) は進行性の神経変性疾患であり、加速度的に進む高齢化社会に伴い、その予防や治療法の確立が急務となっている。現在、AD 治療薬としてドネペジルを始めとするアセチルコリンエステラーゼ阻害薬や NMDA 受容体拮抗薬であるメマンチンが使用されている。これらの薬剤は、低下した神経伝達を増強させることで一過性に認知機能を改善することはできるが、病態の進行を抑制するような薬剤は未だ登場していない。一方、AD に関する最近の研究

進歩は著しく、発症機序や病態に関わる分子メカニズムは解明されつつあり、根本治療を目指した様々な薬剤の開発が進められている。

AD の病理学的特徴として老人斑と神経原線維変化があげられる。老人斑の主成分であるアミロイド β ($A\beta$) が病因であるとするアミロイド仮説、あるいは神経原線維を構成するタウが病態に関与するというタウ仮説は、AD の病態仮説として広く受け入れられている (1, 2)。 $A\beta$ やタウの凝集・蓄積は、進行性の神経伝達障害や細胞死を引き起こすと考えられており、これらをターゲットとした原因療法薬の開発が進められている (3)。一方、神経栄養因子は神経細胞の生存維持や機能修復に重要な役割を果たす因子であり、AD を含む神経変性疾患の進行抑制効果が期待されている (4, 5)。我々は、この神経栄養因子の効果に着目し、神経細胞の保護作用と神経突起の伸長促進作用を有する化合物の探索を進め、経口投与が可能な低分子化合物 T-817MA を見出した (図 1) (6)。これまでに、T-817MA は複数の病態モデルでの有効性が確認されている (7-10)。本稿では、T-817MA の非臨床試験における薬効薬理の概要について紹介する。

1. 神経保護効果

アミロイド仮説では、 $A\beta$ の凝集・蓄積により神経変性が起こるとされる (1)。 $A\beta$ が神経伝達障害や神経細胞死を引き起こすメカニズムについては未だ不明な点が多いが、直接的な細胞毒性、グリア細胞の異常な応答、タウのリン酸化などの経路が考えられている。我々は、ラット神経細胞/グリア細胞共培養系を用いて、 $A\beta$ が誘発する神経細胞死に対する T-817 の効果を検討した (6)。本培養系に $A\beta$ を添加して 48 時間後に検出される神経細胞死に対して、T-817MA は $A\beta$ と同時に添加することで保護効果を示した (図 2)。

また、AD 患者に認められる進行性の神経細胞脱落には酸化ストレスの関与が示唆されており、 $A\beta$ による障害メカニズムは過酸化水素 (H_2O_2) などの活性酸素種を介すると報告されている (11, 12)。そこで、酸

キーワード: アルツハイマー病, T-817MA, アミロイド β , タウ, 軸索変性

富山化学工業(株) 総合研究所 (〒930-8508 富山市下奥井 2 丁目 4-1)

E-mail: TETUO_FUKUSHIMA@toyama-chemical.co.jp 原稿受領日: 2010 年 3 月 25 日, 依頼原稿

Title: Pharmacological properties of T-817MA, a novel neurotrophic agent, for treatment of Alzheimer's disease

Author: Tetsuo Fukushima

化ストレスによる細胞内酸化還元状態の変化に対する T-817MA の作用を検討した。ラット大脳皮質神経細胞に H_2O_2 を添加すると、4 時間後に細胞内酸化還元状態の指標である還元型グルタチオン (GSH) の低下が認められ、24 時間後には細胞死が観察される (図 3) (6)。これに対し、 H_2O_2 処置の 24 時間前に T-817MA を培養系に添加すると、細胞内 GSH の低下と細胞死は抑制された。また、T-817MA の酸化ストレス抑制作用は、直接的な抗酸化能とは異なるメカニズムであ

ることが示唆されている (6, 13)。

2. 神経突起伸展の促進効果

AD 患者の剖検脳では神経細胞の軸索や樹状突起が障害を受け、神経ネットワークが崩壊していると報告されている (14)。これに対して、神経突起伸展を促進させる効果が知られている神経栄養因子は、種々の神経変性疾患において神経ネットワークを再構築することが期待されている (4, 5)。そこで、ラット大脳皮質神経細胞における T-817MA の神経突起伸展の促進効果を検討した。評価の指標としては、神経突起の長さ、軸索に発現するタンパク質 growth-associated protein-43 (GAP43) 量、細胞体や樹状突起に発現するタンパク質 microtubule-associated protein 2 (MAP2) 量を用いた。神経細胞を培養 4 日目に再凝集塊として回収し、ポリ-L-リジンコーティングプレートに播種後に T-817MA を添加し、さらに 3 日後に再凝集塊培養系の神経突起を評価した。その結果、T-817MA (0.1, 1 μM) は GAP43 を有意に増加させ、神経細胞の軸索伸展を促進させた (図 4) (6)。神経軸索伸展の促進効果は、*in vivo* ラット坐骨神経切断モデルにおいても確認され、T-817MA は神経ネットワークを再生する作用を有することが示唆された。

3. ラット脳室内 $A\beta$ 持続注入モデル

次に我々は、T-817MA の神経保護作用と神経ネットワーク再生作用について病態モデル動物における検証を試みた。ラットの脳室内に $A\beta$ を持続注入することにより、記憶障害と神経変性が起こることが報告されている (15, 16)。そこで、ラット脳室内 $A\beta$ 持続注入モデルにおける T-817MA の効果を Y 迷路試験による認知機能評価、ならびに海馬歯状回領域の正常神経細胞数の変化を指標に検討した。モデルの作製は、Nitta らの方法に準じて行った (15)。すなわち、 $A\beta_{1-40}$ を充填した浸透圧ポンプを注入用カニューレに接続し、ラット脳室内に $A\beta$ を持続注入した (300 pmol/day)。 $A\beta$ 持続注入 10 日目よりラットの認知機能は低下し、注入開始から 4 週間後には海馬歯状回領域の正常神経

図2 ラット大脳皮質神経細胞/グリア細胞共培養系における $A\beta$ 誘発神経細胞死に対する T-817MA の効果
MAP2 に対する免疫染色を指標として生存神経細胞数を定量した。画像は典型的な MAP2 免疫染色像。結果は生存神経細胞数の割合を平均値±標準誤差で表した ($n=6$)。** $P<0.01$ vs. Control (Cont) [Dunnett's test], ** $P<0.01$ vs. Vehicle (Veh) [Student's t test]。

図3 過酸化水素 (H_2O_2) が誘発する細胞内還元型グルタチオン (GSH) 低下および細胞死に対する T-817MA の効果
培養ラット神経細胞に 30 μM の H_2O_2 を処置し、4 時間後の細胞内 GSH 含量 (A) と神経細胞数 (B)、24 時間後の神経細胞数 (C) を定量した。結果は平均値±標準誤差で表した ($n=6$)。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs. Control (Cont) [Dunnett's test], * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs. Vehicle (Veh) [Student's t test]。

細胞数の減少が認められた。T-817MA を A β 持続注入 10 日目から 1 日 1 回、経口投与した結果、認知機能障害に改善がみられ、神経細胞数の減少も抑制された (図 5) (17)。ドネペジルは一過性に認知機能障害を改善したが、A β 持続注入 4 週目には改善効果は消失した。これは、ドネペジルの神経伝達増強効果が、障害による正常細胞の減少と共に低下したためと考えられる。また、A β を 8 週間持続注入したコントロール群では 8 週目以降の認知機能は低下したままであったが、8 週後から T-817MA を投与したラットでは認知機能の回復がみられ、12 週目から 1 週間休薬しても認知機能は維持された (18)。さらに、T-817MA の認知機能回復効果はドネペジルとの併用により増強された。こうした T-817MA による回復効果は、障害で失われた神経ネットワークが再構築されたためと考えられる。一方、成体脳では神経は新生しないと考えられてきたが、最近では海馬などの脳の一部では成体においても神経新生が起こり、神経可塑性に基づく学習・記憶の成立機構や障害を受けた際の修復機構に働くことが報告されている (19, 20)。そこで、ラットの海馬歯状回を新生神経のマーカータンパク質 (Polysialic Acid NCAM) の免疫染色により観察した。その結果、A β 持続注入モデルでは新生神経が減少しており、T-817MA 投与群ではコントロール群と比べて新生細胞数は有意に多かった (図 6) (7, 21)。以上の結果から、T-817MA は神経保護効果により AD の進行を抑制するだけでなく、神経新生や軸索伸展の促進効果を介した神経ネットワークの再構築により、症状を改善する効果が期待される。

4. ヒト変異タウ (P301L) トランスジェニック (Tg) マウス

タウをコードする遺伝子の変異により、家族性前頭側頭型認知症パーキンソンニズム (Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17) が発症することから、タウの機能異常は神経変性疾患を引き起こすと考えられている (22)。ヒト変異タウ (P301L) 遺伝子を導入した Tg マウスでは進行性の神経細胞変性が起こり、AD のみならず、タウの凝集・蓄積に関連する様々な神経変性疾患 (ピック病、進行性核上性麻痺、大脳基底核変性症など) の病態モデル動物とされている (23)。この Tg マウスに、13 週齢より T-817MA を飲水投与した結果、T-817MA は 42.5 週における後肢の運動機能の低下と脊髄神経細胞死を抑制した (24)。さらに、T-817MA は Tg マウスが呈する認知機能障害 (Y 迷路試験) を改善し、海馬神経細胞のシナプトフィジンの低下も抑制した (図 7)。シナプトフィジンはプレシナプスのマーカー分子であり、

図 4 ラット大脳皮質神経細胞の再凝集塊培養系における T-817MA の神経突起伸展の促進効果
軸索の指標として GAP43、樹状突起の指標として MAP2 の免疫染色により定量した。画像は典型的な GAP43 免疫染色像。結果は、平均値±標準誤差で表した (n=4-8)。**P<0.01 vs. Vehicle [Dunnett's test]. IR: immunoreactivity.

図 5 A β 持続注入ラットにおける認知機能障害に対する T-817MA の改善効果
認知機能評価として Y 迷路試験を実施した。結果は試験における自発的交替行動 (正選択率) の平均値で表した (n=9-10)。また、A β 持続注入 4 週目の海馬歯状回領域の神経細胞を Hematoxylin-Eosin 染色により観察した。**P<0.01 vs. Control [Dunnett's test], **P<0.01 vs. Vehicle [Student's t test].

図6 A β 持続注入ラットにおける海馬歯状回領域のPSA-NCAM (Polysialic Acid NCAM) の免疫染色像

図7 ヒト変異タウ (P301L) トランスジェニックマウスにおける T-817MA の効果

Y 迷路試験による認知機能評価 (A) および海馬歯状回におけるシナプトフィジンの免疫染色による定量 (B)。結果は平均値±標準誤差で表した (n=9)。* P <0.01 vs. control transgenic mice [Dunnett's test], ** P <0.01 vs. wild-type mice [Student's t test]。

T-817MA は Tg マウスにおける軸索変性を抑制することにより認知機能障害を改善したと考えられた。以上より、T-817MA はタウの機能異常が関与する神経細胞障害に対しても効果を示すことが検証された。

おわりに

近年、AD 治療薬として A β やタウをターゲットにした原因療法薬の開発が進められており注目を集めている(3)。また、早期診断を目指して脳イメージングや生化学的マーカーなどの診断技術を用いた臨床研究が実施されている(25)。早期診断が確立して発症初期からの治療が可能になれば、原因療法や神経保護療法などの有効性が高まり疾患の予防的効果や根本治療も期待される。しかしながら、AD の病態については未だ不明なことも多く、臨床研究からのフィードバックによる病態メカニズムの解析など多種多様な取り組みや治療が必要である。

AD の病態では、認知機能が低下する以前から病変が始まり神経変性が起こるため、診断の時には既に病態カスケードが進行していると考えられる。したがって、今後の AD の治療では、①原因物質の産生抑制や除去、②病態カスケードの抑制(神経保護)、③神経ネットワークの再構築、④残存神経や再構築された神経ネットワークの伝達増強、などの治療戦略とその組み合わせ(併用)が必要となるだろう。T-817MA は、神経保護効果や神経ネットワークを再構築する効果により、様々な病態ステージで効果を発揮することが期待される。こうした特長に基づき、AD の進行抑制と症

状改善を実現する疾患修飾薬を目指し現在、北米で T-817MA の臨床第Ⅱ相試験が実施されている。今後、T-817MA が画期的な AD 治療薬となり、世界の医療に貢献することを期待したい。

文 献

- 1) Selkoe DJ, et al. Neuron. 1991;6:487-498.
- 2) Allen SJ. Neurobiology of Alzheimer's Disease. 3rd ed. Oxford University Press; 2007. p. 1-35.
- 3) Rafii MS, et al. BMC Med. 2009;7:1-4.
- 4) Tariot PN, et al. Alz Dis Assoc Disord. 2003;17 Suppl 4:S105-S113.
- 5) Schindowski K, et al. Genes Brain Behav. 2008;7:43-56.
- 6) Hirata K, et al. J Pharmacol Exp Ther. 2005;314:252-259.
- 7) Nguyen PT, et al. Hippocampus. 2007;17:443-455.
- 8) Seo T, et al. Psychopharmacology (Berl). 2008;197:457-464.
- 9) Yamashita D, et al. Neurosci Res. 2008;61:38-42.
- 10) Kawasaki T, et al. Neuropharmacology. 2008;55:654-660.
- 11) Barnham KJ, et al. Nat Rev Drug Discov. 2004;3:205-214.
- 12) Abramov AY, et al. J Neurosci. 2004;24:565-575.
- 13) Fukushima T, et al. Neurochem Int. 2006;48:124-130.
- 14) Dickson TC, et al. Exp Neurol. 1999;156:100-110.
- 15) Nitta A, et al. Jpn J Pharmacol. 1997;73:51-57.
- 16) Yamada K, et al. Br J Pharmacol. 1999;126:235-244.
- 17) Nakada Y, et al. Society for Neuroscience 2003 Abstract 97.4.
- 18) Nakada Y, et al. Society for Neuroscience 2004 Abstract 777.17.
- 19) Cameron HA, et al. Nat Neurosci. 1999;2:894-897.
- 20) Gross CG. Nat Rev Neurosci. 2000;1:67-73.
- 21) Kimura T, et al. Br J Pharmacol. 2009;157:451-463.
- 22) Spillantini MG, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94:4113-4118.
- 23) Lewis J, et al. Nat Genet. 2000;25:402-405.
- 24) Iwakami N, et al. Society for Neuroscience 2003 Abstract 97.3.
- 25) 荒井啓行, 他. 日薬理誌. 2010;135:3-7.