

氏名(生年月日) ^{むら} ^{やま} ^{のり} ^{ひと}
村山宣人 (1965年4月22日)

学位の種類 博士(薬学)

学位記番号 論博 第196号

学位授与の日付 2015年9月30日

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学位論文題目 **bFGF**様作用を有する化合物の薬理効果とその作用メカニズム

論文審査委員 (主査) 教授 山本 昌

(副査) 教授 大矢 進

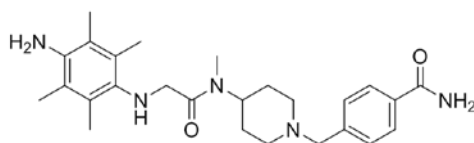
(副査) 教授 中山 祐治

論文内容の要旨

塩基性線維芽細胞成長因子 (basic fibroblast growth factor : bFGF) は、形態形成、組織修復・再生、及び生体の恒常性を維持するための代謝調節に關与する分泌タンパク質である。bFGF は神経細胞に対する分化促進作用 (神経細胞保護作用、神経軸索伸長作用、神経幹細胞分化誘導作用等) を有することから中枢疾患への適応が期待されてきた。しかしながら、bFGF は、血液-脳関門の透過性に限界があることや、細胞増殖作用を有することから、炎症反応の亢進や腫瘍増殖等の懸念が課題とされた。本研究は、bFGF 様神経分化作用を模倣する SUN11602 の薬効プロファイルを解析すると共に、bFGF との異同を検討した。その結果、以下の知見が得られた。

第1、2章 : SUN11602 の薬理効果とその作用機序

本研究では、FGF 受容体 Tyr キナーゼを活性化して bFGF 様の細胞分化作用 (神経細胞軸索伸長作用、神経細胞保護作用) をもたらすが細胞増殖活性を示さず、体内動態及び物性に優れた SUN11602 「化学名 : 4-({4-[(4-amino-2,3,5,6-tetramethylanilino)-acetyl](methyl) amino]-1-piperidinyl)methyl)benzamide (下図)」の薬理作用とその作用機序を解明した。



SUN11602 M.W. 451.6

ラット初代培養神経細胞を用いて、神経軸索・突起伸長に対する SUN11602 及び bFGF の作用を検討した結果、SUN11602 (1 μ M) は、bFGF (1ng/mL) と同程度の有意な神経軸索・突起伸長作用を示した。また、グルタミン酸誘発神経細胞傷害に対して、SUN11602 (0.1~3 μ M) 及び bFGF (1~10ng/mL) は、グルタミン酸添加と同時添加では、神経細胞保護作用が認められず、24 時間前添加により、有意な神経細胞保護作用を示した。この神経細胞保護作用は、タンパク質合成阻害剤及び RNA 合成阻害剤で消失することから、bFGF 同様に SUN11602 の神経細胞保護作用には、de novo 合成が不可欠である。SUN11602 及び bFGF によりグルタミン酸誘発神経細胞内カルシウム上昇が抑制

されるため、カルシウム結合タンパク質の一種で、細胞内カルシウム濃度の恒常性維持を担っている CalbindinD28k (CalB) に注目した。SUN11602 及び bFGF 刺激で、神経細胞は CalB の mRNA 及びタンパク質の産生を亢進した。また、CalB 欠損マウス由来の初代培養神経細胞では SUN11602 及び bFGF は共にグルタミン酸誘発神経細胞内カルシウム上昇を抑制できず、神経細胞死を抑制できなかった。以上のことから、SUN11602 は bFGF と同様に CalB の産生を亢進し、グルタミン酸誘発神経細胞傷害に対して保護作用を示すことが判明した。

SUN11602 の FGF 受容体シグナルへの作用メカニズム解析として、FGF 受容体 Tyr kinase 特異的阻害剤である PD166866、FGF 受容体の二量体化を阻害する suramin 及び FGF 受容体 antagonist である platelet factor 4 (PF4) による SUN11602 及び bFGF の神経細胞保護作用に対する拮抗試験を行った。bFGF の神経細胞保護作用は、PD166866, suramin 及び PF4 により阻害され、SUN11602 の神経細胞保護作用は、suramin 及び PF4 では阻害されず、PD166866 により阻害された。つまり、SUN11602 は、bFGF agonist として作用せず、FGF 受容体の二量体化を介せず、FGF 受容体の Tyr キナーゼ活性化を介して保護作用を示すことが示唆された。

Basic FGF 等の神経栄養因子類による Tyr kinase 型受容体リン酸化を介したシグナル伝達で、細胞の生存に関わるカスケードとして MEK/ERK シグナルが必要であることが報告されている。そこで、MEK/ERK シグナルに対する SUN11602 と bFGF の異同を解析した。SUN11602 及び bFGF は初代培養神経細胞で ERK のリン酸化を亢進し、MEK 阻害剤により神経細胞保護作用は阻害された。つまり、SUN11602 は bFGF と同様に MEK/ERK シグナル経路が活性化されることを検証した。

以上のことから、SUN11602 の bFGF 様神経細胞保護作用のメカニズムとして、FGF 受容体との結合様式は不明だが、FGF 受容体 Tyr キナーゼを活性化し、MEK/ERK シグナルを活性化することにより CalB 産生亢進を介して、細胞内カルシウムホメオスタシスを維持することで神経細胞を保護していることが示唆された。

Basic FGF は細胞分化作用と細胞増殖作用を有しており、上記に記したように SUN11602 は bFGF 様の細胞分化作用を有することが示唆された。次に、細胞増殖作用における SUN11602 及び bFGF の異同について検討した。BHK-21 及び SKN 細胞を用いて、bFGF (0.01~30 ng/mL) 及び SUN11602 (1~100 μ M) の細胞増殖活性を検討した結果、bFGF は 1ng/mL 以上の濃度で細胞増殖活性を示したが、SUN11602 は、細胞増殖活性を示さなかった。bFGF は、細胞膜上の FGF 受容体活性化以降のシグナルだけで細胞分化作用を誘導するが、増殖作用に関しては、細胞膜上の FGF 受容体活性化と細胞核内増殖シグナル活性化が相互作用することで誘導される。つまり、核内増殖シグナルが活性化されるか否かにより、細胞分化作用と細胞増殖作用を分離することが可能と考えられている。SUN11602 は bFGF と異なり核内増殖シグナルを活性化しないため、bFGF 様細胞分化作用を有するが、細胞増殖作用は誘導しないと考えられる。

第3章：神経傷害モデルに対する SUN11602 の効果

無傷害性量の凝集 $A\beta_{1-40}$ (1 μ g/1 μ L) を海馬 CA1 領域に微量注入し、48 時間後に同部位に無傷害性量のイボテン酸 (0.3 μ g/0.5 μ L) を注入することによって、相乗的に神経細胞傷害を誘発する神経傷害モデルを作製した。凝集 $A\beta_{1-40}$ 注入 24 時間後に SUN11602 (0.1~1mg/kg) を経口投与すると、学習機能 (Y-maze、水迷路) の悪化及び神経細胞傷害を用量依存的に有意に抑制した。また、CalB

欠損マウスを用いて同様にマウス神経細胞傷害に対する SUN11602 及び bFGF の効果を検討したところ、SUN11602 及び bFGF の神経保護作用を示さなかった。以上のことから、凝集 A β_{1-40} とイボタン酸のコンビネーションによる神経細胞傷に対する SUN11602 及び bFGF の神経細胞保護作用には、CalbindinD28k の産生が深く関与していることが示された。

結語

本研究は、bFGF の多岐にわたる薬理作用に着目して、bFGF が超えられない臨床上の課題（高分子タンパク質のため血液-脳関門の透過性に限界があること、細胞増殖作用による炎症反応亢進や腫瘍化の懸念）を解決する低分子化合物 SUN11602 の *in vitro* 及び *in vivo* における薬理作用とその作用メカニズムを明らかにするとともに、bFGF との異同を解析した。本研究で得られた知見は、SUN11602 等の bFGF 様作用を有する低分子化合物の中核疾患治療薬としての有用性を示すとともに、bFGF の作用メカニズムの一端を明らかにする上で有用な基礎的情報を提供するものと思われる。

論文審査の結果の要旨

塩基性線維芽細胞成長因子 (basic fibroblast growth factor : bFGF) は、形態形成、組織修復・再生、及び生体の恒常性を維持するための代謝調節に関与する分泌タンパク質である。bFGF は神経細胞に対する分化促進作用 (神経細胞保護作用、神経軸索伸長作用、神経幹細胞分化誘導作用等) を有することから中枢疾患への適応が期待されてきた。しかしながら、bFGF は、血液-脳関門の透過性に限界があることや細胞増殖作用を有することから、炎症反応の亢進や腫瘍増殖等の懸念が課題とされた。そこで本研究では、bFGF 様神経分化作用を有し、低分子化合物である 4-({4-[(4-amino-2,3,5,6-tetramethylamino)-acetyl] (methylamino)-1-piperidinyl}methyl) benzamide (SUN11602) の薬効プロファイルを解析すると共に、bFGF との作用機序の差異を検討した。

まず、ラット初代培養神経細胞を用いて、神経軸索・突起伸長に対する SUN11602 及び bFGF の作用を検討した結果、SUN11602 (1 μ M) は、bFGF (1ng/mL) と同程度の有意な神経軸索・突起伸長作用を示した。また、グルタミン酸誘発神経細胞傷害に対して、SUN11602 (0.1~3 μ M) 及び bFGF (1~10 ng/mL) は、グルタミン酸添加と同時に添加では、神経細胞保護作用が認められず、24 時間前添加により、有意な神経細胞保護作用を示した。さらに、SUN11602 及び bFGF によりグルタミン酸誘発神経細胞内カルシウム上昇が抑制されるため、カルシウム結合タンパク質の一種で、細胞内カルシウム濃度の恒常性維持を担っている CalbindinD28k (CalB) に注目した。SUN11602 及び bFGF 刺激で、神経細胞は CalB の mRNA 及びタンパク質の産生を亢進した。また、CalB 欠損マウス由来の初代培養神経細胞では SUN11602 及び bFGF は共にグルタミン酸誘発神経細胞内カルシウム上昇を抑制できず、神経細胞死を抑制できなかった。以上のことから、SUN11602 は bFGF と同様に CalB の産生を亢進し、グルタミン酸誘発神経細胞傷害に対して保護作用を示すことが認められた。

次に、SUN11602 の FGF 受容体シグナルへの作用メカニズム解析を行った結果、SUN11602 は、bFGF agonist として作用せず、FGF 受容体の二量体化を介せずに、FGF 受容体の Tyr キナーゼ活性化を介して保護作用を示すことが示唆された。さらに、MEK/ERK シグナルに対する SUN11602 と bFGF の作用機序の差異を解析したところ、SUN11602 及び bFGF は初代培養神経細胞で ERK のリン酸化を亢進し、MEK 阻害剤により神経細胞保護作用は阻害された。すなわち、SUN11602 は bFGF と同様に

MEK/ERK シグナル経路が活性化されることを検証した。

また、細胞増殖作用における SUN11602 及び bFGF の差異について検討した。BHK-21 及び SKN 細胞を用いて、bFGF (0.01~30 ng/mL) 及び SUN11602 (1~100 μ M) の細胞増殖活性を検討した結果、bFGF は 1 ng/mL 以上の濃度で細胞増殖活性を示したが、SUN11602 は、細胞増殖活性を示さなかった。以上のことから、SUN11602 は bFGF と異なり核内増殖シグナルを活性化しないため、bFGF 様細胞分化作用を有するが、細胞増殖作用は誘導しないことが認められた。

最後に神経傷害モデルに対する SUN11602 の効果を検討したところ、凝集 A β_{1-40} 注入 24 時間後に SUN11602 (0.1~1 mg/kg) を経口投与すると、学習機能の悪化及び神経細胞傷害を用量依存的に有意に抑制した。また、CalB 欠損マウスを用いて同様にマウス神経細胞傷害に対する SUN11602 及び bFGF の効果を検討したところ、SUN11602 及び bFGF の神経保護作用を示さなかった。以上のことから、凝集 A β_{1-40} とイボテン酸の併用による神経細胞傷に対する SUN11602 及び bFGF の神経細胞保護作用には、CalbindinD28k の産生が深く関与していることが示された。

以上、本研究で得られた知見は、SUN11602 等の bFGF 様作用を有する低分子化合物の中核疾患治療薬としての有用性を示すとともに、bFGF の作用メカニズムの一端を明らかにする上で有用な基礎的情報を提供するものと思われる。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。