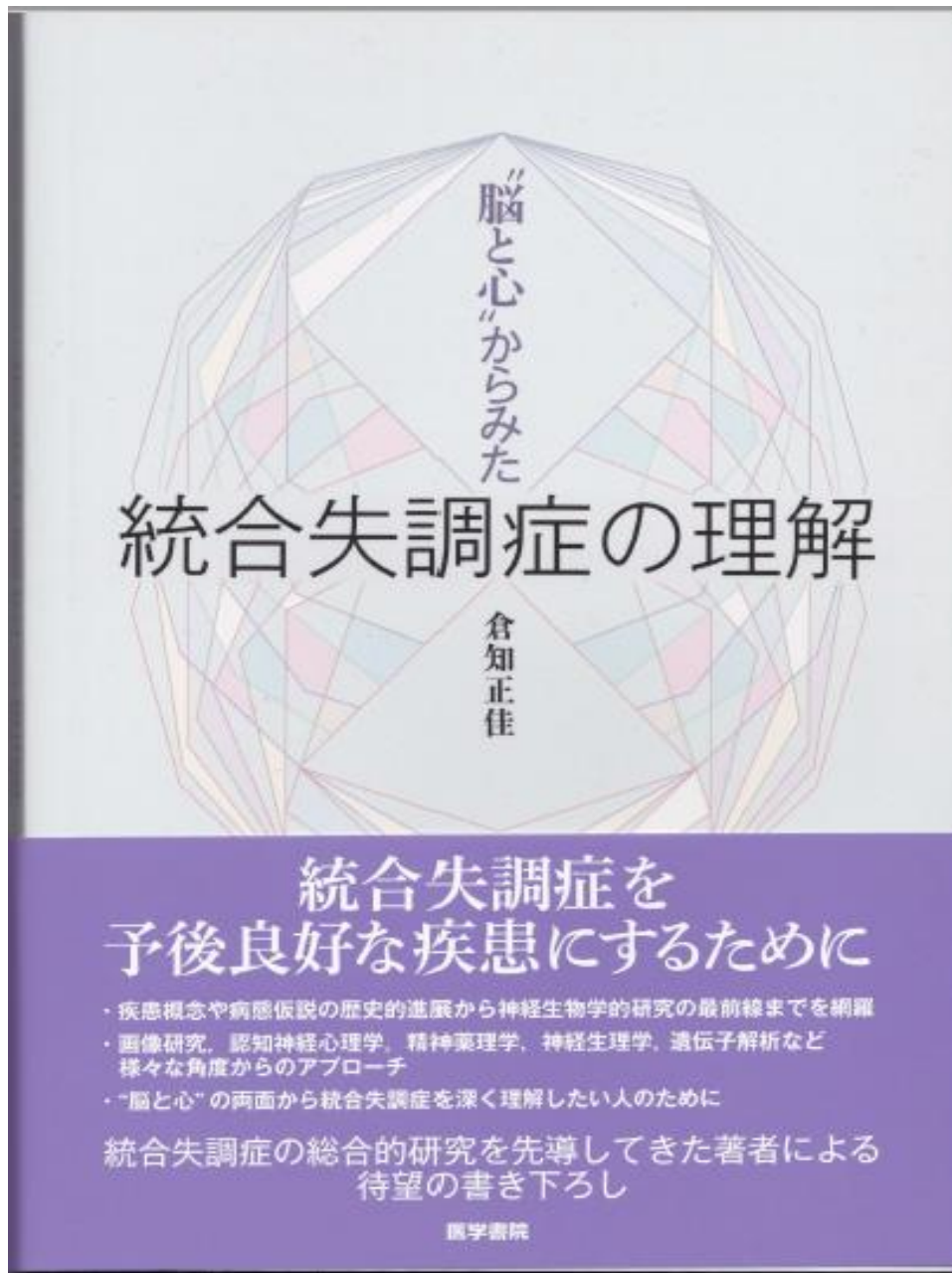


抗酸化機能を付与したハイブリッド型 神経保護薬の創成

富山大学大学院医学薬学研究部 (医学)
特別研究教授 近藤 隆



2019年10月8日



医学書院、2016

第Ⅰ部 統合失調症とはどのような疾患か

第Ⅱ部 統合失調症の神経生物学

第Ⅲ部 予後良好な疾患にするために

- ・ 「本書は何よりも、統合失調症の病変が、脳のどこにどんな形であるのかを描こうとして、かなり成功した初の精神医学書である。」
(医学界新聞、書評、2016.12.5)

‘周囲の人の希望が、転帰に良い影響を及ぼす’ (Ciompi, L, 1988)。

発明の名称: タンドスピロン誘導体

共同研究分担

- ・近藤 隆: 富山大学特別研究教授
役割: 新規化合物のin vitroの抗酸化作用の測定
- ・阿部 仁: 富山大学大学院理工学研究部(工学)教授
役割: 新規化合物の合成と修飾
- ・上原 隆: 金沢医科大学准教授
役割: 新規化合物の動物モデルでの評価
- ・倉知正佳: 有沢橋病院(非常勤); 富山大学名誉教授;
富山大学医学部協力研究員
役割: 新規化合物の基本骨格の提案と実験計画の策定

I. 統合失調症とは

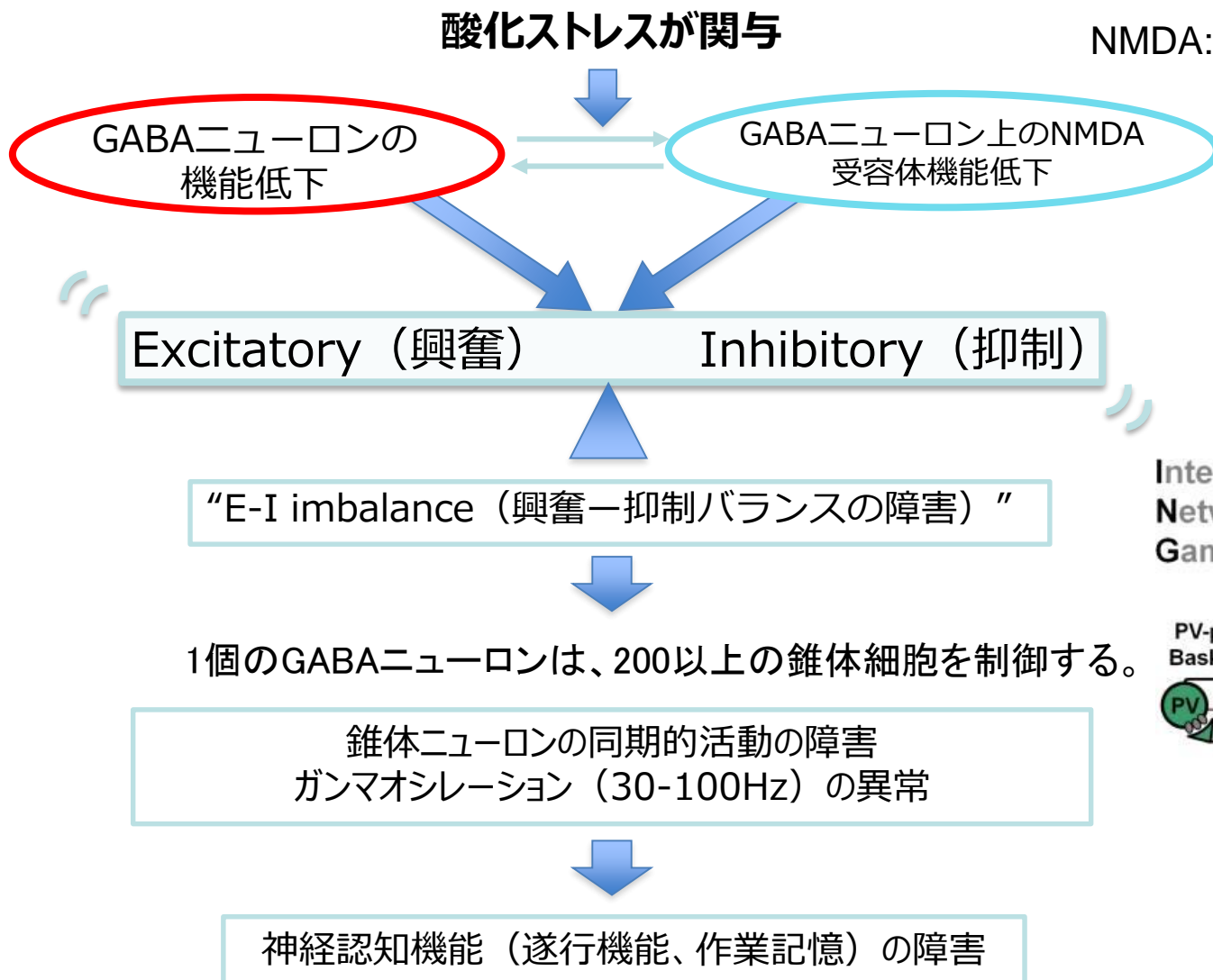
1. 発病危険率は、120人に1人で、青年期に好発し、しばしば慢性に経過する。回復率の中央値は、最近のメタ解析によれば、**13.5%**で、これは時代を通じてほぼ変わらない (Jääskeläinen E, *et al.*, 2013) 。
2. 主な症候は、**陽性症状** (幻覚や妄想など)、**陰性症状** (感情鈍麻や意欲減退など)、および**認知機能障害** (言語性記憶、遂行機能の障害など) である。
3. **現行の治療薬は陽性症状には奏功するが、陰性症状や認知機能障害に対する効果は乏しい。**
4. 陰性症状や認知機能障害が社会的転帰に関連する。
5. したがって、**陰性症状や認知機能障害を改善し、社会的転帰の改善をもたらす治療薬を開発することが精神医学の大きな課題**である。

抗精神病薬の開発と統合失調症の病態理解の進展

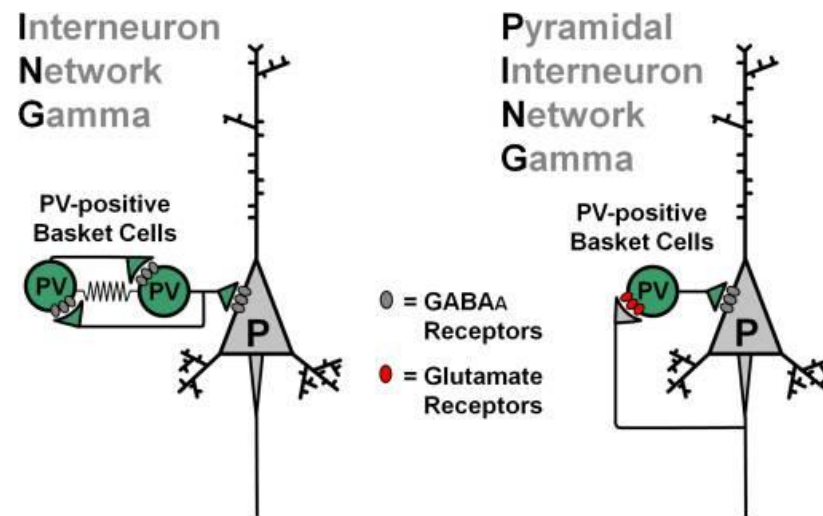
抗精神病薬の開発	病態仮説	形態学的・組織学的変化	動物モデル
1950	クロールプロマジンの臨床効果 (Delay J, 1952) ←鎮静作用からの推測		
1960	↓ 薬理作用 ドーパミン過剰伝達仮説 (van Rossum, 1966) : 陽性症状		
1970		前頭低活性 (Ingvar DH & Franzen G, 1974) 脳室拡大 (Johnstone EC, <i>et al.</i> , 1976)	
1980	シナプス刈込の行き過ぎ仮説 (Feinberg I, 1982/3) リスペリドンの開発 (Janssen P, 1984) ←薬理作用		
1990		NMDA受容体機能低下仮説 (Olney J & Farber N, 1995)	
2000		錐体細胞樹状突起棘の減少 (Garey LJ, <i>et al.</i> , 1998) PV陽性GABAニューロンの減少 (Reynolds, <i>et al.</i> , 2002)	
2010		<u>NMDA受容体機能低下仮説に基づく動物モデルで、統合失調症の脳の組織学的変化が再現</u> (Nakatani-Pawlak <i>et al.</i> , 2009, Uehara <i>et al.</i> , 2010)	

これらの動物モデルを用いて、いくつかの候補薬剤の検討がはじめられているが (Uehara *et al.*, 2012; Shirai *et al.*, 2012, 2015; Zhang *et al.*, 2016)、まだ臨床的に応用されたものはない。

統合失調症の病態生化学的仮説： GABAニューロン/NMDA受容体機能低下仮説



ガンマオシレーションに関する2つのモデル

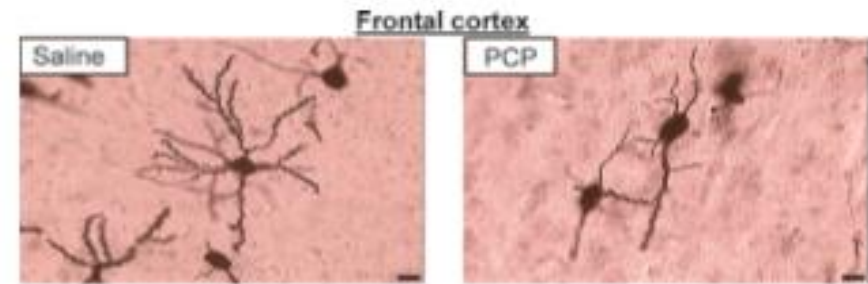


Gonzalez-Burgos G and Lewis DA (2012)

統合失調症の動物モデルは可能か： NMDA受容体機能低下仮説に基づく動物モデル

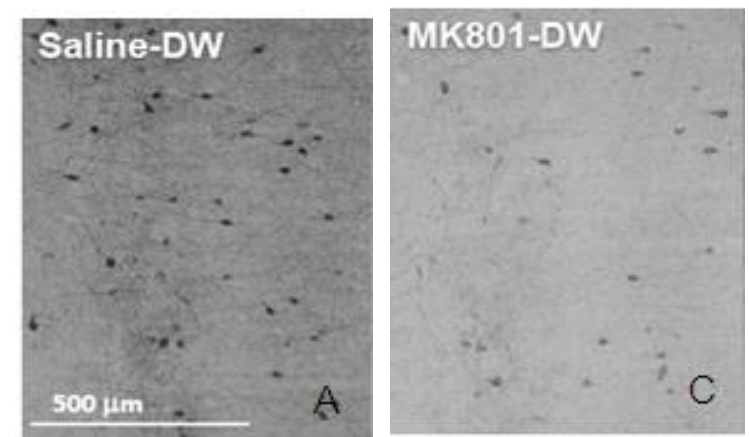
Nakatani-Pawlak, *et al.*, Biol Pharm Bull 32: 1576-1583, 2009

生後7, 9, 11日のマウスにNMDA受容体遮断薬であるフェンサイクリジン(PCP, 10mg/kg)を投与したモデルマウスにおいて、PCP誘発性多動、作業記憶と社会的相互行動の障害、錐体細胞の樹状突起の減少、PV陽性GABAニューロンの減少を認めた。



Uehara T, *et al.*: J Psychiatric Res 46: 622-629, 2012

生後7-10日のラットに、NMDA受容体遮断薬**MK-801** (dizocilpine, 0.20mg/kg, s.c.)を1日1回投与したモデルラットにおいて、思春期後(生後63日)に、prepulse inhibitionの障害、メタンフェタミンによるlocomotor activityの亢進、PV陽性GABAニューロンの減少を認めた。



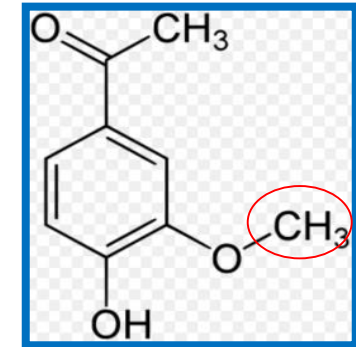
⇒ 動物モデルにおいても、統合失調症と同様な行動変化と細胞レベルの変化が認められる。

PD 63のラット内側前頭前野のPV陽性GABAニューロン

Ⅱ. 先行研究-1. アポシニン, Apocynin

1883年 カナダ麻(*Apocynum cannabinum*)の根から最初に単離された。
1971年 アポシニンは民間薬(ヒンズー教医術)として肝、心疾患、黄疸、喘息に
用いられていた西ヒマラヤ産コオウレン属の植物からも単離された。

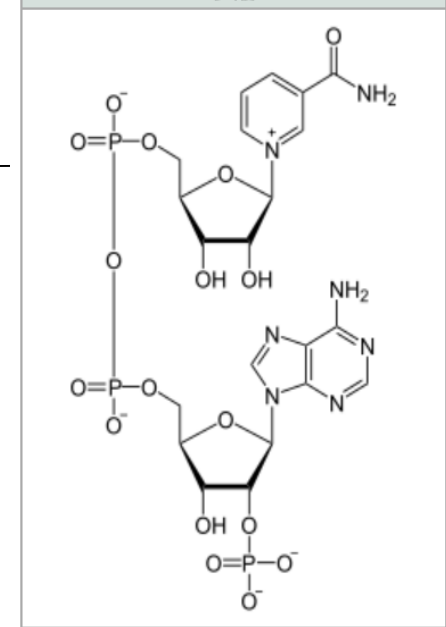
但し、薬理的に利用可能な水準で抽出されたのは
1990年になってからである(図参照)。



アポシニンの作用機序は、NADPH¹⁾ オキシダーゼ
(NADPH oxidase, Nox) 活性を阻害し、活性酸素の
産生を阻害することである。このため、広範囲な抗炎症
作用を示す。

1) Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリ
ン酸



Reactive Oxygen Species-mediated Loss of Phenotype of Parvalbumin Interneurons Contributes to Long-term Cognitive Impairments After Repeated Neonatal Ketamine Exposures.

Neurotox Res. 2016 Nov;30(4):593-605. Epub 2016 Jul 21.

Zhang H1, et al. Nanjing (南京) University, China.

対象と方法 : Sprague-Dawley male rat pups ; 生後6-8日の間ketamine 腹腔内投与 (75 mg/kg) . 介入研究として、NADPH oxidase inhibitor, apocynin (Apo)を投与. P40, P42-44, and P50-56に、学習・記憶能力をテスト. 組織学的と生化学的測定のために、別のグループのラットで、P9 or P60に脳を採取した.

結果 : ケタミンの反復投与により、酸化ストレスの指標の上昇、パルブアルブミン陽性GABAニューロンの減少、およびglutamic acid decarboxylase 67 (GAD67) の減少が生じ、認知機能の障害を伴っていた。しかし、Apo の投与は、これらの変化を軽減した

結論:これらの結果は、酸化ストレス—おそらくはNOX2の増加を介するもの—がパルブアルブミン陽性GABAニューロンの喪失と認知機能の障害をもたらすことを示唆している。さらに、NADPH oxidase の抑制がこれらの認知機能の障害を保護protect することが示された。

この動物モデルの結果によれば、Apocyninが統合失調症の新しい治療薬、あるいはそのリード化合物になる可能性が示唆される。

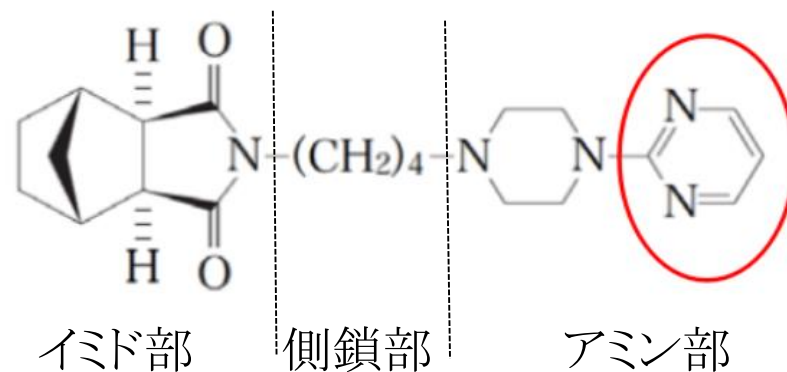
先行研究-2. タンドスピロン, Tandospirone

タンドスピロン tandospironeは、5-HT_{1A}受容体部分作動薬で、商品名セディール(大日本住友製薬)として、心身症や神経症の不安・抑うつ症状への保険適応がある。大日本住友製薬の特許は2008年に切れ、その後そのジェネリック製剤も製造されている。

実験的には、フェンサイクリジンやMK-801 (NMDA受容体遮断薬) 投与の統合失調症動物モデル(ラット)において、その認知障害を、5-HT_{1A}部分作動薬(タンドスピロン)は予防した(Horiguchi M, *et al.*, 2012)。なお、虚血モデルにおいて、他の5-HT_{1A}受容体作動薬の強力な神経保護作用が報告されている(Berends AC, *et al.*, 2005)。

臨床的には、タンドスピロン 30mg/日の追加投与で、統合失調症患者の記憶機能が改善した(Sumiyoshi T, *et al.*, 2001)。ただし、その効果は軽度である。

タンドスピロンは、イミド部、側鎖部とアミン部から成っている(図)。先行研究からアミン部が改変されても5-HT_{1A}受容体部分作動薬の作用は残存するようである(大野行弘ほか: 2001)、本発明では、アミン部の一部を改変し、そこにアポシニンからの改変物質を結合させることにした。



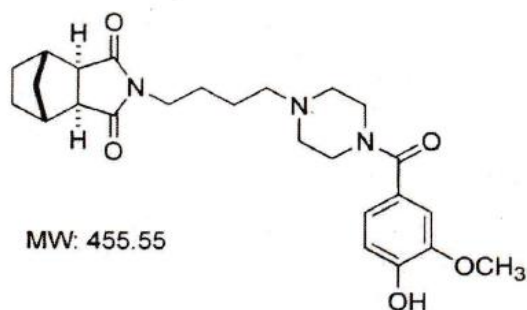
Ⅲ. 評価系とその結果

1. 新規化合物について

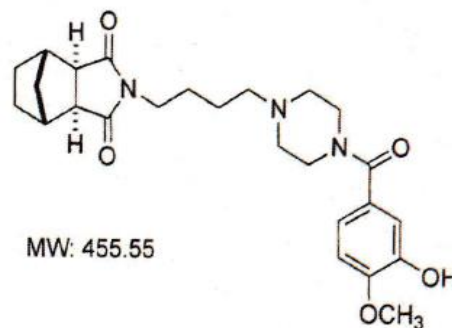
抗酸化物質アポシニンあるいはそれを改変した化合物と5-HT_{1A}受容体部分作動薬タンドスピロンを改変した化合物との結合:

A-2, A-3およびA-4

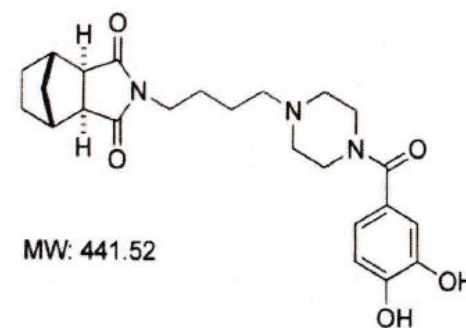
A-2



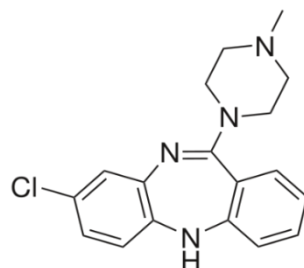
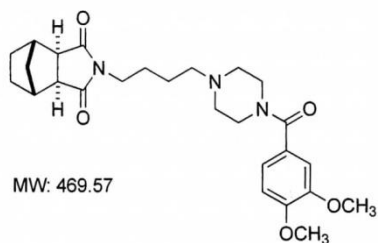
A-3



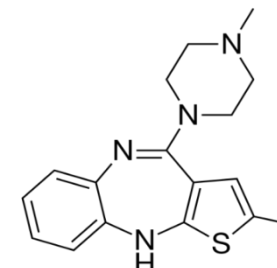
A-4



A-1



クロザピン
Clozapine
MW: 326.82



オランザピン
Olanzapine
MW: 312.43

Ⅲ. 評価系とその結果

2. *in vitro*: 抗酸化活性測定例

ヒトリンパ腫細胞U937を使用し、抗精神病薬と新規化合物(A-2, A-3とA-4)について、放射線(X線、線量10Gy)照射直後に発生する細胞内 $\cdot\text{OH}$ (ヒドロキシラジカル)および他の活性酸素種(ROS)の消去活性を下記の方法で測定:

- 1) APF (aminophenyl fluorescein; $\cdot\text{OH}$ と OCl^-)法,
- 2) HPF (hydroxyphenyl fluorescein; $\cdot\text{OH}$)法 (結果提示、略)
- 3) DCFH (2',7',dichlorodihydro fluorescein; H_2O_2 , peroxide 他)法

ROS	HPF	APF	DCFH
$\cdot\text{OH}^a$	730	1200	7400
ONOO^{-b}	120	560	6600
OCl^-c	6	3600	86
$^1\text{O}_2^d$	5	9	26
$\text{O}_2^{\bar{e}}$	8	6	67
H_2O_2^f	2	<1	190
NO^g	6	<1	150
ROO^{*h}	17	2	710
Autoxidation ⁱ	<1	<1	2000

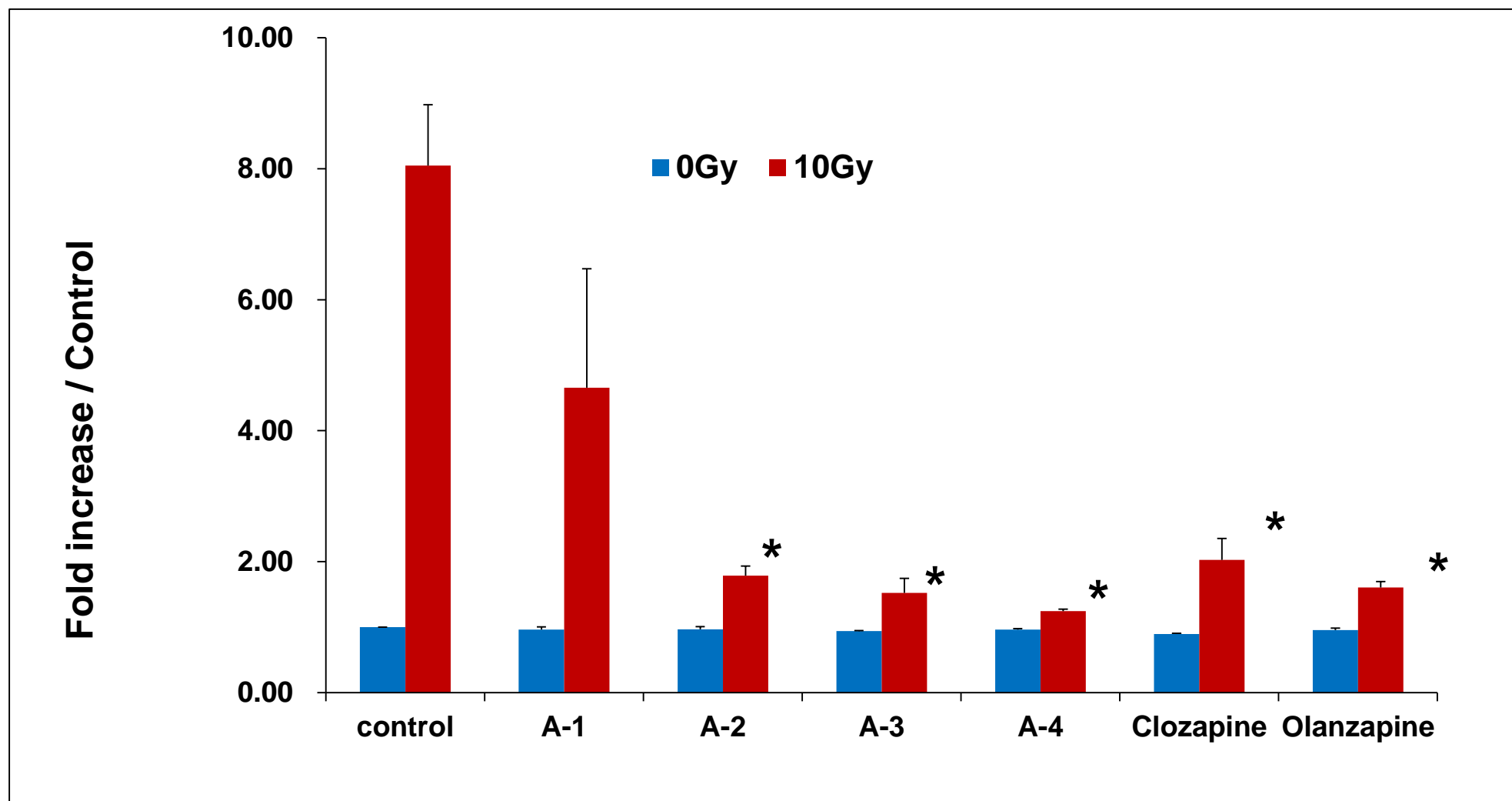
放射線照射(10 Gy)後のU937細胞内の O_2^- および NOをHE(Hydroethidine)とDF-2(Diaminofluorescein-2)を用いて測定した。

その結果、両者の有意な生成は観測されず、従って、本実験系では

HPFは $\cdot\text{OH}$ 、
APFは $\cdot\text{OH}$ および OCl^-
を検出したものと考えられる。

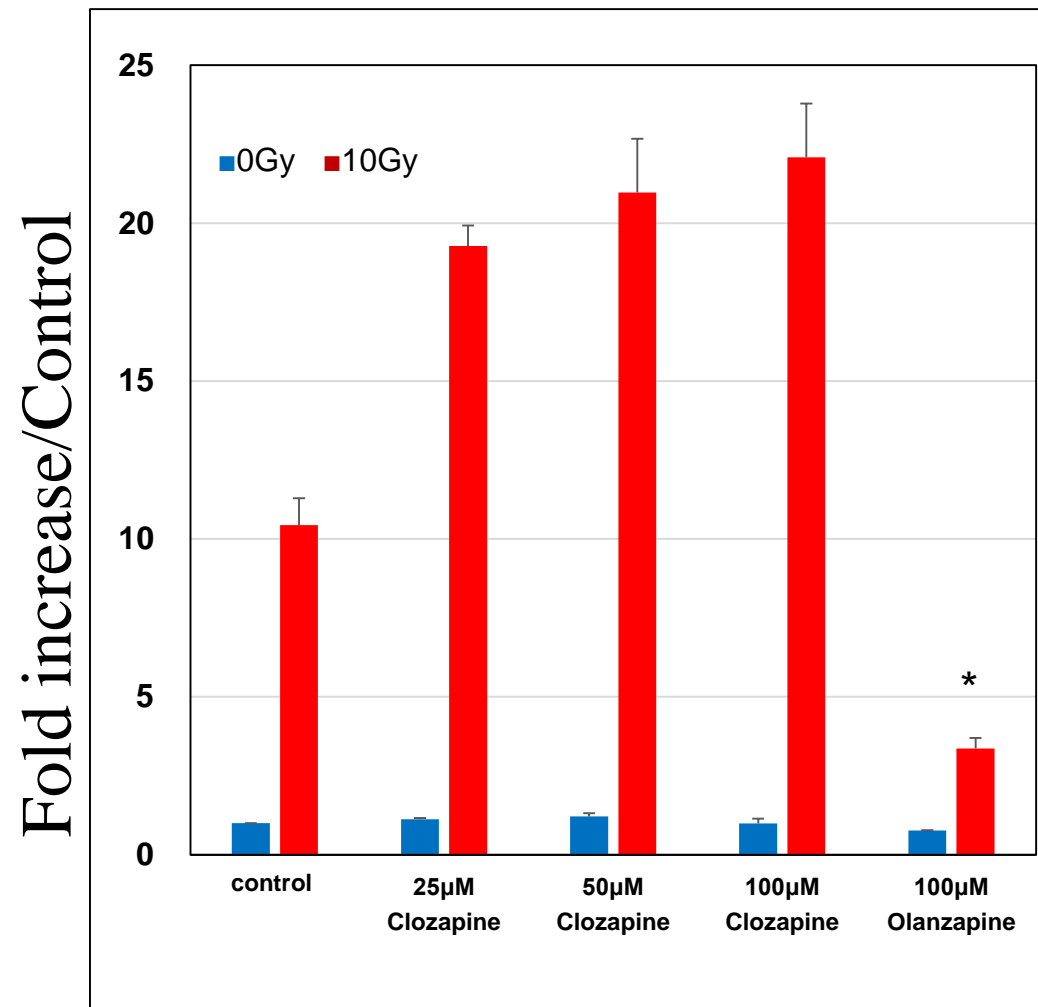
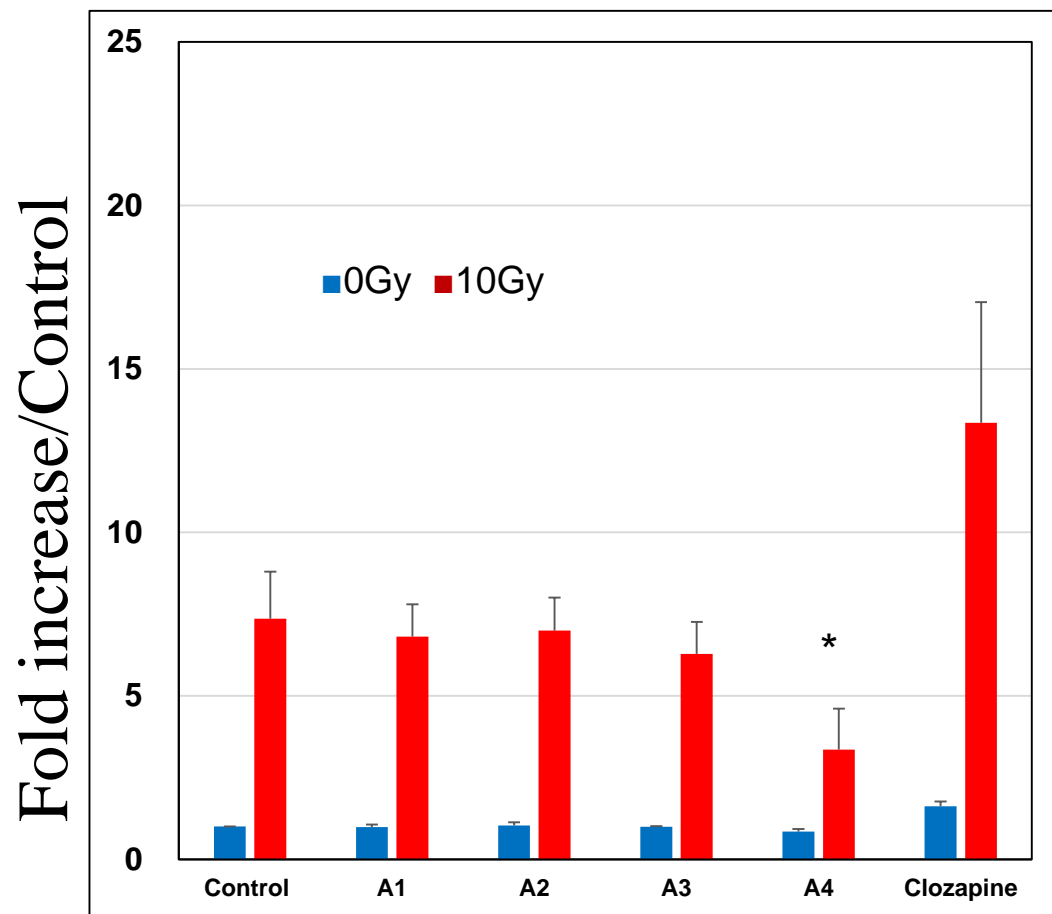
From Setsukinai *et al.* JBC

結果 2-1.APFを用いた細胞内ROSの測定



本研究に用いた6種類の薬剤による放射線照射後の細胞内 $\cdot\text{OH}$ と OCl^- の消去活性についてフローサートメトリーで調べた。A-2、A-3、A-4、クロザピン、オランザピン、に抑制効果はあったが、A-1 に抑制効果は認められなかった。 (*:P<0.001)

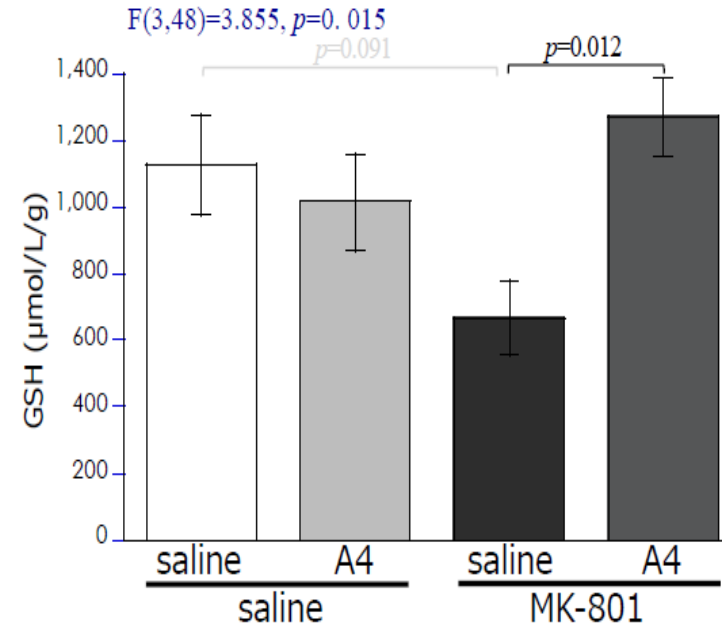
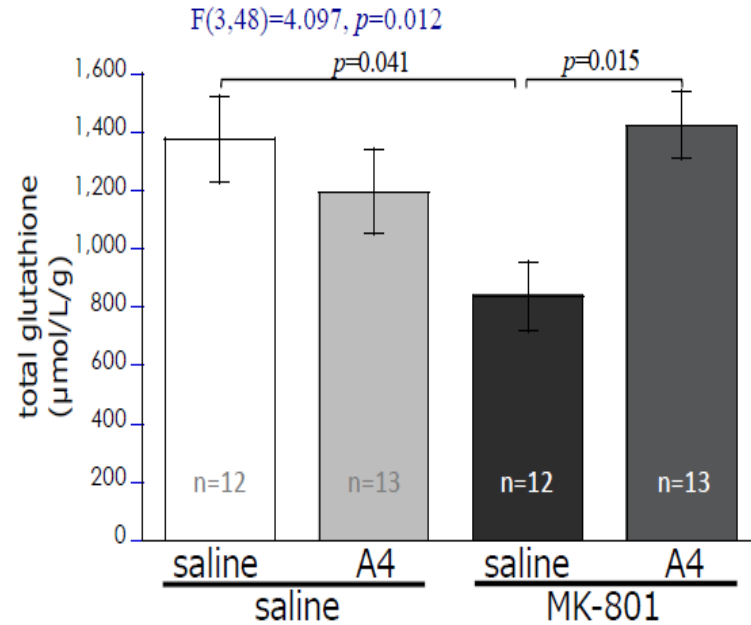
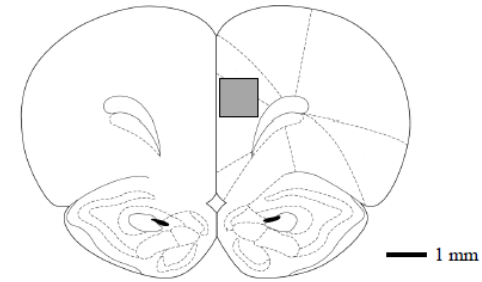
結果2-2.DCFHを用いた細胞内ROSの測定



本研究に用いた6種類の薬剤による放射線照射後の細胞内ROS (H₂O₂, peroxide 他)についてフローサートメトリーで調べた。A4、オランザピンに抑制効果はあったが、A1、A2、A3 に抑制効果は認められなかった。クロザピンは逆に増強効果を示した。(*:P<0.001)

3. *in vivo*(動物モデル):

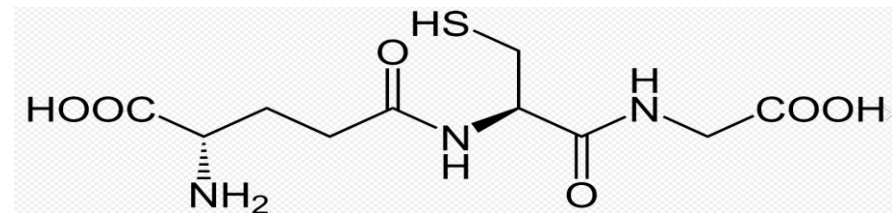
NMDA受容体遮断薬投与ラットにおける内側前頭前野の グルタチオン*1) 減少に対する新規化合物の効果



one-way ANOVA followed by Bonferroni test

グルタチオン総量(還元型+酸化型)は、MK-801投与の統合失調症動物モデルで減少したが、A4投与により、回復した。還元型グルタチオン(GSH)に対しても同様の効果が認められた。なお、A2も同様の効果を示したが、クロザピンやオランザピンには、この効果は認められなかった。

*1) グルタチオン: 生体に存在する抗酸化物質の1つ。還元型と酸化型があり、生体では、90%以上が還元型である。活性酸素種に電子を供与し、還元し、みずからは、酸化される。統合失調症患者の前部帯状回では、その低下が報告されている(Das et al., 2008)。



IV. 適応疾患

- 統合失調症の陰性症状、認知機能障害。
 - その他の中枢神経系疾患（自閉症、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、脳梗塞後遺症）の機能改善
 - クロザピンの重篤な副作用（無顆粒球症）の予防の可能性
- 根拠：

- Glutathioneの前駆物質：N-acetylcysteineの追加投与で、統合失調症の陰性症状と認知機能障害が改善した（Berk et al., 2008, 他）。
- 抗酸化作用のあるサプリメント：スルフォラファンは、統合失調症動物モデルの脳の組織学的変化を改善するだけでなく、自閉症の行動症状にも改善効果を認めた（Singh et al., 2014）。
- 抗酸化作用の強いエダラボンは、日本では**脳梗塞**、米国では**筋萎縮性側索硬化症**の治療薬として、認可されている。
- **アルツハイマー病**の治療薬として開発されたT-817（富山化学）は、抗酸化作用が強く、統合失調症動物モデルにも有効であった（Uehara et al., 2012; Nakamura et al., 2015）。
- このT-817は、**脳梗塞**モデル動物で、リハビリテーションと組み合わせると劇的な改善効果を示した（Abe et al., 2018）。
- 本研究では、クロザピンは一部の酸化ストレス増強作用を示したのに対して、新規化合物は、強い抗酸化作用を示した。

V. まとめ

【発明の名称】タンドスピロン誘導体

1. 抗酸化化合物と5-HT_{1A}受容体部分作動薬との結合。
2. 抗酸化物質アポシニンあるいはそれを改変した化合物と5-HT_{1A}受容体部分作動薬タンドスピロンを改変した化合物との結合：
A-2, A-3およびA-4。
3. *In vitro*, および*in vivo* (統合失調症動物モデル)の実験から、新規化合物は、強い抗酸化活性を示した。
4. 新規化合物は、統合失調症をはじめとする中枢神経系疾患(自閉症、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、脳梗塞後遺症)の機能改善に有効な治療薬となる可能性がある。
5. また、難治性統合失調症の治療薬クロザピンの副作用(酸化ストレスの増強と無顆粒球症)予防に有効である可能性がある。

概要

現行の抗精神病薬は統合失調症の陽性症状に奏功するが、陰性症状や認知機能障害に対する効果は乏しい。陰性症状や認知機能障害を改善するために、抗酸化機能に注目し、セロトニン5-HT_{1A}受容体部分作動タンドスピロンに抗酸化機能を有するアポシニン骨格を付与したハイブリッド神経保護薬を開発した。

従来技術とその問題点

統合失調症の陰性症状や認知機能障害に対する効果的薬品はまだ市場にない。

新技術の特徴・従来技術との比較

- ドーパミン仮説ではなく、GABAニューロンと酸化ストレスを重視した仮説に基づく点が、本技術の新しい点である。
- 我々の実験結果では一部の非定型抗精神病薬がOHラジカル消去能を示したが、新規化合物はin vitroでも動物モデルでも優れた抗酸化機能を示した。
- 5-HT_{1A}受容体作動薬の認知機能改善作用等は従来から知られている。

想定される用途

- ・ 統合失調症治療薬(とくに陰性症状、認知機能障害に対して)
- ・ 酸化ストレスが関与していると推定されるクロザピンの副作用(顆粒球減少症)の改善
- ・ その他の中枢神経疾患の神経保護薬

実用化に向けた課題

- ・ 臨床研究での実証、特にランダム化試験による実証

企業への期待

- ・ 本薬剤に関するGLP基準に基づく非臨床試験 「薬物動態試験 (ADME)」「薬効・薬理試験」「安全性試験 (毒性試験)」等の実施に関する協力
- ・ 神経保護薬に関する共同研究

本技術に関する知的財産権

- ・ 発明の名称 : タンドスピロン誘導体
- ・ 出願番号 : 特願2019-095359
- ・ 出願人 : 富山大学、金沢医科大学
- ・ 発明者 : 近藤 隆、阿部 仁、倉知正佳、
上原 隆

産学連携の経歴(任意)

- 2013年-2014年 立山マシン株式会社と
富山県採択事業で共同研究実施
- 2016年-2018年 サポイン事業で
誠南工業株式会社と共同研究実施
- 2019年- サポイン事業に採択

お問い合わせ先

富山大学

産学連携推進センター 小前 憲久

TEL 076-434-7196

FAX 076-434-5138

e-mail komae@ctg.u-toyama.ac.jp