

AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

旭川医科大学研究フォーラム (2015.2) 15:4-12.

PI3 kinase/Akt シグナル活性保持作用を持つ医薬品のパーキンソニズム抑制効果と治療薬の開発

田崎 嘉一

依頼論文

PI3 kinase/Akt シグナル活性保持作用を持つ医薬品の パーキンソニズム抑制効果と治療薬の開発

田 崎 嘉 一*

【要 旨】

パーキンソン病治療の主役は、進行するドパミン神経細胞死により失われたドパミンを補充する薬物療法を中心とした対症療法であるが、長期服用による問題点も多い。現在までに、病気の進行を遅らせるまたは止められることができる、いわゆるドパミン神経細胞死抑制作用を有する原因療法に基づく薬剤は開発されておらず、その登場が切望されている。著者らは、これまでに市販されている薬剤の中から、パーキンソン病に関連した神経細胞死を抑制できるオキシカム系非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) を見つけ出し、その抑制メカニズムが NSAIDs の抗炎症作用発現メカニズムのシクロオキシゲナーゼ (COX) 抑制ではなく、phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt シグナル活性保持作用に基づく新規作用であることを見出した。さらに本メカニズムにより、オキシカム系 NSAIDs がパーキンソン病動物モデルでも薬効を示すことが明らかとなり、本薬剤の臨床応用の可能性が高まった。本薬剤は、すでに市販されている薬剤であり、早い臨床応用が可能と考えられる。

キーワード オキシカム系 NSAIDs、meloxicam、phosphatidylinositol 3-kinase (PI3 kinase)、Akt、パーキンソン病、神経細胞死抑制薬

1. はじめに

パーキンソン病は、脳の黒質から線条体へと投射するドパミン神経が選択的に細胞死を起こすことで運動障害が起こる神経変性疾患である¹⁾。パーキンソン病治療は、失われたドパミンを補充する薬物療法が主流でドパミンの前駆体であるレボドパが著効を示すが、対症療法であるため進行を止めることができず、長期に服用することで薬効の低下や日内変動など様々な問題が起こることが知られている^{2),3)}。これまでもドパミン神経細胞死を抑制する薬剤が開発中であったが、臨床応用されているものはなく、神経細胞死抑制薬の登場が望まれている⁴⁾。

一方で、パーキンソン病におけるドパミン神経細胞死の原因は十分にはわかっていない。弱毒性神経毒の蓄積や酸化ストレスなどが原因の候補に挙げられている

が、脳内の免疫活性化による神経変性もその一つであり^{5),6)}、初期のパーキンソン病患者の脳の黒質線条体系神経周辺でも免疫活性化による炎症反応が見られている⁷⁾。この炎症反応が神経細胞死を引き起こすのか、神経細胞死の結果として起こるのかは議論の分かれているところではあるが、いくつかの非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) がパーキンソン病の進行を抑制するという報告もあり⁸⁾⁻¹⁰⁾、脳内における炎症反応を阻害すれば、パーキンソン病の進行を抑制できる可能性が示されている。NSAIDsによる炎症反応抑制は、プロスタグランジン類の産生を担う cyclooxygenase (COX) を阻害することによるものであり、特に誘導型の COX-2 を阻害すると、パーキンソン病の黒質で見られている活性化マクログリアによる炎症性サイトカインの産生を抑制し、神経変性を遅延するものと考えられている。しかし、COX-2 は神経細胞にも発

*旭川医科大学病院 薬剤部

現しており、これを直接抑制することにより神経細胞死を抑制できるか否かについては、本研究着手当時の2007年ごろには明らかになっていなかった。

そこで、NSAIDsが直接、神経細胞のCOXを抑制して神経細胞死を抑制するかについての検討を行うこととした。神経細胞としては、ヒト神経線維芽細胞由来のSH-SY5Y細胞を用い、ヒトでもパーキンソン病様症状を発症する1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)の活性代謝物である1-methyl-4-phenyl pyridinium (MPP⁺)により細胞死を惹起し、化合物の細胞死抑制作用の検討を行なった。

2. パーキンソン病関連神経毒 MPP⁺ による神経細胞死に対する NSAIDs の細胞死抑制効果¹¹⁾

まず、NSAIDsとしては、代表的な医薬品のindomethacin、ibuprofen、meloxicamを選び、COX-2選択性の高い阻害物質のCAY10404、NS-398についても神経細胞死抑制作用を評価した。神経細胞は、前

述のSH-SY5Y培養細胞を用い5mM MPP⁺を24時間暴露することにより神経細胞死を惹起し、細胞生存率 (Cell viability) と細胞死により細胞から漏出するLDHの放出 (LDH leakage) を評価した。COX阻害薬は、MPP⁺の暴露と同時に各濃度で添加した。その結果、どちらの評価系でも濃度依存的な神経細胞死抑制作用を明確に示したのは、meloxicamのみであった(図1)。他のNSAIDsは、神経細胞に直接働く細胞死抑制効果を持たないと考えられる。meloxicamは、よりCOX-2選択的な薬剤であるが、CAY10404、NS-398の方がCOX-2選択性は高い。また、COX-1阻害活性は、indomethacinが評価したい薬剤の中で最も高く、これらのことを総合すると、本系におけるmeloxicamの神経細胞死抑制作用は、COX阻害によるものではないことが示唆された。

3. meloxicamによる神経細胞死抑制の新規メカニズム¹¹⁾

meloxicamによる神経細胞死抑制効果が、COX阻

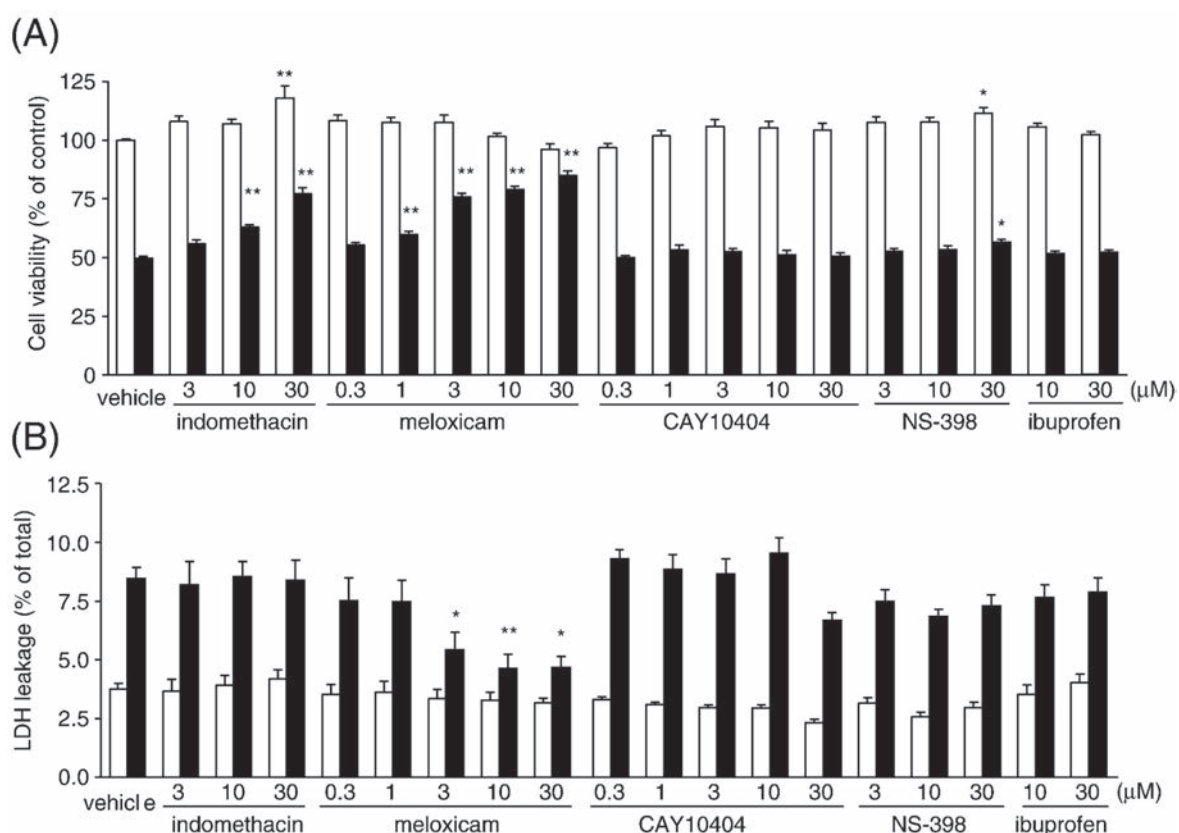


図1 MPP⁺暴露によるSH-SY5Y神経細胞死に対する各NSAIDsの効果
(A) cell viability、(B) LDH assaysであり、5mM MPP⁺存在下は黒いカラム、非存在下は白いカラム。
データは、mean ± SEM; p < 0.05 (*), p < 0.001 (**) Tukey's test after ANOVA。(文献11)

害活性に依存していないことから、細胞内の生存シグナルとして extracellular signal-regulated kinase (ERK) と PI3K/Akt の経路の関与が想定され、これらについて検討した。前述の SH-SY5Y 細胞を用いた MPP⁺ による神経細胞死の系を用い、mitogen activated protein-ERK kinase (MEK) 経路の阻害剤 PD985059 または PI3K 阻害剤の LY294002 を共存させた場合に meloxicam の細胞死抑制効果がどのように変化するかを前節と同様、cell viability と LDH leakage で評価した。その結果、meloxicam の神経細胞死抑制効果は、どちらの評価系でも PD985059 共存下では変化がなかった (図 2 A,C) のに対し、LY294002 共存下では、細胞死抑制効果が消失した (図 2 B,D)。

さらに、PI3K/Akt 経路の関与を確かめるため、細胞を破碎し、ウエスタンブロット法により Akt のリン酸化量を画像解析装置 (LAS3000, FUJIFILM 社製) にて定量した。リン酸化 Akt (pAkt) は、Akt の活性化体であり Akt 経路が活性化している状態を示している。細胞生存シグナルの変化は、細胞死に先立っ

て変化すると考えられたため、アッセイ開始 4 時間後と 18 時間後について検討を行った。その結果 (図 3)、リン酸化 Akt 量は、MPP⁺ による細胞死が始まる 8 時間より前の 4 時間の時点で有意に減少しており、meloxicam を共存させることによりリン酸化 Akt 量を正常 (コントロール) レベルに保持していることが分かった (図 3A)。また、18 時間後でも同様の結果 (図 3B) であり、total Akt 量、β-actin 量に変化がなかったことから、細胞死によるタンパク量自体の変化によるものではなく、リン酸化割合の変化であることが明らかとなった。以上のことより meloxicam の神経細胞死抑制の作用機序は、Akt 活性保持作用によることが示唆された。

次に、meloxicam が MPP⁺ による PI3K/Akt シグナル抑制を阻害するだけでなく、その後の Akt シグナル下流の apoptosis も阻害しているかを検討した。apoptosis の評価には DNA 断片化と apoptosis 実行酵素の caspase-3 の活性化指標である caspase-3 断片化を検討した。その結果、どちらの系においても MPP⁺ に

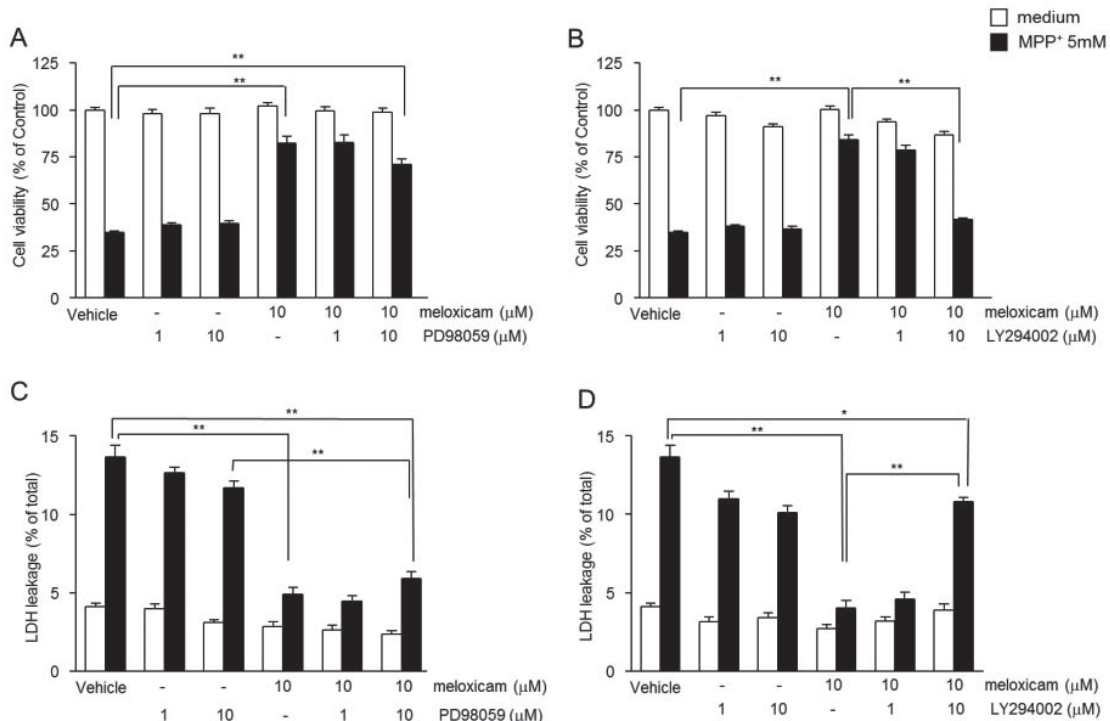


図 2 meloxicam による神経細胞死抑制作用に対する MEK 阻害剤 (PD985059) および PI3K 阻害剤 (LY294002) の効果

(A, B) cell viability、(C, D) LDH アッセイであり、5mM MPP⁺ 存在下は黒いカラム、非存在下は白いカラム。共存させる PD985059 (A, C) or LY294002 (B, D) の濃度は、図中に示した。

データは、mean ± SEM; p<0.05 (*), p<0.001 (**). Tukey's test after ANOVA. (文献 11)

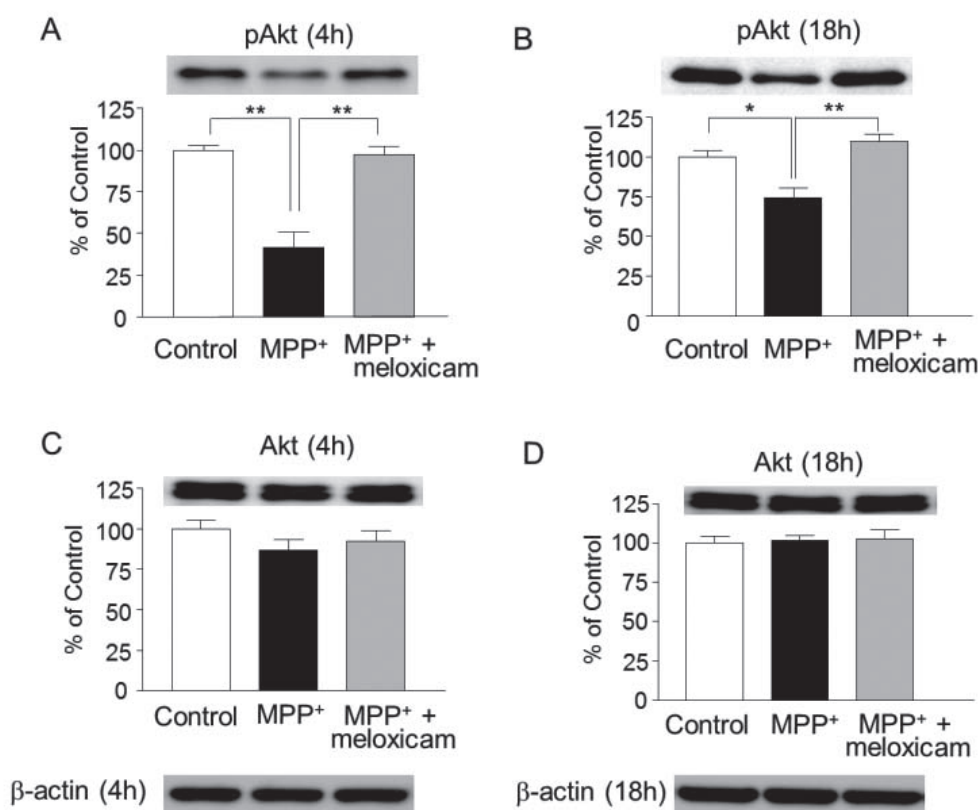


図3 Aktリン酸化量に対する meloxicam の効果
Western blotting によるリン酸化 Akt 量 (A, B) および total Akt 量 (C, D) と対応する β -actin 量
インキュベーション時間は、4h (A, C) および 18h (B, D)。MPP⁺ (5 mM), meloxicam (30 μ M)
データは、mean \pm SEM (n=3 or 4)。p<0.05 (*), <0.001 (**) by the one-way factorial ANOVA after the Tukey's test. (文献 11)

よる DNA 断片化および caspase-3 断片化を meloxicam が阻害し、さらに PI3K 阻害剤の LY294002 により meloxicam の効果は消失し、再び断片化が起こることが明らかとなった (図4)。従って、meloxicam は PI3K/Akt の活性保持作用により MPP⁺ 誘発の apoptosis による神経細胞死を抑制していることが確かめられた。

4. meloxicam による ERK、JNK、p38 シグナルに対する効果¹¹⁾

次に、meloxicam の神経細胞死抑制作用が PI3K/Akt 経路に特異的なものか否かを確かめるために、細胞生存シグナルの ERK リン酸化、細胞死促進シグナルの JNK、p38 リン酸化を Western blotting により検討を行った。実験は、MPP⁺ 単独添加および meloxicam 共存下における変化を無添加の場合と比較した。その結果、meloxicam の神経細胞死抑制作用を説明できる ERK、JNK、p38 のシグナル変化は見られず、これらのシグ

ナル経路は、関与していないことがわかった (図5)。meloxicam は、PI3K/Akt 経路を特異的に活性保持していることが明らかとなった。

5. meloxicam と同様の神経細胞死抑制作用を発揮する化学構造特異性の検討¹²⁾

前述のように、MPP⁺ 誘発の神経細胞死を抑制する化合物は、調べた5化合物の中では meloxicam だけであった。しかし、この作用が meloxicam だけに見られる作用であるのか、他のオキシカム系化合物や他の系統の NSAIDs でも見られるのか不明であった。そこで、神経細胞死抑制作用における構造特異性の検討を行った。ほぼすべての NSAIDs の母核を含む 13 化合物(サリチル酸系 3 化合物、コキシブ系 6 化合物、オキシカム系 3 化合物、ポリフェノール系 1 化合物) を選択し、神経細胞死抑制作用をこれまでと同様 cell viability と LDH leakage 系で評価した。その結果、調べた全化合物のうち両方の系で神経細胞死抑制作用を示したの

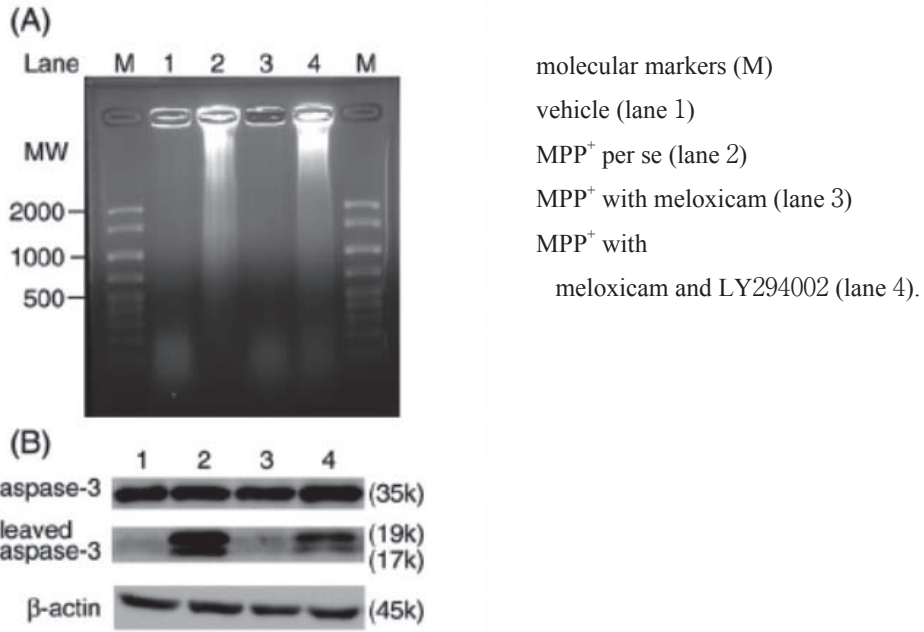


図4 MPP⁺ 誘発 apoptosis に対する meloxicam の効果
DNA 断片化 (A) と Western blotting による caspase-3 断片化量と β -actin 量 (B)
インキュベーション時間は 24h (A) および 18h (B)。MPP⁺ (5 mM)、meloxicam (30 μ M)、
LY294002 (10 μ M)。(文献 11)

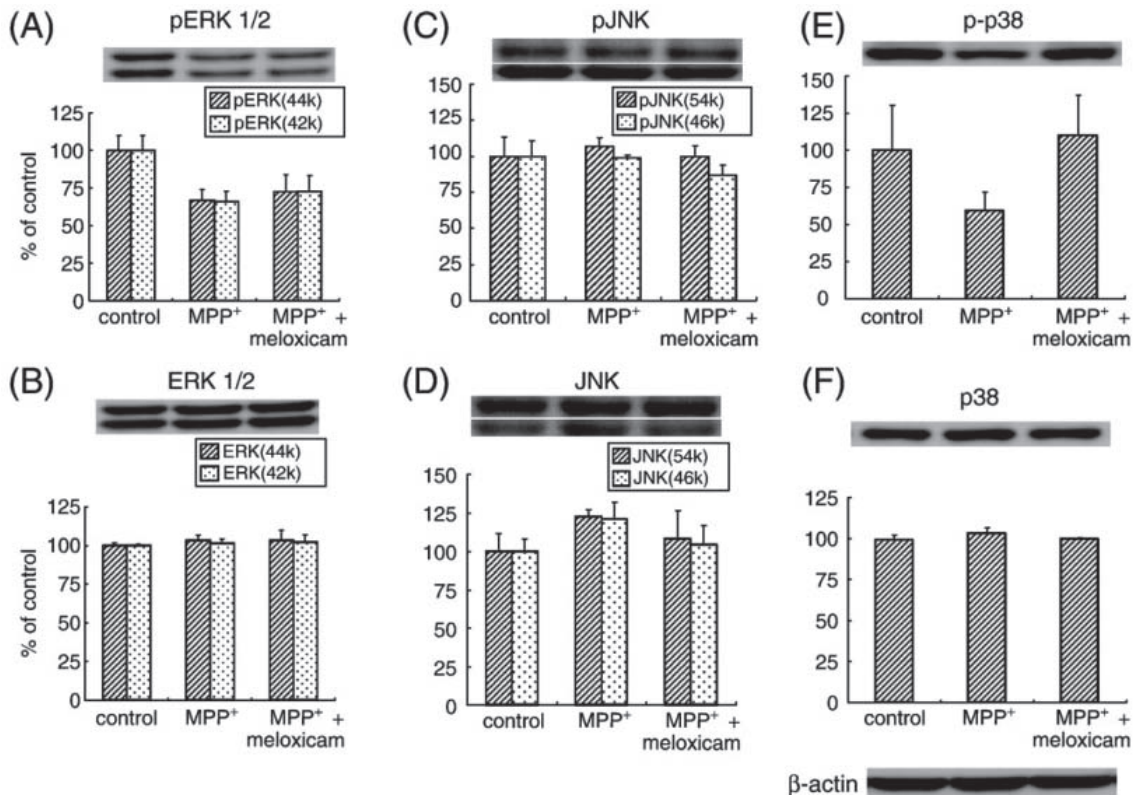


図5 ERK、JNK、p38 リン酸化に対する meloxicam の効果
ERK (A, B)、JNK (C, D)、p38 (E, F) のそれぞれリン酸化体量と total 量、対応する β -actin 量を示した (文
献 11)。
インキュベーション時間は 4h。MPP⁺ (5 mM)、meloxicam (30 μ M)。各値は mean \pm SEM (n=3-4)
どの 2 グループにも有意差なし (one-way ANOVA)。

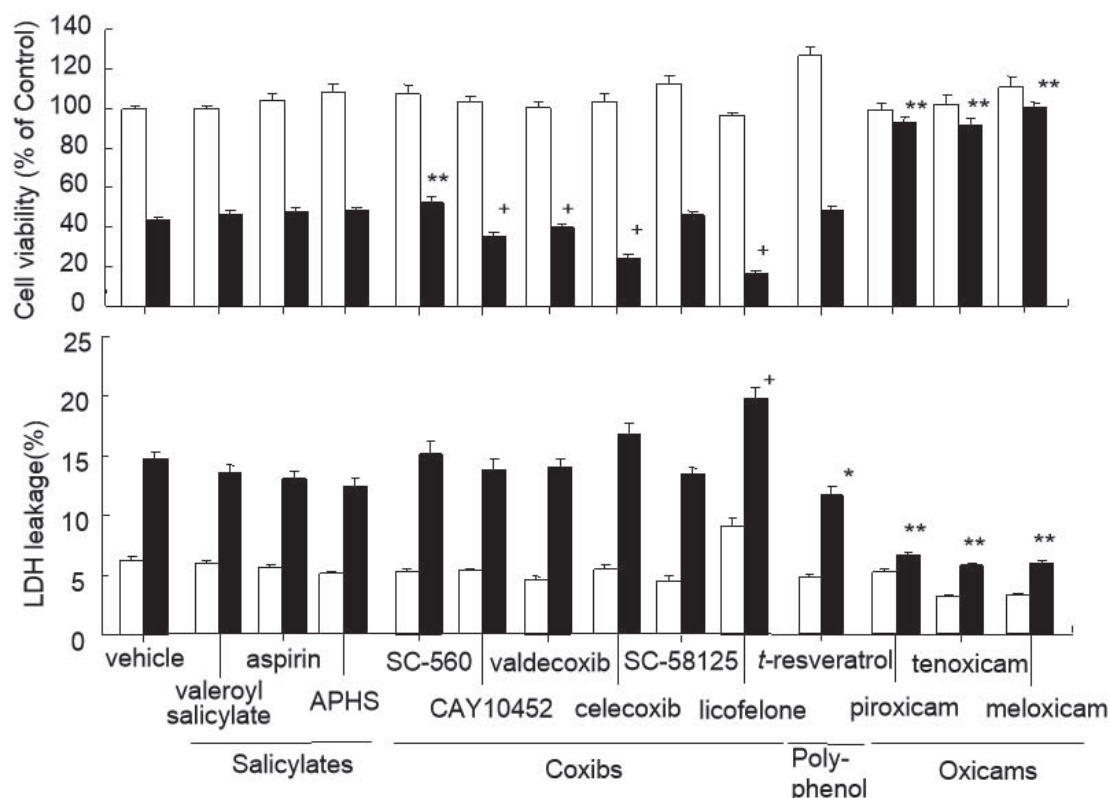


図6 MPP⁺ 暴露による SH-SY5Y 神経細胞死に対する各 NSAIDs の効果
 (A) cell viability、(B) LDH assays であり、5mM MPP⁺ 存在下は黒いカラム、非存在下は白いカラム。各化合物は 30 μ M で評価した。
 データは、mean \pm SEM; p<0.05 (*), p<0.001 (**), P<0.05 (+) は、有意な悪化を示す。
 Tukey's test after ANOVA. (文献 12)

は、オキシカム系のみの3化合物であった。従って、meloxicam 以外のオキシカム系化合物（医薬品）でも同様の神経細胞死抑制が見られた（図6）。さらに、meloxicam 以外の piroxicam、tenoxicam による神経細胞死抑制作用も PI3K/Akt 経路を介しているかを検討した。pAkt のタンパク量を Western blotting で検討したところ、meloxicam と同様に pAkt 量の保持作用が見られ、PI3K 阻害剤の LY294002 によりこれらの保持作用は消失した（図7）。このように、オキシカム系骨格のみが、他の骨格では見られない細胞死抑制作用を持つことから、オキシカム系構造が作用発現に必須であると考えられた（図8）。

6. MPTP 投与 in vivo 慢性パーキンソン病モデル動物における行動異常およびドパミン神経変性に対する meloxicam の保護作用¹³⁾

細胞培養系においては、上記のように PI3K/Akt 活性の保持作用によって meloxicam が神経細胞死を抑制

することが分かったが、in vivo においても同様のメカニズムで神経細胞死を抑制するかについて検討を行った。パーキンソン病モデルとしては、最もよく汎用され、実際のパーキンソン病の細胞死にも類似する慢性パーキンソン病モデルを用いた。このモデルは、C57BL マウスに MPTP 1日1回 30mg/kg を5日間投与して作製するもので、このモデルにおいて meloxicam の有効性を検討した。方法は、行動薬理学的評価法として Pole test を用いた。この方法は、マウスにおけるパーキンソン病様症状を評価するもので、マウスを高さ 55cm、太さ 8mm のポールに上向きにつかませ、マウスが下へ行こうとして下へ向くまでの時間 (T_{turn}) とスタートから床まで到達する時間 (T_{LA}) を計測し、時間がかかるほど行動異常が大きいとするものである。また、ドパミン神経変性の評価には、ドパミン神経細胞のマーカーとして用いられる tyrosine hydroxylase (TH) 量をウエスタンブロットで定量した。定量した部位は、パーキンソン病で変性するドパミン神経が存在する黒質を含む中脳とその神経投射先の

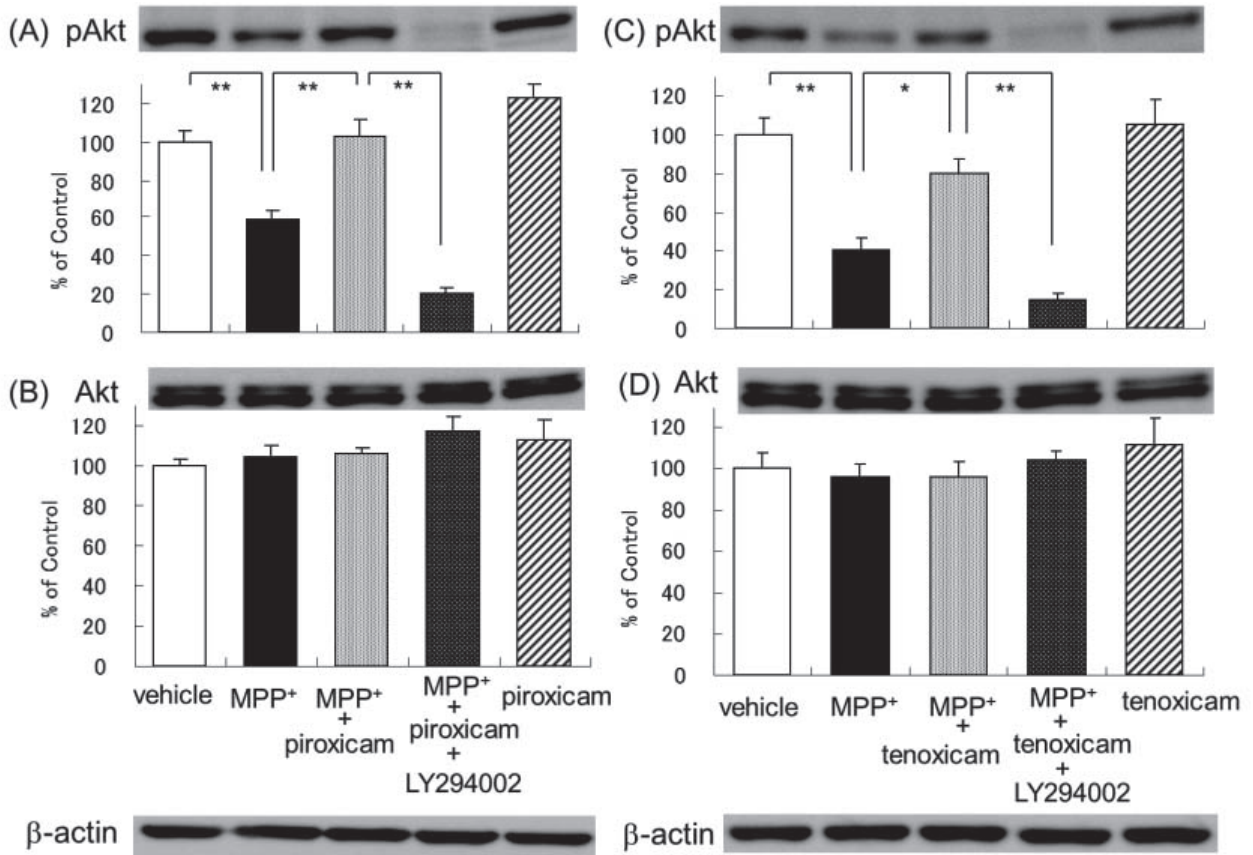


図7 piroxicam および tenoxicam の Akt リン酸化に対する影響
 pAkt (Ser 473; A, C)、total Akt (B, D) および β -actin 量を Western blotting で定量した。インキュベーションは 4h、MPP⁺ (5 mM)、PI3K 阻害剤 LY294002 (10 μ M)。データは、mean \pm SEM (n=4); p<0.05 (*), p<0.001 (**) Tukey's test after ANOVA。(文献 12)

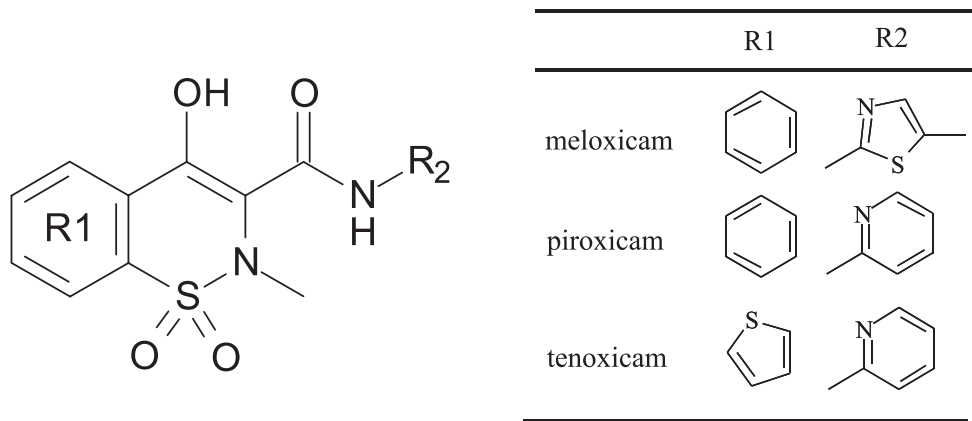


図8 MPP⁺ 毒性に対して神経保護作用を示す必須化学構造 (文献 12)

線条体を測定した。また中脳においては、meloxicam が動物モデルにおいても PI3K/Akt 経路を介して神経細胞死を抑制しているかを検証するため、pAkt および Akt、 β -actin 量も測定した。meloxicam は、MPTP

投与と同時に 1日 1回 10 mg/kg を 14日間投与し、15日目に Pole test を行い 16日目に脳を部位分けして採取し、Western blotting 用のサンプル調製を行った。その結果、meloxicam の投与により、MPTP 投与に

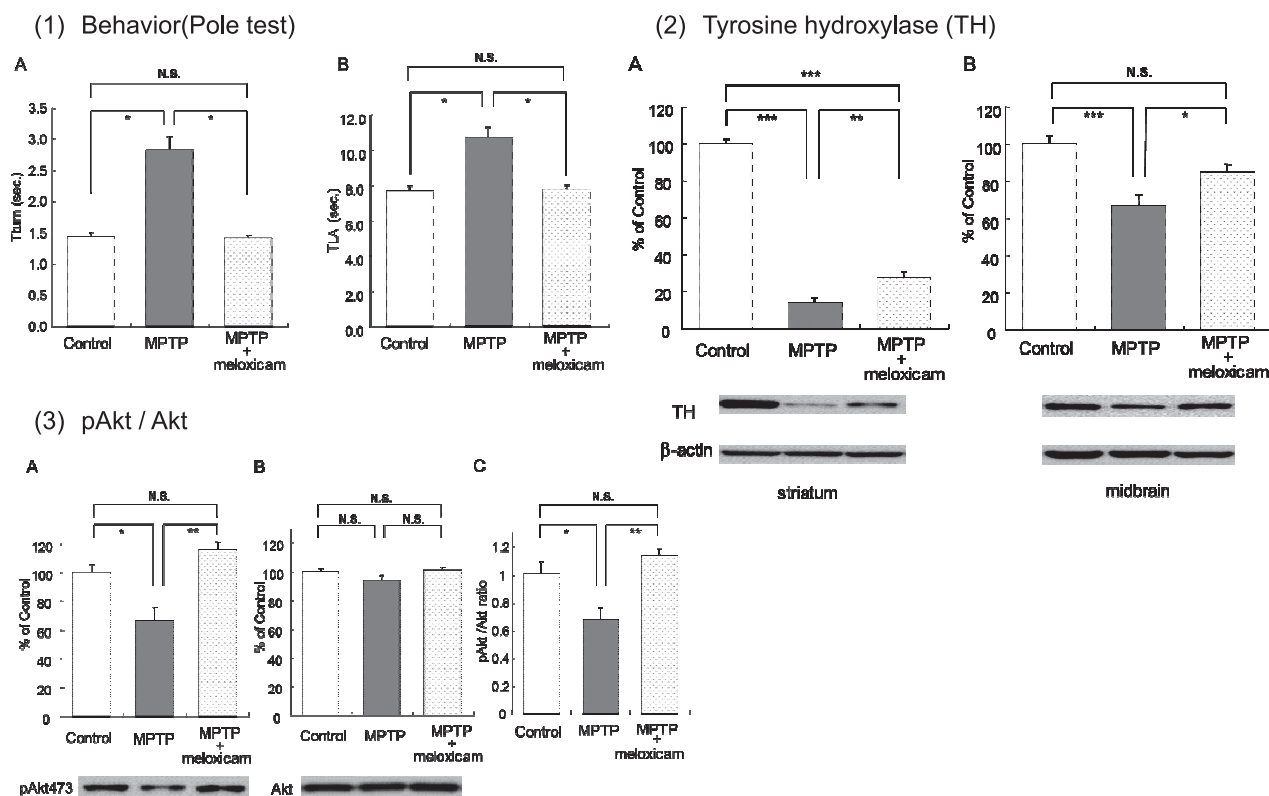


図9 MPTP誘発慢性パーキンソン病モデルマウスに対する meloxicam の効果
 (1) 行動異常評価の Pole test : A: Tturn, B: TLA (2) Tyrosine hydroxylase 量 ; western blotting による定量
 A: 線条体, B: 中脳 (3) A: pAkt 量, B: total Akt 量, C: pAkt / Akt 比。 マウスには 30mg/kg MPTP 5 日間皮下投与および 10mg/kg meloxicam 14 日間腹腔内に同時投与。Control は、生理食塩水投与。(文献 13)

よる Pole test での時間遅延が有意に改善し、慢性パーキンソン病モデルにおいても行動異常を改善することが明らかとなった (図 9 (1))。また、脳の線条体および中脳における MPTP による TH 量の減少も meloxicam は有意に抑制した (図 9 (2))。したがって、黒質線条体系のドパミン神経が保護されていると考えられ、それにより行動異常も改善されたと考えられた。さらに、このドパミン神経の細胞体がある中脳においてリン酸化 Akt 量の保持作用も見られた (図 9 (3))。これにより、SH-SY5Y 細胞で見られた meloxicam の神経保護作用と同様に、MPTP 投与慢性パーキンソン病モデルにおいても、PI3K/Akt 保持作用を介して神経細胞死を抑制しているものと考えられた。

7. 今後の展望

以上より meloxicam を代表とするオキシカム系 NSAIDs は、パーキンソン病進行抑制薬としての可能性が考えられる。オキシカム系 NSAIDs は、すでに特

許の切れた薬剤ではあるが、すでに他の疾患では使用されている薬剤なので、倫理的問題がクリアされれば、試験的な治験や、レトロスペクティブな疫学研究によって、パーキンソン病に対する効果を明らかにできると思われる。また、現在、オキシカム系薬剤の誘導体を共同研究にて合成し、一部は、細胞で評価し有効性を示す化合物も見つかっている。今後は、化合物特許の取得できる薬剤を見出し、医薬品開発へとつなげていきたい。

本研究に関連する利益相反はありません。本研究は、JSHP 科研費 22590129 および 25460204 の助成を受けたものです。

参考文献

1) Sian, J., Gerlach, M., Youdim, M.B., Riederer, P., 1999. Parkinson's disease: a major hypokinetic basal ganglia disorder. *J. Neural. Transm.* 106, 443-476.

- 2) Marek, K., Jennings, D., Seibyl, J., 2002. Do dopamine agonists or levodopa modify Parkinson's disease progression? *Eur. J. Neurol.* 9 (Suppl 3), 15-22.
- 3) Fahn, S., the Parkinson Study Group, 2005. Does levodopa slow or hasten the rate of progression of Parkinson's disease? *J Neurol.* 252 suppl 4, IV37-IV42.
- 4) Koller, W.C., Tse, W., 2004. Unmet medical needs in Parkinson's Disease. *Neurology* 62, S1-8.
- 5) McGeer, P.L., Itagaki, S., Boyes, B.E., McGeer, E.G., 1988. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 38, 1285-1291.
- 6) Whitton, P.S., 2007. Inflammation as a causative factor in the aetiology of Parkinson's disease. *Br. J. Pharmacol.* 150, 936-976.
- 7) Ouchi, Y., Yoshikawa, E., Sekine, Y., Futatsubashi, M., Kanno, T., Ogusu, T., Torizuka, T., 2005. Microglial activation and dopamine terminal loss in early Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 57, 168-175.
- 8) Chen, H., Zhang, S.,M., Hernan, M.A., Schwarzschild, M.A., Willett, W.C., Colditz, G.A., Speizer, F.E., Ascherio, A., 2003. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of Parkinson disease. *Arch. Neurol.* 60, 1059-1064.
- 9) Hernan, M.A., Logroscino, G., Garcia Rodriguez, L.A., 2006. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the incidence of Parkinson disease. *Neurology* 66, 1097-1099.
- 10) Ton, T.G., Heckbert, S.R., Longstreth, W.T., Jr., Rossing, M.A., Kukull, W.A., Franklin, G.M., Swanson, P.D., Smith-Weller, T., Checkoway, H. 2006. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 21, 964-969.
- 11) Tasaki, Y., Omura, T., Yamada, T., Ohkubo, T., Suno, M., Iida, S., Sakaguchi, T., Asari, M., Shimizu, K., Matsubara, K., 2010. 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. *Brain Res.* 1344, 25-33.
- 12) Tasaki, Y., Yamamoto, J., Omura, T., Noda, T., Kamiyama, N., Yoshida, K., Satomi, M., Sakaguchi, T., Asari, M., Ohkubo, T., Shimizu, K., Matsubara, K. 2012. 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.
- 13) 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. 2012. Meloxicam ameliorates motor dysfunction and dopaminergic neurodegeneration by maintaining Akt-signaling in a mouse Parkinson's disease model. *Neurosci. Lett.* 521(1), 15-19.