

学位論文題名

脳虚血に伴う脳神経細胞死に対する オロト酸の作用に関する研究

学位論文内容の要旨

脳卒中はがん、心臓病に次いで死亡原因の上位を占める疾患であり、一般的に脳出血と脳梗塞に分類される。脳梗塞では脳血管の閉塞によって循環障害をきたし、脳組織の壊死を呈する。

虚血により脳へのエネルギー供給が断たれると、その結果個々の細胞はその恒常性を保つことができなくなり、この状態が続くことで死に至る。またたとえ短時間の血流の遮断であっても一旦虚血にさらされた神経細胞は、血流が再開されることによって一時的にはエネルギー代謝が回復するものの、数日後に神経細胞が死に至る現象、すなわち遅発性神経細胞死という現象が知られるようになり、虚血による神経細胞死の機序は単にエネルギー代謝の障害のみではなくより複雑なものであると考えられるようになった。

脳虚血に伴う細胞内の変化として、細胞内のヌクレオチドの変動、特にピリミジンヌクレオチド濃度が低下することが知られている。オロト酸はピリミジンヌクレオチドの前駆体である。オロト酸の合成は、ピリミジンヌクレオチド生合成の律速であるため、外部からのオロト酸の供給は脳内ピリミジンヌクレオチドの濃度を上昇させ、それに続くピリミジンヌクレオチドが関与するさまざまな生体反応に影響を及ぼすと考えられる。

本研究では、脳虚血の病態に対しオロト酸を供給することは低下したピリミジンヌクレオチド濃度を上昇させ、結果として虚血後の神経細胞の障害を軽減する可能性があるものと考え、オロト酸の神経細胞保護作用についての研究を行った。

1. 一過性前脳虚血に伴う神経細胞死に対するオロト酸の作用

一過性前脳虚血による遅発性神経細胞死に対するオロト酸の神経細胞保護作用を検討した。虚血処置の1時間後にオロト酸 300 mg/kg を腹腔内投与した場合、ほぼ完全に遅発性神経細胞死が抑制された。

オロト酸による遅発性神経細胞死抑制作用の Therapeutic Time Window を検討した結果、血流再灌流 24 時間後に投与した場合でも、遅発性神経細胞死がほぼ完全に抑制された。本研究の結果は、オロト酸による遅発性神経細胞死抑制作用が用量依存的であり、また他の化合物には認められない、広い Therapeutic Time Window をもつことを示している。

2. オロト酸の神経細胞保護作用の機序

本研究ではマウス前脳皮質アストロサイト初代培養系において、低酸素、再酸素化負荷による細胞内代謝に及ぼすオロト酸の作用を検討した。その結果、オロト酸はアストロサイトの低酸素、再酸素化という負荷に伴うエネルギー代謝障害、脂質代謝障害、核酸代謝障害に対し改善作用を有することが明らかとなった。また虚血侵襲に伴う神経細胞における細胞内代謝障害に対しても同様に抑制作用もつことが推測された。これらの結果は、オロト酸が虚血に伴う細胞内代謝障害を改善し、その結果神経細胞を保護する効果を持つことを示唆している。

3. オロト酸のプロドラッグ化、およびその一過性前脳虚血に伴う神経細胞死に対する効果

オロト酸は水溶性が低く、また脳への移行性も低い。そのため、末梢から投与する場合脳内へ十分量のオロト酸を供給するためには、末梢から高用量を懸濁液として投与しなければなら

ない。本研究においては YM-39558 (オロト酸エチルエステル) が脳内へ効率よくオロト酸を供給することが可能な、オロト酸のプロドラッグであることを示した。YM-39558 は末梢から投与した場合、効率よく脳内へ移行し、そこで加水分解を受け活性本体であるオロト酸となる。

この YM-39558 により、オロト酸と同様、一過性前脳虚血による遅発性神経細胞死を抑制する効果が確認された。またこの時のオロト酸の脳脊髄液中濃度を検討した結果、効果発現には脳脊髄液中オロト酸の濃度が数十 μM 以上、かつこの濃度が低下することなく長時間維持されることが必要であることが明らかとなった。

ラット、イヌ、ヒトにおける YM-39558 の代謝、分解を検討した結果より、YM-39558 を末梢投与した場合、イヌ、ヒトではラットと比較し、より効率よく脳内へオロト酸を供給することが可能であることが判った。また YM-39558 の水溶性はオロト酸の約 5 倍であった。以上より YM-39558 をヒトに応用する場合には水溶液として静脈内投与が可能であり、またオロト酸自体を投与する場合に比べ、より低用量の末梢投与で脳内に必要量のオロト酸を効率よく供給できると考えられた。

4. ネコ中大脳動脈閉塞局所脳虚血に伴う脳波、脳血流の変化と梗塞巣形成の関係

ネコの中大脳動脈閉塞局所脳虚血モデルにおいて、脳波、脳血流、および梗塞巣の関係を検討した結果、電気生理学的機能を維持するのに必要となる脳血流の閾値が 10 ml/min/100g と 20 ml/min/100g の間に存在すること、この血流閾値を下回る程度の虚血状態の個体においては 6 時間という時間の要因が加わることで、均一に広範囲が梗塞となることが判った。また、中大脳動脈閉塞後 15 分間の脳波を観察することにより虚血の程度を推測することが可能であり、この間に脳波の回復が認められない個体、すなわち上記の血流閾値を下回る程度の虚血状態の個体を選択することにより、虚血負荷の程度が均一な個体群を作成することが可能であることが明らかとなった。

5. ネコ中大脳動脈閉塞局所脳虚血に伴う梗塞巣進展に対する YM-39558 の作用

ネコの中大脳動脈閉塞局所脳虚血モデルにおいて、YM-39558 の神経細胞保護作用を検討した。その結果、 11.8 mg/kg/h 静脈内持続投与により、大脳皮質の梗塞巣進展が抑制された。この時の脳脊髄液中のオロト酸の濃度を検討した結果から、オロト酸が梗塞巣の進展を抑制するには、数十 μM の濃度が必要であることが明らかとなった。この濃度は、一過性前脳虚血による遅発性神経細胞死を抑制するのに必要となる脳脊髄液中オロト酸濃度、さらに *in vitro* 実験系において低酸素、再酸素化負荷に伴う細胞内代謝障害を抑制する作用を示したオロト酸濃度と一致していた。以上より、オロト酸は数十 μM の濃度で、虚血侵襲に対し神経細胞保護作用をもつものと考えられる。

オロト酸は水溶性が低く、そのため高用量を投与した場合、腎臓に結晶が析出し腎毒性を示した。これに対し、YM-39558 の有効用量は低減され、またその水溶性はオロト酸の約 5 倍であったことより、腎臓には結晶が析出せず腎毒性を回避できるものと予想した。しかしながら、ネコに YM-39558 を静脈内投与した場合、検討したいずれの用量群においても腎臓の集合管内に析出結晶が存在する個体が認められた。いずれの個体においても集合管に組織傷害は認められなかったものの、腎障害を引き起こす可能性を完全に否定し得ない。そのため、ヒトに応用するには安全性の観点より危険であると結論した。また、YM-39558 の有効用量に関しても、ヒトへの投与量に換算した場合、さらなる低用量化が望まれる。さらに性質を改善したオロト酸プロドラッグの開発が必要である。

今後、脳虚血による神経細胞障害の過程を解明する上で、オロト酸がその研究ツールとしての一役を担うことと共に、オロト酸の神経細胞保護作用が明らかにされ、さらにはそれに基づいて医薬の開発が成されることを切望する。

学位論文審査の要旨

主査	教授	野村靖幸
副査	教授	長澤滋治
副査	助教授	高橋和彦
副査	助教授	大熊康修

学位論文題名

脳虚血に伴う脳神経脳細胞死に対する オロト酸の作用に関する研究

申請者は、脳虚血に伴う脳神経細胞死についての研究を進め、ピリミジンヌクレオチド生合成過程における前駆体であるオロト酸が脳虚血に伴う神経細胞死を抑制することを見出し、その作用機序を検討、さらにYM-39558 (オロト酸エチルエステル) が脳内へ効率よくオロト酸を供給することができるオロト酸のプロドラッグであること、また脳虚血モデル動物においてYM-39558を投与することにより脳虚血に伴う神経細胞死が著明に抑制されるという新知見を得、本学位論文として申請した。

オロト酸が、一過性前脳虚血に伴う海馬CA1領域における遅発性神経細胞死を抑制すること、またこの効果は虚血再灌流の24時間後に投与した場合にも認められることを見出した。これは、臨床の現状において脳虚血病態の発症から治療開始までにある程度の時間を要することを鑑み、非常に大きなメリットとなり得る性質であることを示唆した。

次に、オロト酸がアストログリア細胞の低酸素、再酸素化負荷に伴うエネルギー代謝障害、脂質代謝障害、核酸代謝障害に対し明確な改善効果をもつことを示し、これらの事実からオロト酸は虚血侵襲に伴う細胞内代謝障害を改善し、その結果神経細胞を保護するものと示唆した。

オロト酸は水溶性が低く、また脳への移行性も低い。そのため、末梢から投与した場合脳内へ十分量のオロト酸を供給するためには、末梢から高用量を懸濁液として投与しなければならない。今回、申請者はYM-

39558が脳内へ効率よくオロト酸を供給することが可能な、オロト酸のプロドラッグとなり得ることを見出した。YM-39558は、末梢から投与された場合、効率よく脳内へ移行し、そこで加水分解を受け活性本体であるオロト酸となる。このYM-39558を末梢投与することにより、一過性前脳虚血による遅発性神経細胞死が抑制されることを示した。またこの時のオロト酸の脳脊髄液中濃度を検討した結果、効果発現には脳脊髄液中オロト酸の濃度が数十 mM 以上、かつこの濃度が低下することなく長時間維持されることが必要であることを明らかにした。さらにラット、イヌ、ヒトにおいてYM-39558の体内動態を検討した結果より、YM-39558をヒトに応用する場合には水溶液として静脈内投与することが可能であり、低用量で脳内に必要量のオロト酸を供給でき、それによって効果がもたらされる可能性があることを示唆した。

ネコの中大脳動脈閉塞局所脳虚血モデルにおいて、脳波、脳血流、および梗塞巣の関係を検討し、電気生理学的機能を維持するのに必要となる脳血流の閾値が10 ml/min/100gと20 ml/min/100gの間に存在すること、この血流閾値を下回る程度の虚血状態の個体においては6時間という時間の要因が加わることにより広範囲が梗塞となることを示した。また、中大脳動脈閉塞後15分間の脳波を観察することにより虚血の程度を推測することが可能であり、この間に脳波の回復が認められない個体、すなわち上記の血流閾値を下回る程度の虚血状態の個体を選択することにより、均一な虚血強度が負荷された個体群を作成することが可能であることを明らかにした。

ネコの中大脳動脈閉塞局所脳虚血モデルにおいて、YM-39558の神経細胞保護作用を検討し、その結果、11.8 mg/kg/h 静脈内持続投与により、大脳皮質の梗塞巣進展が著明に抑制されることを示した。さらにこの時の脳脊髄液中のオロト酸の濃度を検討し、オロト酸が梗塞巣の進展を抑制するには、数十 mM の濃度が必要であることを明らかにした。この濃度は、遅発性神経細胞死を抑制するのに必要となる脳脊髄液中オロト酸濃度、さらにin vitro実験系において低酸素、再酸素化負荷に伴う細胞内代謝障害を抑制する作用を示したオロト酸濃度と一致しており、オロト酸は数十 mM の濃度で、虚血侵襲に対し神経細胞保護作用をもつとの考えを示した。

ネコにYM-39558を静脈内投与した場合、検討したいずれの用量群においても腎臓の集合管内に析出結晶が存在する個体が認められ、いずれ

の個体においても集合管に組織傷害は認められなかったものの、腎障害を引き起こす可能性を完全に否定し得ないことを示した。そのため、申請者は現段階でYM-39558をヒトに応用するには安全性の観点より問題があり、さらに性質を改善したオロト酸プロドラッグの開発が必要であると結論した。

以上、審査委員会は本論文を脳虚血に伴う脳神経細胞死に対するオロト酸の神経細胞保護作用、作用機序、またオロト酸プロドラッグとしてのYM-39558の体内動態、さらにはその神経細胞保護作用に関し、新発見を得た内容であると判定し、博士（薬学）の学位を受けるに十分値すると認めた。