

称号及び氏名	博士（獣医学）中嶋 秀満
学位授与の日付	平成 17 年 2 月 20 日
論文名	「中枢神経系におけるポリ（ADP-リボシル）化反応の病態生理的意義およびポリ（ADP-リボース）ポリメラーゼ阻害剤の有用性に関する研究」
論文審査委員	主査 畑 文明 副査 津山 伸吾 副査 中村 洋一 副査 竹内 正吉

## 論文要旨

### 緒言

ポリ（ADP-リボシル）化反応は、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD<sup>+</sup>）を基質として ADP-リボースをアクセプター蛋白質に結合させ、更に切り出された ADP-リボースを（1）2）グリコシド結合により重合させる酵素反応であり、真核細胞に特有な可逆的翻訳後修飾である。ポリ（ADP-リボース）代謝には、現在、3 種類の酵素が関与することが知られており、合成系ではポリ（ADP-リボース）ポリメラーゼ-1（PARP-1）が関与する。PARP-1 は分子量 113kDa の塩基性に富む DNA 結合性蛋白質であり、クロマチン構造 1000 単位に約 1 分子の割合で存在する、非常に豊富な核内酵素である。また、PARP-1 はほぼ全ての細胞に恒常的に発現するが、特に免疫系、生殖器系および中枢神経系での発現量が高いことが知られており、これらの生体システムへの関与が注目されている。

ポリ（ADP-リボシル）化反応の生理的意義の詳細に関しては未だに不明な部分が多いが、DNA 損傷時に核内で劇的かつ速やかに生じることから、クロマチン蛋白質や核内酵素の可逆的な修飾を介して、DNA 修復や転写調節に関わるという報告がなされている。一方で、その病態生理的役割に関しては、ラジカルで誘発される細胞死への関与について、PARP 阻害剤および PARP-1 ノックアウトマウスを用いた研究を中心に検討されている。特に PARP-1 は中枢神経系に豊富に存在することから、脳卒中やパーキン

ソン病などの神経変性疾患の病態形成における関与が最も良く研究されている。そのメカニズムとして、PARP-1による「自殺仮説」が提唱されている。即ち、脳損傷時に脳内で大量に発生するラジカルによって、神経細胞 DNA に大量の損傷が生じ、その損傷 DNA によって PARP-1 の異常活性化が亢進・持続する結果、基質 NAD<sup>+</sup>を大量に消費し、細胞内エネルギープールである ATP の合成経路を停止させることで、神経細胞を「自殺」させるという。実際、ラジカル誘発性神経細胞死モデルや局所脳虚血モデルにおいて、神経細胞内の NAD<sup>+</sup>と ATP の急速な低下が認められ、また、PARP 阻害剤および PARP-1 ノックアウトマウスを用いた検討では、それらの低下と細胞死が抑制されることが報告されている。

以上の研究報告および仮説に基づき、神経変性疾患に対する PARP 阻害剤の治療応用への関心が高まり、多くの PARP 阻害剤の治療効果が、様々な神経変性疾患モデルにおいて検証されている。しかし、これまでに報告された PARP 阻害剤は、その溶解性、選択性、脳内移行性および副作用などの薬理的諸性質に関して、PARP 阻害による有用性を検証するには不十分な側面があり、また、治療薬としての力価（阻害活性）も不足していることから、治療目的に叶う化合物が殆ど存在しないのが実情であった。

更に、中枢神経系におけるポリ（ADP-リボシル）化反応の病態生理的意義に関する研究は、これまで神経細胞にのみ焦点が当てられ、脳のもう一つの重要な構成細胞であるグリア細胞における役割についての検討は殆ど着手されていなかった。中枢神経系の疾病の治療を指向する薬剤の場合、脳内に到達した薬剤は、神経細胞のみならずグリア細胞にも影響を及ぼすことが考えられ、PARP 阻害剤の神経変性疾患への適用に際しては、標的細胞である神経細胞に加え、それらを取り巻くグリア細胞におけるポリ（ADP-リボシル）化反応の役割を理解することが、極めて重要であると考えられる。

以上のような背景から、私は脳卒中に代表される神経変性疾患の病態解明およびその治療手段の提供には、まず生体利用率の高い新規 PARP 阻害剤が必要と考え、その探索を行った。そして、新規 PARP 阻害剤 DR2313 を見出した。第 1 章では、DR2313 の薬理的性質（第 1 節）および急性期脳卒中治療薬としての有用性（第 2 節）について検討した。第 2 章では、グリア細胞におけるポリ（ADP-リボシル）化反応の病態生理的役割を解明する目的で、マウスグリア細胞初代培養系を用いて、グリア細胞の活性化に及ぼす PARP 阻害剤および PARP-1 アンチセンスの作用について、炎症性メディエーター産生を指標に検討を行った（第 1 節）。また、活性化グリア細胞における NF- $\kappa$ B 依存性遺伝子発現と PARP-1 の関連性に着目し、炎症性メディエーター産生の転写プロセスにおける PARP-1 の関与についても検討を加えた（第 2 節）。最後に、神経変性疾

患の病態形成における神経細胞およびグリア細胞内ポリ(ADP-リボシル)化反応の意義およびその治療手段としての PARP 阻害剤の有用性について考察した。

## 第1章 新規 PARP 阻害剤 DR2313 の急性脳卒中治療薬としての有用性に関する研究

### 第1節 DR2313 の薬理的性質

DR2313 は、既存 PARP 阻害剤とは異なる構造的特徴 (non-benzamide 構造) を有し、また、水溶性が高く、強力な PARP 阻害活性 ( $K_i = 0.23 \mu\text{M}$ ) を示した。NAD<sup>+</sup> 依存性酵素に対する選択性の検討では、モノ ADP リボシル化酵素および脱水素酵素による NAD<sup>+</sup>/NADH 交換反応には殆ど作用を示さず、一方、PARP アイソザイムに対しては非特異的に作用する可能性が示唆された。DR2313 は、ラジカル捕捉活性を示さず、また、ラットへの静脈内投与により高い脳内移行性を示し、脳内ポリ(ADP-リボシル)化反応をその用量依存的に阻害した。更に、ラット循環器動態、血液パラメーターおよび全身状態に殆ど影響を与えなかった。以上の結果から、新規 PARP 阻害剤 DR2313 は、中枢神経系におけるポリ(ADP-リボシル)化反応の病態生理的役割の解明に有用な薬理的性質を有することが明らかとなった。

### 第2節 DR2313 の急性期脳卒中治療薬としての有用性について

これまでに多くの PARP 阻害剤の脳卒中モデルにおける脳保護効果が報告されている。また、本章第1節では新規 PARP 阻害剤としての DR2313 の薬理的性質が明らかとなった。そこで本節では、DR2313 の脳卒中治療薬としての有用性について、ラット神経細胞初代培養系における *in vitro* 脳虚血モデルと、ラット局所脳虚血モデルを用いて検討を行った。また、DR2313 の虚血後投与による効果と治療可能時間域について、既存急性期脳卒中治療薬である MCI-186 (ラジカルスカベンジャー) との比較試験を実施した。DR2313 は、ラット大脳皮質神経細胞初代培養系における過酸化水素およびグルタミン酸誘発神経細胞死に対して、特異的 PARP 阻害作用に基づく神経保護作用を示した。また、ラット局所脳虚血モデルにおいて、用量依存的な脳梗塞巣体積の縮小効果をもたらした。更に、既存薬である MCI-186 よりも広い治療可能時間域を示した。以上の結果から、新規 PARP 阻害剤 DR2313 は、急性期脳卒中治療薬として有用である可能性が示唆された。

## 第2章 グリア細胞におけるポリ(ADP-リボシル)化反応の病態生理的意義に関する研究

## 第1節 活性化グリア細胞に対する PARP 阻害剤および PARP-1 アンチセンスの作用

緒言でも述べたように、中枢神経系におけるポリ(ADP-リボシル)化反応の研究は、これまで神経細胞にのみ焦点が当てられ、グリア細胞における役割には殆ど関心が払われていなかった。PARP は神経細胞とグリア細胞にほぼ同レベルで発現しており、脳内に到達した PARP 阻害剤は、神経細胞のみならずグリア細胞のポリ(ADP-リボシル)化反応も阻害することが考えられる。特に神経変性疾患などの病態時には、グリア細胞の顕著な反応性が観察されることから、活性化グリア細胞におけるポリ(ADP-リボシル)化反応について検討を行うことは、PARP の病態生理的役割および PARP 阻害剤の作用機作を解明する上でも極めて重要である。そこで本節では、マウスグリア細胞初代培養系を用い、エンドトキシン(LPS)で誘発される炎症性メディエーター産生をグリア細胞活性化の指標として、PARP 阻害剤および PARP-1 アンチセンスの作用を検討した。マウスグリア細胞初代培養系における LPS 処置による TNF- $\alpha$  および NO<sub>2</sub> の産生は、PARP 阻害剤および PARP-1 アンチセンスの処置により抑制された。また、グリア細胞における主要なポリ(ADP-リボシル)化蛋白質は、PARP-1 自身(自己修飾 PARP-1;AM-PARP)であることを明らかにした。この PARP-1 の自己修飾は、PARP 阻害剤の処置により抑制された。以上の結果から、グリア細胞の活性化にはポリ(ADP-リボシル)化反応が関与し、その主要な基質蛋白質の1つが PARP-1 自身(AM-PARP)であることが示唆された。

## 第2節 グリア細胞 NF- $\kappa$ B 依存性遺伝子発現における PARP-1 の関与について

本章第1節により、グリア細胞活性化とそれに伴う TNF- $\alpha$  および iNOS などの炎症性メディエーター産生には、ポリ(ADP-リボシル)化反応、特に AM-PARP の存在が重要である可能性が示唆された。また、グリア細胞におけるこれら炎症性メディエーターの遺伝子発現は、NF- $\kappa$ B 依存的事であることが報告されている。そこで本節では、AM-PARP と NF- $\kappa$ B 依存性遺伝子発現との関連性を解明することを目的に、NF- $\kappa$ B の DNA 結合活性および転写活性に対する PARP-1 の作用について検討を行った。LPS 処置グリア細胞における NF- $\kappa$ B の転写活性化(DNA 結合活性)は、PARP 阻害剤および PARP-1 アンチセンスの処置により抑制された。PARP 阻害剤および PARP-1 アンチセンスの処置は、NF- $\kappa$ B の核内移行には無影響であった。非修飾 PARP-1 (NM-PARP) は NF- $\kappa$ B と直接会合したが、AM-PARP は結合しなかった。NM-PARP は NF- $\kappa$ B の DNA 結合活性を阻害したが、AM-PARP は無影響であった。核抽出液中への NAD<sup>+</sup> の添加は、AM-PARP の自己修飾と NF- $\kappa$ B の DNA 結合活性を亢進させた。更に、核抽出液中への NAD<sup>+</sup> および AM-PARP の添加は、NF- $\kappa$ B 依存的な *in vitro* 転写反応を亢

進させた。一方、NM-PARP の添加はそれを阻害した。以上の結果から、グリア細胞 NF- $\kappa$ B 依存性遺伝子発現は、PARP-1 の自己修飾を介する NF- $\kappa$ B との相互作用により調節されている可能性が示唆された。

## 総括

本研究で得られた結果は、神経細胞とグリア細胞におけるポリ(ADP-リボシル)化反応が、脳卒中などの神経変性疾患の病態形成に深く関与することを示唆している。即ち、脳に虚血などの侵襲が加わると、神経細胞のポリ(ADP-リボシル)化反応が亢進し、神経細胞死を招来するとともに、活性化グリア細胞のポリ(ADP-リボシル)化反応により炎症関連遺伝子の発現が促進されることで、病態が形成されると推察される。従って、DR2313 を含む PARP 阻害剤は、神経細胞とグリア細胞の双方に作用することで、神経細胞死とそれに続く炎症反応を阻止し、神経変性疾患への治療効果を発揮することが期待される。以上のことから、本研究は、今後の神経変性疾患の病態解明および治療手段の研究において、有用な情報になると考えられる。

## 審査結果の要旨

ポリ(ADP-リボシル)化反応の生理的な意義については充分解明されていないが、DNA 損傷時に核内でポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ(PARP)の活性化が急速に高まることから、DNA 修復や転写調節に関わっていることが示唆されている。一方、細胞死誘導への関与についても多くの報告があり、特に活性酸素種で誘発される細胞死での役割が注目されている。活性酸素種誘発性神経細胞死モデルや、局所脳虚血モデルにおいて、PARPの基質のNAD<sup>+</sup>が急速に減少し、それに伴うATPの減少により細胞死が生じることが示唆されている。興味あることに、PARPの阻害剤がほぼ完全にこれらモデルでのATPの減少を抑制する。またPARPノックアウトマウスでも同様のことが確認された。このような背景の下に、神経性疾患に対するPARP阻害剤の有用性への関心が高まってきた。本研究では新規PARP阻害剤を見出し、その薬理的性質を検討し急性脳卒中治療薬としての有用性を検討している。また、これまでほとんど研究されていなかった、グリア細胞におけるポリ(ADP-リボシル)化反応の病態生理学的意義を検討している。さらに、活性化グリア細胞におけるnuclear factor- $\kappa$ B依存性遺伝子とPARPの関連性に着目し、炎症メディエーター産生の転写過程へのPARPの関連性に検討を加え、神経性疾患でのポリ(ADP-リボシル)化反応の生理的な意義および治療手段としてのPARP阻害剤の有用性を考察している。本研究で得られた成果を要約すると、

- 一、新規PARP阻害剤、DR2313は、中枢神経系におけるポリ(ADP-リボシル)化反応の病態生理的役割の解明に有用な薬理的性質を有することを明らかにした。
- 二、DR2313は、ラット大脳皮質神経細胞初代培養系での、過酸化水素およびグルタミン酸誘発神経細胞死に対して、神経保護作用を示した。ラット局所脳虚血モデルにおいても、脳梗塞体積を縮小させた。また、既存薬より広い治療可能時間域を示し、急性期脳卒中治療薬としての可能性を示した。
- 三、PARP阻害剤およびPARP-1アンチセンス処置は、マウスグリア細胞初代培養系において、リポポリサッカライド(LPS)処置によるTNF- $\alpha$ およびNOまたはNO<sub>2</sub>の産生を抑制した。グリア細胞における主要なポリ(ADP-リボシル)化蛋白は、自己修飾PARP-1(AM-PARP)であった。PARP阻害剤処置はこの自己修飾を抑制した。
- 四、PARP阻害剤およびPARP-1アンチセンス処置は、グリア細胞初代培養系でのLPS処置によるNF- $\kappa$ Bの転写活性化を抑制した。NF- $\kappa$ Bの核内移行には無影響であった。非修飾PARP-1(NM-PARP)はNF- $\kappa$ Bと直接会合し、NF- $\kappa$ BのDNA結合を阻害した。核抽出液中へのNAD<sup>+</sup>添加により、NF- $\kappa$ BのDNA結合が著明に亢進し、NAD<sup>+</sup>およびAM-PARPの添加により、NF- $\kappa$ Bのin vitro転写反応が著明に亢進した。一方、NM-PARPはこの転写を阻害した。以上のようにグリア細胞NF- $\kappa$ B依存性遺伝子発現は、PARP-1の自己修飾を介するNF- $\kappa$ Bとの相互作用により調節されていることが

示唆された。

以上の結果から、脳に虚血などの侵襲が加わると、神経細胞でのポリ(ADP-リボシル)化を介して神経細胞死が生じること、グリア細胞でのポリ(ADP-リボシル)化を介して炎症関連遺伝子の発現が促進されることで、脳卒中やパーキンソン病などの神経性疾患の病態を形成していることが示唆された。従って、DR2313 などの PARP 阻害剤は、神経細胞死とそれに続く炎症反応を抑制し神経性疾患への有用性が期待される。これらの成果は医学、動物医学に貢献するところが大きく、本論文の審査および学力確認の結果から博士(獣医学)の学位を授与することを適当と認める。