

氏 名 (本籍)	須 川 誠 ^{まこと}
学位の種類	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 第 328 号
学位授与年月日	平成 4 年 11 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当

学位論文題目 新規 Dibenzoxazepine 誘導体 BY-1949 の脳循環
改善作用機序に関する薬理学的研究

(主 査)
論文審査委員 教授 佐藤 進 教授 大内和雄
教授 大泉 康

論 文 内 容 要 旨

脳は神経活動維持の為にエネルギーを、血流によって脳実質細胞に供給される酸素、ブドウ糖より産生している。そのため、脳の機能は間接的にも直接的にも血流から受ける影響は多大である。脳梗塞・脳出血などの脳血管障害は究極的には脳神経細胞を壊死に至らしめ (Siesjö, 1981), ひいてはいわゆる脳血管性痴呆を引き起こすと考えられる。したがって、慢性期脳血管障害の患者に対して脳循環改善薬を使用することは、臨床上重要な薬物治療法の一つであり、今後の高齢化社会の医療を考えた場合、この領域での有効な薬物の開発が切望されている。

Dibenzoxazepine 誘導体である BY-1949, 3-methoxy-11-methyl-dibenz(b, f), (1, 4)oxazepine-8-carboxylic acid は、脳虚血、低酸素及び加齢に伴うラット学習能低下改善作用 (Ikeda et al., 1988 ; 田辺ら, 1990), さらに老齢ラットの脳グルコース利用率低下改善作用 (Itoh et al., 1989) を併せもつ新しい脳機能改善薬として、現在脳出血・梗塞後の慢性期脳血管障害の患者を対象とし、後期第Ⅱ相臨床試験を行っている段階にある。

そこで本研究では、BY-1949 の有する脳機能改善作用の機序を調べる目的で、本薬物の脳循環動態に対する作用を検討した。

その結果、1) BY-1949 経口投与 (10-50 mg/kg) によって、無麻酔無拘束ネコの新皮質、海馬、及び扁桃体での局所脳血流量 (rCBF) を、体血圧、血液ガス ($p\text{CO}_2$, $p\text{O}_2$), 及び血液 pH に影響することなく用量依存的に増加させる作用を有することを見いだした。その作用は投与 1 時間後でも認められ、従来、脳機能改善薬として使用されている vinpocetine (20 mg/kg p.o.) に比べ持続的なものであった。

また、脳血管性痴呆患者では、 Ca^{2+} 拮抗薬等の薬物に対する反応性の低下が認められることから、脳血管拡張作用のみならず脳微小循環を改善する目的で、血液性状改善作用を併せもつ脳循環改善薬を第一選択としている (Buren et al., 1981)。そこで、BY-1949 の血小板凝集抑制作用についてウサギを用いて検討した。その結果、2) BY-1949 を 10 または、30 mg/kg 経口投与したところ、ADP, collagen 及び, arachidonate sodium による血小板凝集は用量依存的に抑制された。しかしながら、3) *in vitro* の実験系に BY-1949 及びその主要な代謝物を添加しても、血小板凝集は全く抑制されなかった。また、4) BY-1949 の血小板凝集抑制作用機序を解明する目的で nitroprusside (guanylate cyclase 活性化薬), PGE_1 (adenylate cyclase 活性化薬), 及び papaverine (PDE, phosphodiesterase 阻害薬) との併用実験 (*in vitro*) を行ったところ、BY-1949 は nitroprusside との併用でのみ顕著な血小板凝集抑制作用並びに cGMP 生成増大作用が認められた。このことより、BY-1949 の cGMP 含量上昇作用は、PDE 阻害作用を介したものと推察された。実際に、5) 血小板より guanylate cyclase 及び PDE を部分精製し作用を検討し

た結果、BY-1949は Ca^{2+} /calmodulin dependent PDE及びcGMP-dependent PDEを用量依存的($3 \times 10^{-6} - 10^{-4} \text{M}$)に阻害した。その強さはpapaverineの1/10程度でしかなかったものの、vinpocetineと比較した場合、 Ca^{2+} /calmodulin-dependent PDEに対してはほぼ同程度、cGMP-dependent PDEに対しては3倍強いものであった。また、 $3 \times 10^{-4} \text{M}$ 以上の高濃度ながらBY-1949は, guanylate cyclaseに対する活性化作用を有することが明らかとなり、この強さはnitroprussideの1/10程度であった。これら2つの作用を併せもつ薬物は報告されておらず、BY-1949の作用を考える上で興味深い。また、6) BY-1949は内皮由来の拡張因子(EDRF)の本体と考えられている一酸化窒素(NO)(Palmar et al., 1987)と併用すると、*in vitro*条件下でも極めて強力な血小板凝集抑制作用を発現することが判明した。以上の成績より、経口投与で認められたBY-1949の血小板凝集抑制作用は、血管内皮細胞と血小板との相互作用を介して発現するものと考えられた。また、その際cGMPの生成の増大が極めて重要であることが示唆された。

次に、BY-1949の脳循環改善作用のメカニズムを検討するため摘出イヌ脳底動脈を用いた基礎的検討を行った。脳血管の薬理学的性質についての知見は乏しく、とりわけ脳血管攣縮が Ca^{2+} 拮抗薬では抑制されないことが一般的に知られていることより、本薬物の対象疾患である脳血管障害の原因となる脳血管攣縮の発症には Ca^{2+} /calmodulin系を介さない平滑筋の収縮機構の関与を考える必要がある。この点に関して、くも膜下出血後に認められる細胞膜崩壊により遊離される種々のリン脂質が、PKCを活性化する可能性が示唆される。そこで、PKC活性化による脳血管収縮機構について薬理学的検討をおこなった。その結果、6) PKC活性化薬であるphorbol 12, 13-diacetate (PDA)は Ca^{2+} 含有溶液中で、用量依存的で緩慢に増大する持続的収縮反応を引き起こした。また、 Ca^{2+} 非存在溶液中でもPDAによる収縮が認められたが、serotonin (5-HT), prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$), endothelinによる収縮はほぼ完全に消失した。7) Ca^{2+} 存在・非存在溶液いずれにおいても、PDAによる収縮はPKC抑制薬であるstaurosporine, H-7あるいは PLA_2 阻害薬であるquinacrineによって有意に抑制された。一方、伝達物質の拮抗薬(atropine, methysergide, diphenhydramine, phentolamine), cyclooxygenase阻害薬indomethacin, lipoxygenase阻害薬caffeic acid, 及びcalmodulin抑制薬R24571 (calmidazolium)によって有意な抑制は認められなかった。さらに8) cyclic nucleotide類似体である8-bromocyclic GMPはPDAによる収縮を顕著に抑制したが、8-bromo-cyclic AMPの場合は顕著な作用が認められなかった。また、9) PDAによる脳血管平滑筋蛋白質のリン酸化について Ca^{2+} 非存在下で検討したところ、20kDa蛋白質であるミオシン軽鎖(MLC)以外の27-, 96-kDa, 及びより高分子量蛋白質の著明なリン酸化増加が認められた。以上の結果より、① PKC活性化により持続的で強い脳血管収縮が Ca^{2+} 含有のみならず、 Ca^{2+} 非存在下においても引き起

ること、② この収縮は Ca^{2+} /calmodulin/MLC系を介さず、 PLA_2 及び cGMP 系により調節を受けていることが明かとなった。次に、PKC 活性化を介した脳血管収縮が脳血管攣縮に関与しているか否かについて、ビーグル犬を用いた“二段くも膜下出血”モデルを用いて検討した。実験は自家血を2回大槽内に投与し、くも膜下出血をおこした動物より脳底動脈を単離し、正常血管と攣縮血管との間で薬物に対する反応を比較検討した。その結果 10) 5-HT, $\text{PGF}_{2\alpha}$, PDA の各収縮物質に対する反応性は正常脳血管と攣縮血管の間で基本的には変化がないものの、外液に Ca^{2+} を添加することにより引き起こされる脳血管収縮は攣縮血管で減少していることを見いだした。さらに、脳血管の自然発生張力の収縮源を検討した結果、11) 攣縮血管では、W-7 (calmodulin 阻害薬) による静止張力低下が顕著に減少し、nicardipine (Ca^{2+} 拮抗薬) では変わらず、一方、H-7 (PKC 阻害薬) による低下は増大した。以上の成績は、攣縮血管では PKC 活性化による自然発生張力が有意に増大していることを示唆する。これらのことより、晩期脳血管攣縮発症において、 Ca^{2+} /calmodulin 系よりも、むしろ PKC 系が主要な役割を果たしていることが明らかとなった。

以上の成績を踏まえて、BY-1949 のもつ rCBF 増加作用の機序を明らかにするため、薬理学的検討を行った。その結果、12) BY-1949 は 5-HT (10^{-6}M), $\text{PGF}_{2\alpha}$ (10^{-6}M), endothelin (10^{-9}M) 及び PDA ($3 \times 10^{-7}\text{M}$) による血管収縮をほぼ同じ濃度 (IC_{50} およそ $3 \times 10^{-5}\text{M}$) で抑制した。さらに、BY-1949 による血管拡張作用は methylene blue 前処理により有意に抑制された。13) BY-1949 は外液 Ca^{2+} を添加することにより引き起こされる収縮に対して、8-bromo-cyclic GMP と同様、用量依存的に抑制した。一方、8-bromo-cyclic AMP による抑制作用は 8-bromo-cyclic GMP と比べて弱かった。14) BY-1949 は cAMP 含量に影響を与えず、脳血管内 cGMP 含量を内皮との相互作用により有意に上昇させた。また、cAMP 含量は同レベルであったが、脳底動脈内 cGMP 含量値が、文献報告による、大動脈、大腿動脈、及び肺血管に比べ数十倍高値を示した。さらに、15) PDA によって増加する 27-, 96-kDa、及び高分子量の脳血管蛋白のリン酸化上昇を顕著に抑制した。これらの成績は、脳血管系における張力制御機構には、cAMP 系に比べ cGMP 系の方がより重要な役割を果たしていることを示唆すると共に、BY-1949 のもつ rCBF 増加作用がかなりの部分、脳血管に於ける cGMP 含量の上昇に依ることを強く示唆するものである。

本研究で得られた BY-1949 の、記憶や思考等の高次脳機能を担う領野である海馬や新皮質での rCBF 増加作用は、ラットで報告されている脳虚血や低酸素障害による学習低下の改善作用 (Ikeda et al., 1988 ; 田辺ら, 1990) の機序の一つとして重要と考えられる。また、血小板凝集抑制作用や PKC 活性化による脳血管収縮を抑制する成績から、BY-1949 が、くも膜下出血時の血栓形成を抑制し、脳血管攣縮を緩解させることが予想され、慢性期脳血管障害に対する治療薬として有用である可能性が示唆された。

審査結果の要旨

老齢に伴う脳血管性痴呆の罹患増大を考えた場合、今後の高齢化社会の医療上、その治療薬の開発が切望されている。一般に脳血管障害は脳神経細胞の壊死を通じて脳血管性痴呆に帰結すると考えられている。

BY-1949 は脳虚血・低酸素及び加齢に伴う学習障害改善作用、老齢ラットでの脳グルコース利用率低下改善作用を指標に行われた探索研究の結果、有効物質として見いだされた dibenzoxazepine 誘導体である。本論文は、BY-1949 の脳循環改善薬としての作用機序説明のための前臨床試験（動物実験）を内容としたものである。

本論文で示した知見は下記の通りである。

- 1) BY-1949 は、経口投与で新皮質、海馬、へん頭体の局所脳血流量を増加させる。
- 2) BY-1949 は経口投与で血小板凝集を抑制し、この作用は内皮との相互作用を介した選択的なサイクリック GMP 含量上昇による。BY-1949 は、カルシウム-カルモジュリン系及びサイクリック GMP 依存性 phosphodiesterase に対する抑制作用と guanylate cyclase 活性化作用をあわせ有する。
- 3) 脳底動脈は Protein Kinase C 活性化により収縮を生ずる。この収縮はカルシウム-カルモジュリン系を介さずサイクリック GMP 系による抑制を受ける。また、この収縮はミオシン軽鎖のリン酸化を介さずに未知の収縮蛋白質のリン酸化により引き起こされる可能性がある。
- 4) 自家血大槽内投与によってくも膜下出血を起こした攣縮脳血管では PKC 活性化による自然発生張力が有意に増大する。
- 5) BY-1949 が、血管内皮に依存した選択的な脳血管サイクリック GMP 上昇作用によって種々のアゴニスト及び Ca^{2+} による収縮を抑制し、また Protein Kinase C 活性化による収縮蛋白質のリン酸化の増大を抑制する。

以上のことより、BY-1949 の学習記憶低下改善作用の機序として、脳の高次機能を担う領野（海馬、新皮質）での局所脳血流量増加作用、くも膜下出血後の血栓形成の抑制、脳血管攣縮の緩解が推察された。すなわち BY-1949 は脳血管障害に対する治療薬として望ましい薬理的性質を有することを明らかにした。

本論文で示された知見は、本研究分野に新しく有用な情報を提供したものである。よって、本論文は学位論文として価値あるものと考えられる。