

|         |  |
|---------|--|
| 氏名（本籍）  | いじろ ともゆき<br>飯代 智之（長野県）                               |
| 学位の種類   | 博士（薬学）   |
| 学位記番号   | 論博第 380 号  |
| 学位授与の日付 | 令和 5 年 3 月 17 日                                      |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 2 項該当                                     |
| 学位論文題目  | 甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン誘導体ロバチレリンの脊髄小脳変性症治療薬開発を目的とした薬効薬理作用の研究 |
| 論文審査委員  | （主査）教授 市田 公美<br>教授 田野中 浩一<br>教授 高木 教夫<br>教授 大滝 博和    |

## 論文内容の要旨

### 第 1 章 ロバチレリンの中枢ノルアドレナリン神経系に対する作用

新規の TRH 誘導体ロバチレリンのヒト TRH 受容体を介した中枢ノルアドレナリン神経系への効果を検証した。ロバチレリンは、ヒト TRH 受容体に対する高い親和性を示し、ラット青斑核のノルアドレナリン作動性神経細胞を活性化した (Fig.1)。ラットへのロバチレリン単回経口投与は、青斑核で神経活性化マーカーc-Fos 発現陽性細胞数を増加した。ラットへのロバチレリンの単回経口投与は、青斑核からのノルアドレナリン作動性神経投射先の前頭前皮質で、細胞外ノルアドレナリン量も増加させた。加えて、ラットへのロバチレリンの単回経口投与は、自発運動量を増加させた。それらのロバチレリン作用は、タルチレリンよりも強力かつ持続性の長い中枢ノルアドレナリン神経亢進作用および運動増加作用も示した。ロバチレリンは SCD の治療薬として、高い治療効果を有する可能性が示された。

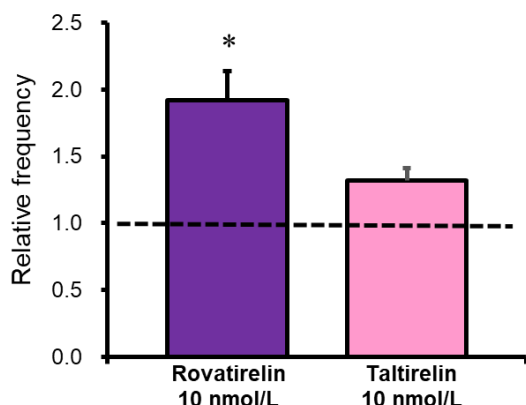


Fig.1 ロバチレリン及びタルチレリンによる青斑核ノルアドレナリン作動性神経の自発発火に対する作用

10 nmol/L ロバチレリン添加群と 10 nmol/L タルチレリン添加時の自発発火頻度の添加前からの相対変化。\* $p < 0.05$ , タルチレリン添加群との間での Student の  $t$  検定。

### 第 2 章 ロバチレリンの遺伝性脊髄小脳変性症モデルローリングマウスナゴヤの運動失調改善作用

遺伝性脊髄小脳変性症 (SCD) モデル動物ローリングマウスナゴヤ (RMN) の運動失調症状への

ロバチレリンの運動機能改善作用および作用機序を検証した。ロバチレリンの単回および反復経口投与は、RMN の転倒指数を減少させ、運動機能を改善した。その後の休薬期間を通じて、改善作用の維持が確認された (Fig.2)。

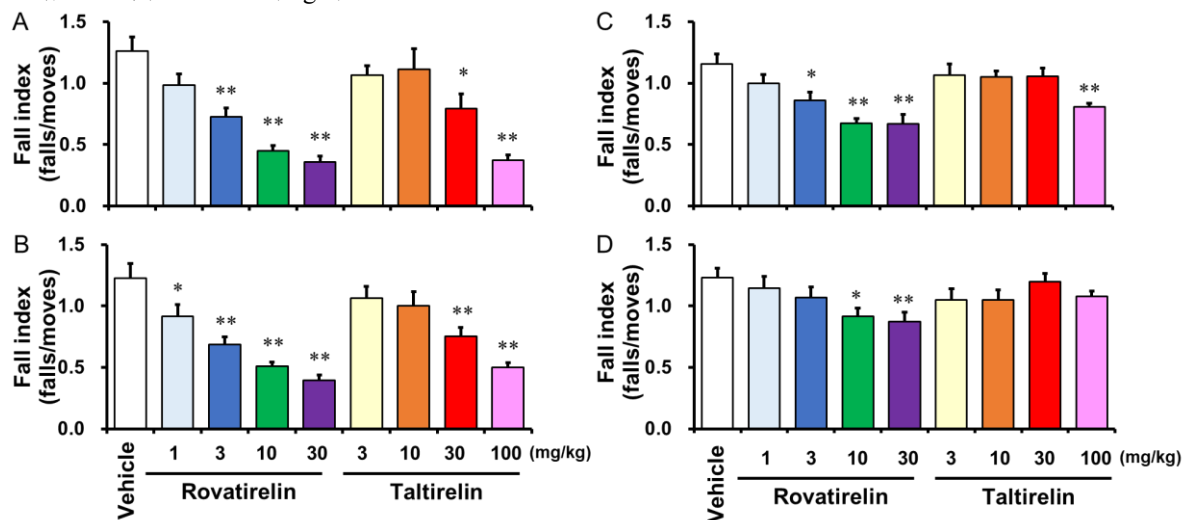


Fig.2 ロバチレリンおよびタルチレリンの2週間反復経口投与によるRMNの運動機能(転倒指数)に対する作用

A: 初日投与2時間後, B: 最終投与2時間後, C: 最終投与1週間およびD: 最終投与2週間後の各時点の行動観察による転倒指数の評価結果を示した。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , 媒体群との間のDunnnett検定。

脳内局所グルコース取り込み量に及ぼす影響を検証した結果、ロバチレリンはRMNの青斑核、前頭皮質、前帯状皮質、二次運動野および小脳中核などのグルコース取り込み能を亢進し、神経活動を活性化した。ロバチレリンの反復経口投与は、神経変性の保護作用を持つ脳由来神経栄養因子(BDNF)遺伝子発現をRMNの小脳で増加させた(Fig.3)。ロバチレリンの経口投与は、遺伝性SCDの治療における臨床利用に有用であることを提示した。

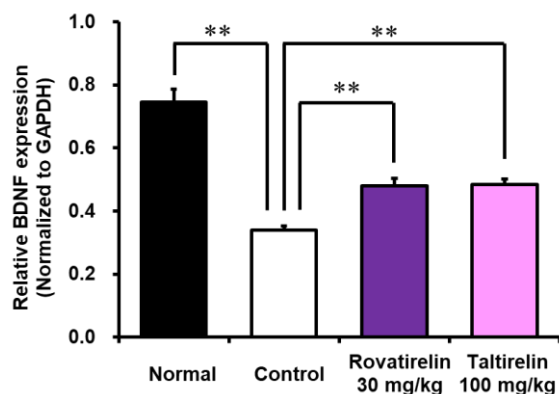


Fig.3 RMNへロバチレリン及びタルチレリン反復経口投与による小脳のBDNF遺伝子の発現に対する作用

正常マウスおよびRMNに媒体(蒸留水)、ロバチレリン30 mg/kgおよびタルチレリン100 mg/kgを2週間反復投与後、小脳を採取して、BDNFの遺伝子発現をリアルタイムPCRで解析した。\*\* $p < 0.01$ , 各群の間のTukey検定。

### 第3章 ロバチレリンの孤発性脊髄小脳変性症モデル cytosine arabinoside 誘発運動失調モデルラットにおける運動失調改善作用

孤発性脊髄小脳変性症(SCD)モデル動物 cytosine arabinoside (Ara-C) 誘発運動失調ラットを用い、ロバチレリンの運動機能改善作用を検証した。雌雄のAra-C誘発運動失調ラットへのロバチレ

リンの単回経口投与は、雌雄ともに転倒指数を減少させ、雌雄における転倒指数へ及ぼす影響に差異はなく、運動機能を改善した (Fig.4).

脳内局所グルコース取り込み能の亢進を認めた運動機能制御に関与する前頭前皮質、背側線条体および側坐核で、細胞外アセチルコリンおよびドパミン量及ぼす影響を検討した結果、ロバチレリンの単回経口投与は、ラットの前頭前皮質の細胞外アセチルコリン量ならびに背側線条体および側坐核の細胞外ドパミン量を増加させた。これらのロバチレリンの作用は、いずれもタルチレリンに比して強力かつ持続性が長いことが示された (Fig.5)。ロバチレリンは孤発性 SCD モデル Ara-C 誘発運動失調ラットの運動機能を改善し、それらの有益な作用はロバチレリンの前頭前皮質のアセチルコリン増加作用ならびに背側線条体および側坐核の DA 増加作用によってもたらされる可能性が示された。

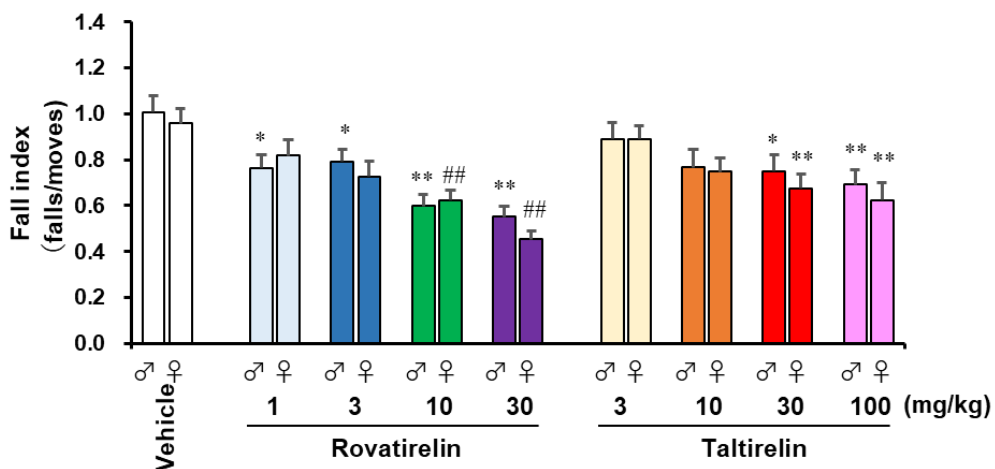


Fig. 4 ロバチレリンおよびタルチレリンの単回経口投与による雌雄の cytosine arabinoside (Ara-C) 誘発運動失調モデルラットに対する運動機能改善作用

雄および雌の転倒指数. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , 媒体群との間の Dunnett 検定. # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , 媒体群との間の Steel 検定.

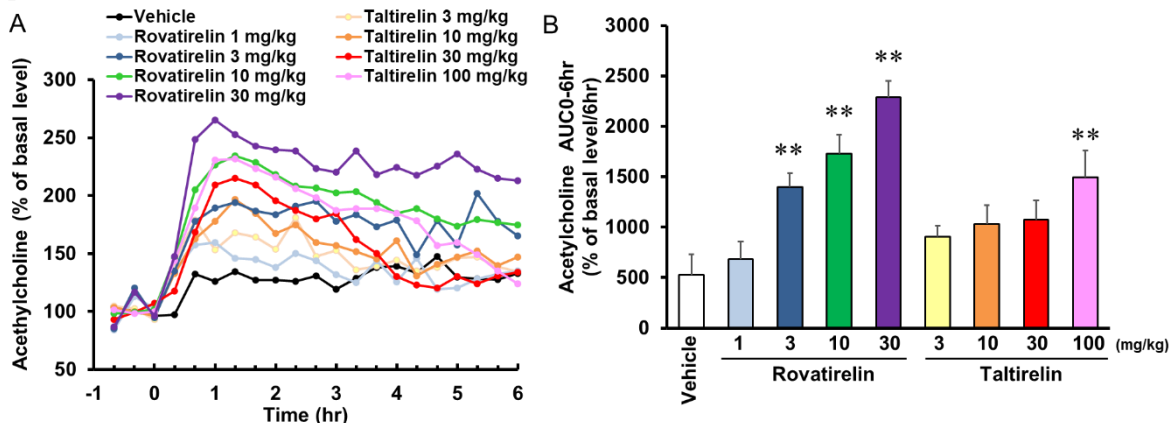


Fig. 5 ロバチレリン及びタルチレリンの覚醒下無拘束ラットへの単回経口投与による前頭前皮質の細胞外アセチルコリン量に対する作用

ロバチレリン、タルチレリン及び媒体 (蒸留水) の投与後 6 時間までアセチルコリン量 A: 経時変化及び B: 増加作用の総変化量. \*\* $p < 0.01$ , 媒体群との間の Dunnett 検定.

## 結語

本研究では、新規の TRH 誘導体ロバチレリンの SCD 治療の臨床利用の可能性を正常動物の運動量の増加作用、および孤発性ならびに遺伝性 SCD モデル動物での運動機能の改善作用から明らかとした。ロバチレリンの運動機能改善作用は、TRH 受容体を介して、中枢の様々な領域の神経活動を活性化し、運動制御に関わる中枢領域で神経伝達物質ノルアドレナリン、アセチルコリンおよびドパミンを増加させ、神経保護因子 BDNF を増加させることが関与することを明らかにした。加えて、既存の SCD 治療薬タルチレリンに比して、ロバチレリンのそれらの作用が強力であることも示した。本研究の成果は、新規の TRH 誘導体ロバチレリンが孤発性および遺伝性の SCD 治療の臨床利用に有用である可能性を示し、その薬効薬理作用メカニズムの詳細な情報を提供した。

## 【研究結果の掲載誌】

- 1) [Ijiro T](#), Nakamura K, Ogata M, Inada H, Kiguchi S, Maruyama K, Nabekura J, Kobayashi M, Ishibashi, *Eur J Pharmacol*, **761**, 413-22 (2015).
- 2) [Ijiro T](#), Yaguchi A, Yokoyama A, Abe Y, Kiguchi S, *Eur J Pharmacol*, **882**, 173271 (2020).
- 3) [Ijiro T](#), Yaguchi A, Yokoyama A, Kiguchi S. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **49**, 950-958 (2022).

## 【論文審査の結果の要旨】

本申請論文は、ロバチレリンの脊髄小脳変性症（spinocerebellar degeneration; SCD）治療薬としての可能性について検討したものである。SCD は、小脳を中心に脊髄、脳幹及び大脳で神経変性・萎縮を生じる難治性の進行性疾患の総称で、未だその治療法は確立されていない。ロバチレリンは、新規に創製された甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン（thyrotropin-releasing hormone; TRH）類縁体で、優れた代謝安定性、消化管吸収性及び血液脳関門透過性を示す。本研究では、正常動物あるいは SCD モデル動物を用い、それらの運動機能に及ぼすロバチレリンの効果を検討した。

第 1 章では、ロバチレリンは既存の TRH 類縁体であるタルチレリンよりも、ヒト TRH 受容体に対する高い親和性があることを示した。さらに、ロバチレリンはラットの脳から単離培養した青斑核ノルアドレナリン神経への TRH 受容体を介した活性化作用が既存薬のタルチレリンのそれよりも強力であることを示した。

第 2 章では、遺伝性 SCD モデル動物であるローリングマウスナゴヤ（RMN）を用い、ロバチレリン経口投与が運動失調改善の指標である転倒指数を低下させるとともに運動量を増加させることを見出した。加えて、2 週間のロバチレリン反復投与後でも、その運動機能改善作用は減弱しないことを示した。そのロバチレリンの運動機能改善作用は、タルチレリンのそれより強力であり、休薬後も薬物による改善効果はより長く持続した。ロバチレリンの単回経口投与は RMN の青斑核、前頭皮質、前帯状皮質、二次運動野及び小脳中核などの脳領域でグルコース取り込み量を増加させた。さらに、RMN への反復経口投与は、神経変性の保護作用を持つ脳由来神経栄養因子遺伝子発現を小脳で増加させた。

第 3 章では、孤発性 SCD モデル動物である Ara-C 誘発運動失調ラットを用いた。ロバチレリンの経口投与は、転倒指数を低下させるとともに運動量を増加させ、2 週間経口反復投与によっても運動機能改善効果が減弱されないことを示した。その運動機能改善作用はタルチレリンのそれよりも強力であった。さらに、ロバチレリンの運動機能改善作用メカニズム推定のため、脳内局所グルコース代謝増加が認められた運動機能制御に関与する前頭前皮質、背側線条体及び側坐核で細胞外アセチルコリン及びドパミン量に対するロバチレリンの効果を検討した。ロバチレリンのラットへの単回経口投与は、前頭前皮質における細胞外アセチルコリン量ならびに背側線条体及び側坐核の細胞外ドパミン量を増加させ、それらの増加作用はいずれもタルチレリンのそれらよりも強力かつ持続的であった。これらの結果から、ロバチレリンの運動機能改善作用は前頭前皮質のアセチルコリン増加作用ならびに背側線条体及び側坐核のドパミン増加作用が関与している可能性を示すことができた。

以上、飯代智之氏の論文は、ロバチレリンの SCD 治療薬としての可能性を提示したものであり、ロバチレリンの今後の臨床応用や同系薬物の開発に繋がるものと期待される。よって、本論文は博士（薬学）の学位論文として十分な価値を有するものと認める。