

# 虚血性障害抑制剤の開発に関する研究

福井 亨昌

福岡大学薬学部創剤学教室, 814-0180 福岡市城南区七隈 8-19-1

## Novel effective agents for preventing cerebral infarction

KOSUKE FUKUI

Department of Drug Design and Drug Delivery,  
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University,  
8-19-1 Nanakuma, Johnan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan

### Abstract

$\gamma$ -Tocopherol ( $\gamma$ -Toc) has been shown to be effective in reducing cerebral ischemia-induced brain damage. However, therapeutic formulation of this compound is difficult because that is insoluble in water. To achieve effective delivery of  $\gamma$ -Toc, we used a water-soluble prodrug (2*R*- $\gamma$ -Tocopheryl *N,N*-dimethylaminoacetate hydrochloride ( $\gamma$ -TDMG) for  $\gamma$ -Toc. In the present study, we investigated the effects of  $\gamma$ -TDMG on the ischemic brain damage in the mice middle cerebral artery (MCA) occlusion model.  $\gamma$ -TDMG was injected i.v., twice, immediately before and 3h after the occlusion.  $\gamma$ -TDMG (0.2 and 2mM) significantly decreased the size of the cerebral infarcts 1day after the MCA occlusion. In addition, we investigated the effects of new two prodrugs (2*R*- $\gamma$ -Tocopheryl phosphate disodium salt ( $\gamma$ -TPS) for  $\gamma$ -Toc and 2*R*- $\alpha$ -Tocotrienyl *N,N*-dimethylaminoacetate hydrochloride ( $\alpha$ -T3DMG) for  $\alpha$ -T3) on the ischemic brain damage in the mice MCA occlusion model.  $\alpha$ -T3DMG (0.2 and 2mM) significantly decreased the size of the cerebral infarcts 1day after the MCA occlusion, while  $\gamma$ -TPS showed low effect compared to  $\alpha$ -T3DMG on the cerebral infarcts. These results suggest that  $\gamma$ -TDMG and  $\alpha$ -T3DMG are potent and effective agents for preventing cerebral infarction induced by MCA occlusion.

## 【緒言】

近年、虚血性脳血管障害（脳梗塞、脳浮腫、脳出血、脳挫傷、新生児低酸素性虚血性脳症）、神経変性疾患（パーキンソン病、アルツハイマー病）、肺疾患（肺酸素中毒、成人呼吸窮迫症候群）、虚血性心疾患（狭心症、心筋梗塞など）、循環器疾患（動脈硬化）、消化器疾患（消化性潰瘍、潰瘍性大腸炎、クローン病）など、その発症や増悪に虚血やそれに伴う起炎性物質による炎症が関与していると考えられている病態や疾患は多岐に渡っており枚挙にいとまがない。これらのほとんどの疾患は進行的であり、その予防剤や治療剤の開発が強く望まれている。

脳梗塞は、脳血流量の低下によって種々の傷害機序がドミノ式に生じ、脳損傷が虚血中心部から虚血周辺部に酸化ストレスや炎症反応の関与する損傷が拡大していく進行性の疾患である [1]。急性期において予防はもちろん重要ではあるが、重篤性や QOL を考慮すると発症後の亜急性期、慢性期の治療が極めて重要となる。脳梗塞発症後の治療開始までの時間に余裕がある優れた亜急性期・慢性期虚血性脳血管障害の治療薬の開発が望まれている。

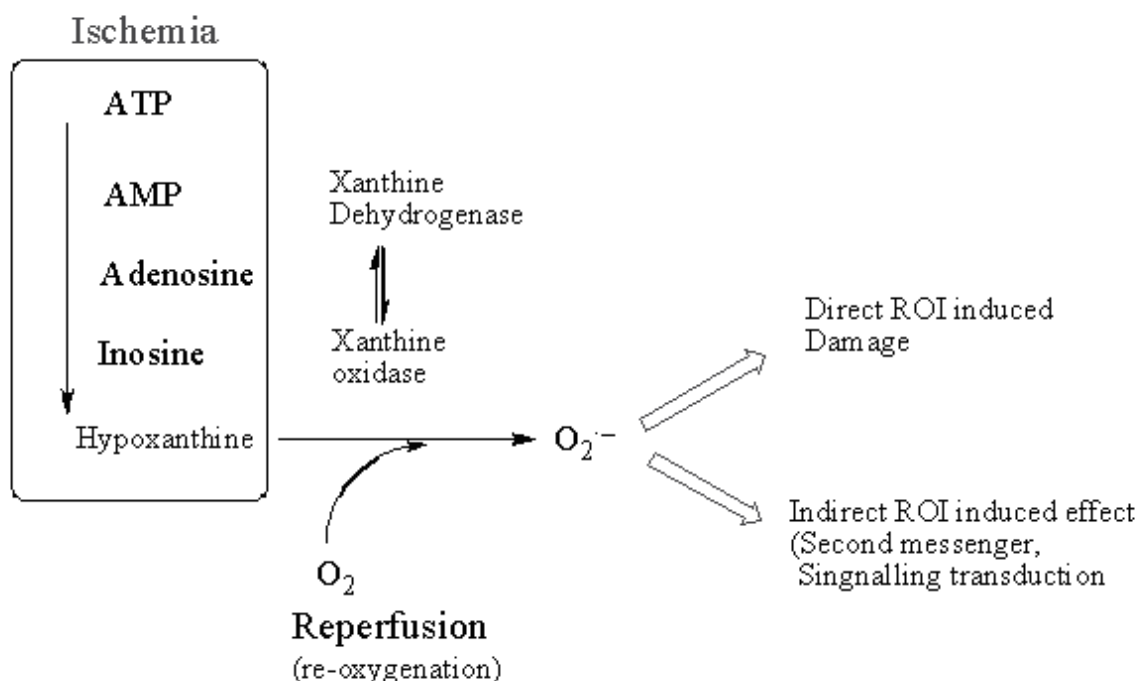


図1 活性酸素中間体の生成により惹起される急性期の細胞障害（1相反応）

虚血性疾患は2相性であり[2]、第1相は活性酸素中間体(ROIs)の生成によって惹起される急性期の細胞損傷である(図1)。第1相ではキサンチンオキシダーゼが主として関与している。ROIsは奇数個の電子を持つ化合物（ラジカル）であり、典型例はスーパーオキシドラジカル

( $O_2^{\cdot -}$ )とヒドロキシラジカル( $OH^{\cdot}$ )が知られるが、化学的反応性が高く連鎖的に新たなラジカルを生じてしまう。第2相は亜急性性損傷であり NAD phosphatase oxidase の活性化に依存している。第2相は ROI 生成および ROI によって誘導される前炎症性サイトカイン、ケモカイン、接着分子の合成、カルシウム依存性プロテアーゼ類の活性化、白血球と血小板の集合などに伴う損傷である (図2)。第2相は再還流から大きく遅延して起こる[3]。

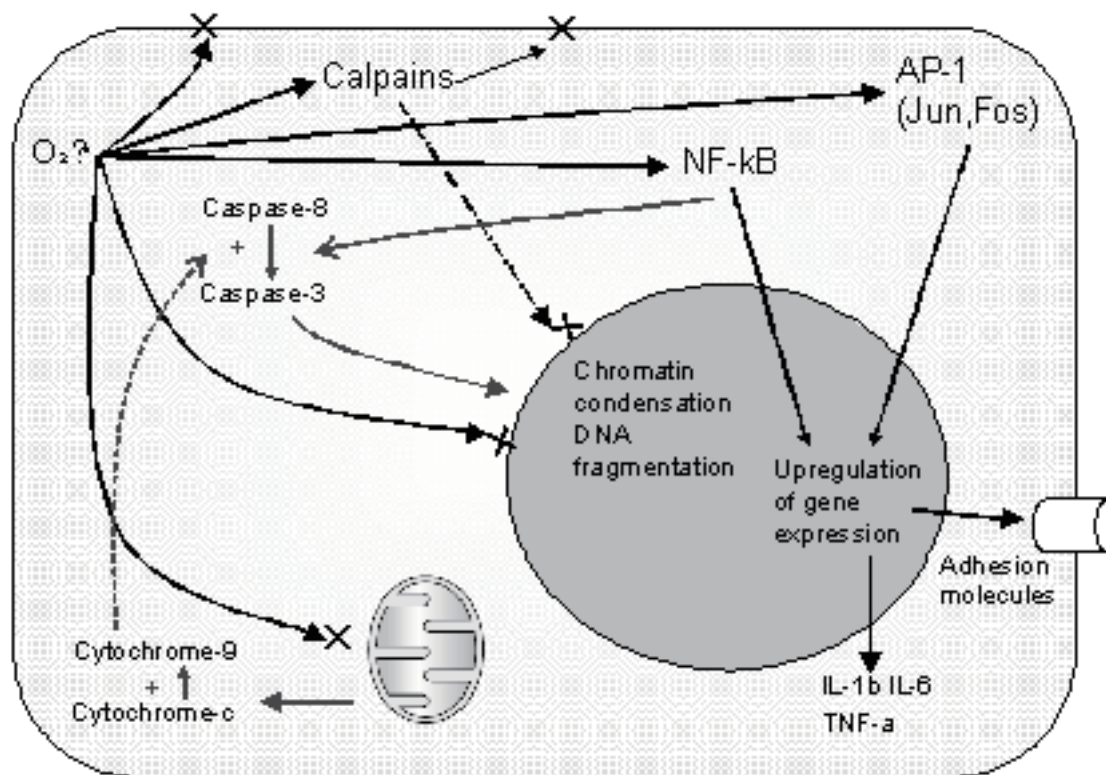


図2 活性酸素中間体による直接的・間接的な細胞障害の機序

現時点では、脳血流低下による虚血中心部を改善する脳梗塞急性期の治療薬として、血栓溶解剤の tissue plasminogen activator (tPA) やヒドロキシラジカル消去剤のエダラボンがあげられるが、これらは出血[4]や腎不全[5]などの重篤な副作用の問題がある。

Mishima 等は天然型ビタミンE同族体についてマウス中心動脈(MCA)閉塞モデルを用いた脳梗塞予防効果の検討から、2R- $\gamma$ -tocopherol ( $\gamma$ -Toc)と2R- $\alpha$ -tocotrienol ( $\alpha$ -T3)が $\alpha$ -tocopherol( $\alpha$ -Toc)よりも優れた効果を有することを明らかにしている[6]。また、ラット線条体細胞を用いた in vitro の検討から、 $\alpha$ -T3 はスーパーオキシド供与体による神経細胞死に対してだけでなく、酸化ストレス非依存性のアポトーシス性細胞死に対しても防護効果を有す

ることが報告されている[7]。これらの結果は、ビタミンE同族体の中で $\gamma$ -Toc と $\alpha$ -T3 の bioavailability を確保できる製剤が虚血性脳神経障害の治療薬として有望であることを示しており、大きな期待が寄せられる。

一方、すべてのビタミンE同族体は、いずれも水に全く溶けない油状物質で酸化に不安定な化合物であるため、これらの物理化学的性質が様々な投与方法（静脈内、経口）において bioavailability 確保の障害となっており、特に急速かつ確実な bioavailability 確保が可能な静脈内投与はできない。

そこで、本研究では、脳虚血性障害モデルにおいて優れた効果が示されながら製剤学的な欠点のため実用化できない $\gamma$ -Toc と $\alpha$ -T3 に関して、これらの化合物の薬物送達上の問題を克服し急速かつ確実な bioavailability を確保できる水溶性 prodrug を開発することによる脳虚血性障害治療薬の開発を企図した。

### 【 $\gamma$ -TDMG の脳梗塞予防効果と脳梗塞治療効果】

本編では福岡大学薬学部創剤学教室で開発された静脈内投与が可能な $\gamma$ -Toc の水溶性 prodrug であり、 $\gamma$ -Toc の急速な bioavailability 確保が明らかにされている 2*R*- $\gamma$ -tocopheryl *N,N*-dimethyl glycinate hydrochloride ( $\gamma$ -TDMG)[8] (図3) について、その脳梗塞予防効果と脳梗塞治療効果を評価した。

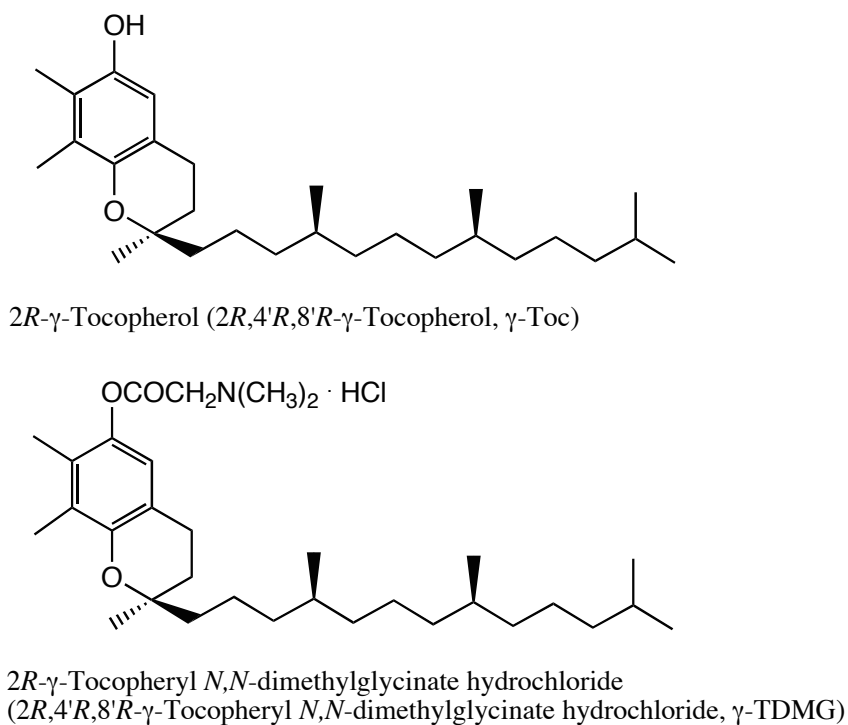


図3  $\gamma$ -Toc および $\gamma$ -TDMG の構造

中大脳動脈(MCA)閉塞時間を4時間とした MCA 閉塞モデルマウスを用い、薬物投与タイミングが梗塞直前と梗塞開始3時間の2回投与する場合を脳梗塞予防評価モデル(図4 A)とし、梗塞終了(再灌流)後2時間に薬物を単回投与する場合を脳梗塞治療評価モデル(図4 B)とした。

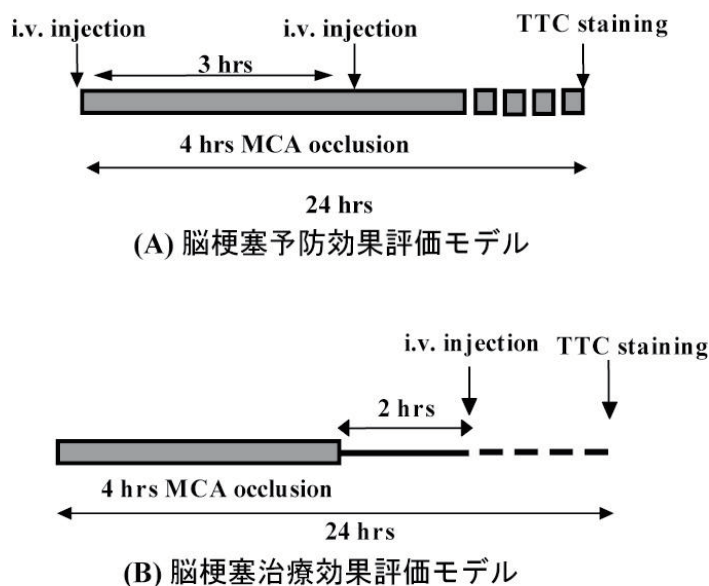


図4 脳梗塞予防・治療評価モデル

脳梗塞予防評価モデルにおいて $\gamma$ -TDMG 水溶液の静脈内投与（投与量  $2 \mu\text{mol/kg}$  以上）は有意な脳梗塞予防効果(図5, 図6)を示した。その効果は臨床に用いられているエダラボンと同等の効果が観察されたので、 $\gamma$ -TDMG は脳梗塞予防効果として優れた可能性を有することが明らかとなった。

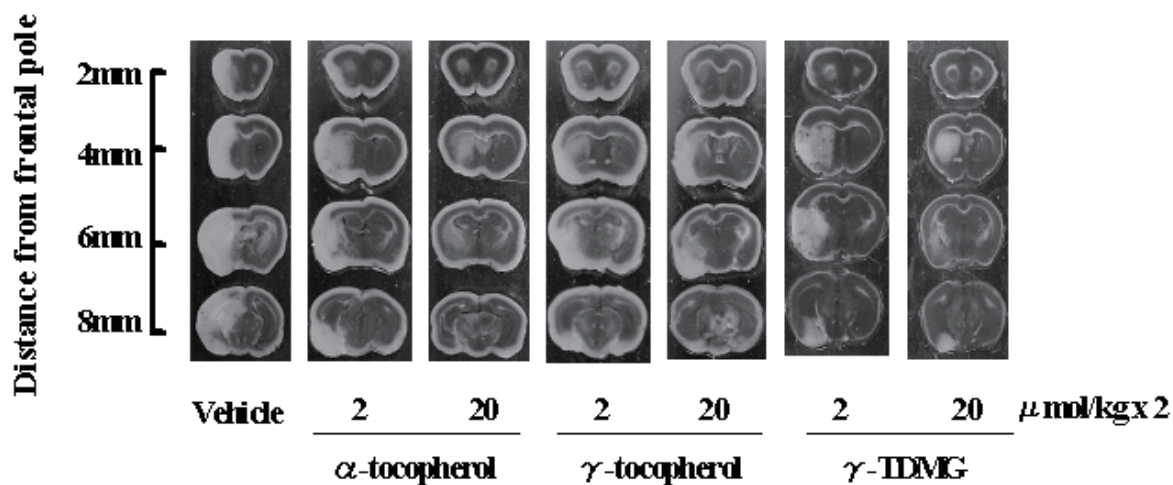


図5 脳切片の TTC 染色

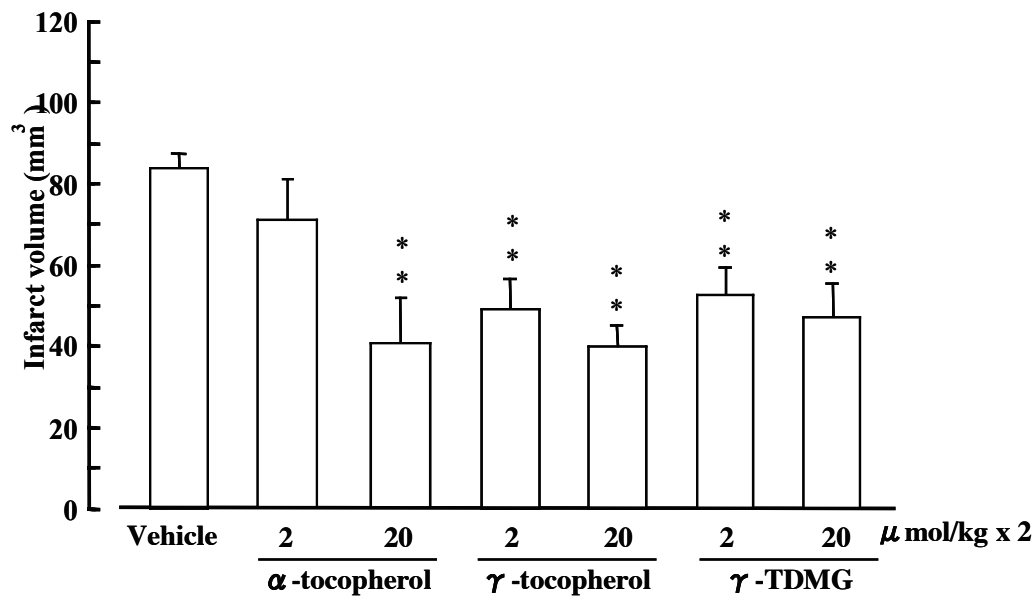


図 6 γ-TDMG による脳梗塞予防効果

次に脳梗塞治療評価モデルにおいてγ-TDMG 水溶液の静脈内投与(投与量 2 μmol/kg 以上)は、有意な脳梗塞治療効果(図 7, 図 8)を示し、その効果は臨床に用いられているエダラボンと同等の効果が観察されたので、γ-TDMG は脳梗塞治療薬としても優れた可能性を有することが明らかとなった。

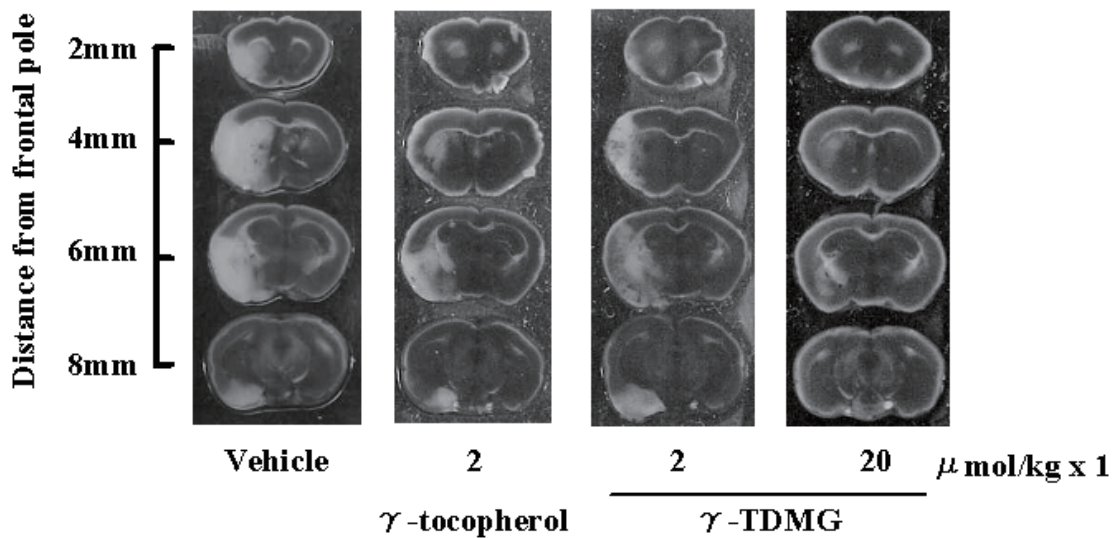


図 7 脳切片の TTC 染色

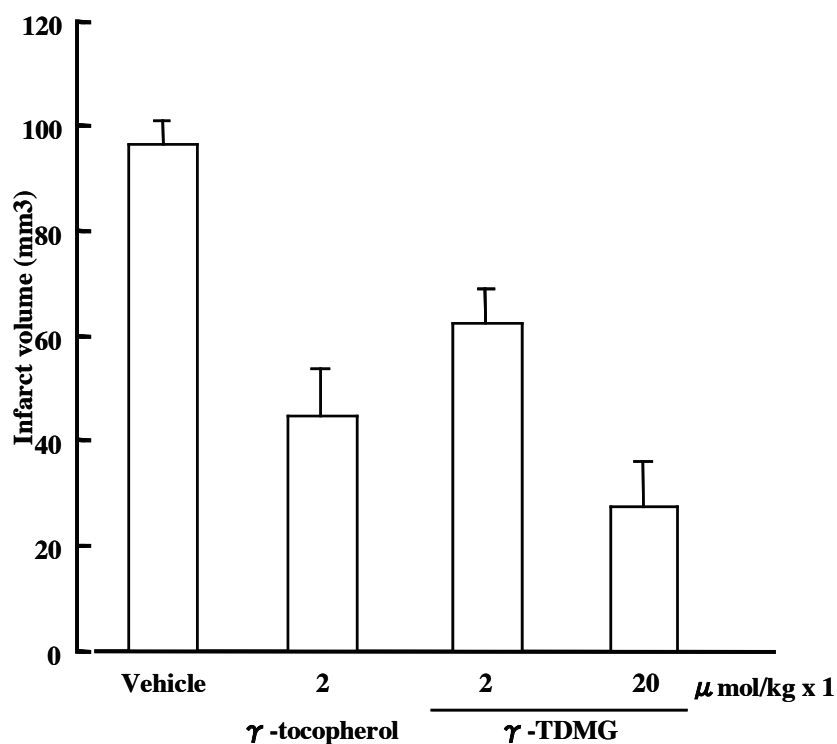
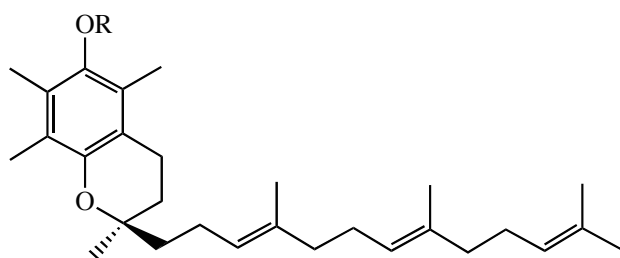


図 8 γ-TDMG による脳梗塞治療効果

#### 【α-T3 aminoalkylcarboxylic acid エステルの合成ならびに *in vitro* での評価】

本編では、2*R*-α-tocotrienol (α-T3)の急速に bioavailability を確保できる静脈内投与可能な α-T3 の水溶性 prodrug の開発を企図した。α-T3 の glycine ester (α-T3G), *N*-methylglycine ester (α-T3MG), *N,N*-dimethylglycine ester (α-T3DMG), succinic acid ester (α-T3Suc)を合成し(図 9), *in vitro* における水溶解性、親薬物への再変換性から prodrug としての有用性を評価した。



α-T3: R = H

α-T3G: R = -COCH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> · HCl

α-T3MG: R = -COCH<sub>2</sub>NHCH<sub>3</sub> · HCl

α-T3DMG: R = -COCH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · HCl

α-T3Suc: R = -COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH

図 9 α-Tocotrienyl aminoalkylcarboxylates

2*R*-α-tocotrienyl *N,N*-dimethylglycinate hydrochloride (α-T3DMG)は、水溶性(50 mM 以上)が高



くラット肝臓及びヒト肝臓中のエステラーゼで触媒され効率よく $\alpha$ -T3に再変換されることが明らかになったことから、 $\alpha$ -T3DMG を prodrug 候補に選択し、ラットを用いた静脈内投与後の体内動態から prodrug としての有用性を in vivo で評価した。 $\alpha$ -T3DMG は静脈内投与後速やかに肝臓に移行し、 $\alpha$ -T3 に再変換され血漿中の $\alpha$ -T3 レベルを急速に上昇させることから、 $\alpha$ -T3DMG は $\alpha$ -T3 の静脈投与可能な水溶性 prodrug として機能することが明らかになった(図 10)。薬物動態パラメータを表 1 に示した。

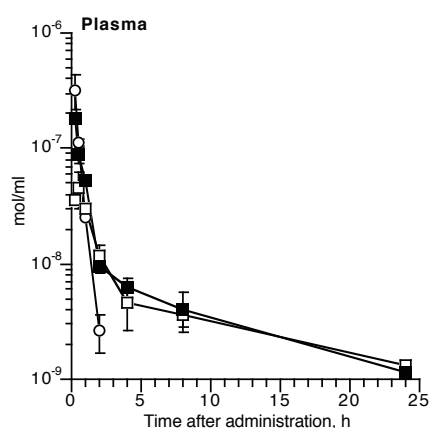


図 10 Mean distribution profile of  $\alpha$ -T3DMG and  $\alpha$ -T3 after the i.v. administration of  $\alpha$ -T3DMG and  $\alpha$ -T3-H in the rats. Keys; (○)  $\alpha$ -T3DMG; (□)  $\alpha$ -T3 after  $\alpha$ -T3DMG administration; (■)  $\alpha$ -T3 after  $\alpha$ -T3-H administration. Each point represents the mean  $\pm$  SD of three rats.

表 1 Kinetic parameters for the hydrolysis of the aminoalkylcarboxylic acid and succinic acid esters of  $\alpha$ -tocotrienol in rat liver microsome and rat plasma at 37°C

Compound	$K_m$ ( $\times 10^{-3}M$ )	$V_{max}$ ( $\times 10^{-6}M/min$ )	$V_{max}/K_m$ ( $\times 10^{-3}min^{-1}$ )
Rat liver microsome			
$\alpha$ -T3DMG	6.653	160.8	24.55
$\alpha$ -T3MG	0.2047	2.157	10.53
$\alpha$ -T3Suc	0.05582	0.07306	1.309
Rat plasma			
$\alpha$ -T3DMG	0.7933	0.09189	0.1158
$\alpha$ -T3MG	1.398	0.5442	0.3893
$\alpha$ -T3Suc	0.5834	0.05372	0.09207



### 【 $\alpha$ -T3DMG の脳梗塞予防効果と脳梗塞治療効果】

本編では、静脈内投与が可能な $\alpha$ -T3 の水溶性 prodrug であり、 $\alpha$ -T3 の急速な bioavailability 確保ができる $\alpha$ -T3DMG について、その脳梗塞予防効果と脳梗塞治療効果を評価した。 $\alpha$ -T3DMG 水溶液の静脈内投与（投与量 2  $\mu$ mol /kg 以上）は有意な脳梗塞予防効果(図 11 A)と脳梗塞治療効果(図 11 B)を示し、 $\alpha$ -T3DMG は $\gamma$ -TDMG と同等の脳梗塞予防効果と脳梗塞治療効果を示したことから、 $\alpha$ -T3DMG は脳梗塞予防効果だけでなく脳梗塞治療薬としても優れた可能性を有することが明らかとなり、新たな戦略になり得ることが明らかになった。

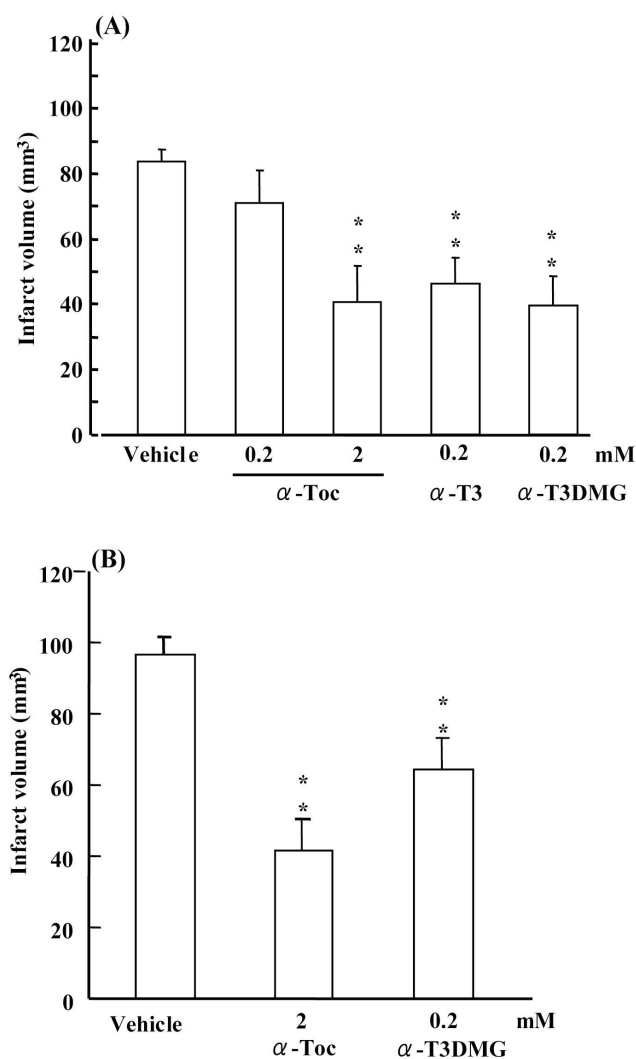


図11  $\alpha$ -T3DMGによる脳梗塞予防・治療効果

### 【新規の脳虚血性障害治療薬の探索】

本編では、さらに、新規の脳虚血性障害治療薬の探索を行った。新規治療薬の具備すべき条件を、脳梗塞治療においては急速なbioavailability確保が重要であることから製剤学的条件を静脈内投与可能であること、 $\gamma$ -TDMGや $\alpha$ -T3DMGと同等以上の効果を有することを条件として可能性のある新規物質を探索した。極めて最近、 $\alpha$ -Tocは生体内で一部がリン酸エステル $\alpha$ -tocopheryl phosphate( $\alpha$ -TP)として存在し[9], ラジカルスカベンジャー以外の機構で抗酸化効果を有することが報告され[10], vitamin Eの新たな分野になる可能性が示された。現在のところ $\gamma$ -Tocのリン酸エステルの存在は明らかになっていないが、同様な効果が期待できる。また、 $\gamma$ -Tocのリン酸エステルはナトリウム塩にすることで水溶性を付与できると考えられることから、2R- $\gamma$ -tocopheryl phosphate disodium salt ( $\gamma$ -TPS) (図12) を合成し、その脳梗塞予防効果と脳梗塞治療効果の検討から、 $\gamma$ -Tocのリン酸エステルの脳梗塞治療における可能性を検討した。

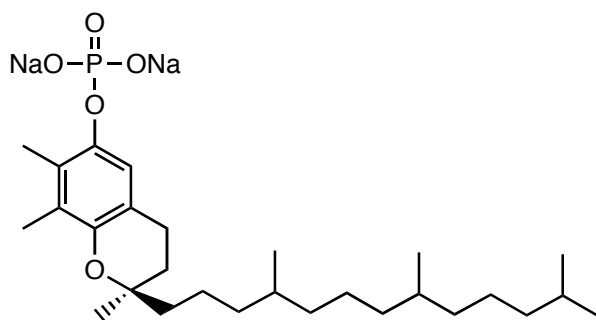


図 12 2R- $\gamma$ -tocopheryl phosphate disodium salt ( $\gamma$ -TPS)

その結果、 $\gamma$ -TPSは脳梗塞予防効果と脳梗塞治療効果を有することを発見した。 $\gamma$ -TPSの脳梗塞予防効果と脳梗塞治療効果は $\gamma$ -TPS自身による効果であることが示唆された。しかし、抑制効果が $\gamma$ -TDMGや $\alpha$ -T3DMGに比較して1/10であることから有望な候補ではないと結論した。

### 【総括】

本研究は、脳梗塞の予防だけでなく、梗塞後投与においても効果のある、すなわち、治療効果が期待できる脳梗塞治療薬の開発を目的に遂行した。その結果、それぞれ $\gamma$ -Toc と $\alpha$ -T3の急速かつ確実な bioavailability 確保ができる $\gamma$ -TDMG と $\alpha$ -T3DMG が極めて有望な脳梗塞治療薬であることを明らかにした。

### 【謝辞】

本研究の機会をいただき、終始懇切な御指導と御鞭撻を賜りました福岡大学薬学部創剤学教室 加留部 善晴 教授ならびに 高田 二郎 教授に衷心より感謝の意を表します。

本論文を査読して頂き、貴重な御意見、御校閲を賜りました福岡大学薬学部臨床疾患薬理学教室 藤原 道弘 教授ならびに同大学薬学疾患管理学教室 片岡 泰文 教授に深く感謝致します。

本研究の遂行に当り、御助言、御指導いただきました福岡大学薬学部薬学部臨床疾患薬理学教室 三島 健一 准教授、福岡大学薬学部創剤学教室 松永 和久 准教授ならびに 赤穂 菜美 助教に深謝いたします。

本研究の遂行に際し御助力いただきました福岡大学薬学部薬学部創剤学教室の諸氏並びに福岡大学薬学部薬学部臨床疾患薬理学教室の諸氏に深謝いたします。

最後に、本研究に尊い命を提供して頂いた実験動物諸霊に感謝致します。

### 【引用文献】

1. Dirnagl U, Simon RP, Hallenbeck JM. Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends Neurosci.*, **26**(5):248-54. (2003).
2. Gondolessi G. E., Ischaemia-Reperfusion injury and tocopherols. pp 429-444 (2007) in The encyclopedia of vitamin E. eds Preedy V.R. and Watson R.R., CABI International (UK).
3. Arii S., Teramoto K., Kawamura T., Current progress in the understanding of and therapeutic strategies for ischemia and reperfusion injury of the liver. *J. Hepato-Biliary-Pancreatic Surg.*, **10**, 189-194 (2003).
4. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N. Engl. J. Med.*, **14;333**(24):1581-7. (1995).
5. Abe M, Kaizu K, Matsumoto K. A case report of acute renal failure and fulminant hepatitis associated with edaravone administration in a cerebral infarction patient. *Ther. Apher. Dial.*, **11**(3):235-40. (2007).

6. Mishima K, Tanaka T, Pu F, Egashira N, Iwasaki K, Hidaka R, Matsunaga K, Takata J, Karube Y, Fujiwara M. Vitamin E Isoforms  $\alpha$ -tocotrienol and  $\gamma$ -tocopherol prevent cerebral Infarction In mice. *Neuroscience Let.*, **337**:56-60. (2003)
7. Osakada F., Hashino A., Kume T., Katsuki H., Kaneko S., Akaike A.,  $\alpha$ -Tocotrienol provides the most potent neuroprotection among vitamin E analogs on cultured striatal neurons. *Neurppharmacol.*, **47**, 904-915 (2004).
8. Takata J., Hidaka R., Yamasaki A., Hattori A., Fukushima T., Tanabe M., Matsunaga K., Karube Y., Imai K., Novel d- $\gamma$ -tocopherol derivative as a prodrug for d- $\gamma$ -tocopherol and a two-step prodrug for S- $\gamma$ -CEHC. *J. Lipid Res.*, **43**, 2196-2204 (2002).
9. Gianello R., Libinaki R., Azzi A., Gavin P.D., Negis Y., Zingg J.M., Holt P., Keah H.H., Griffey A., Smallridge A., West S.M., Ogru E.,  $\alpha$ -Tocopheryl phosphate: A novel, natural form of vitamin E. *Free Radic. Biol. Med.*, **39**, 970-976 (2005).
10. Rezk B.M., Haenen G.R.M.M., Vijgh W.J.F., Bast A., The extraordinary antioxidant activity of vitamin E phosphate. *Biochem. Biophys. Acta.*, **163**, 16-21 (2004).