

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09762

研究課題名(和文) Drug repositioningによる新規脳梗塞治療法の開発

研究課題名(英文) Drug repositioning for treatment in cerebral ischemia

研究代表者

安部 貴人 (Abe, Takato)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：30365233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの中大脳動脈虚血再灌流モデルにおいて、dimethyl fumarate(DMF)を投与すると梗塞巣が縮小し、神経症状の改善が認められた。さらに神経保護メカニズムをin vivo, in vitroにおいて検討したが、培養細胞におけるin vitroの実験、正常マウスを用いたin vivoの実験では、DMFを投与しても組織にKeap1/Nrf2活性化は認められなかった。また野生型同様Nrf2-/-マウスにおいても梗塞体積が縮小し保護効果を認めた。DMFは脳梗塞における神経保護効果を認めるが、その効果はKeap1/Nrf2活性化には依存していないことが推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳虚血における神経保護薬については、近年の相次ぐ臨床試験の失敗から、製薬企業が臨床での有効性が検証されていない新規ターゲットあるいは化合物に対する投資を控える傾向がある。今回DMFが神経保護効果をもたらすことを報告したが、これは尋常性乾癬やMSの治療に使用され既に製剤化されている。新薬の開発には多大な時間と費用が必要となるが、既に市場で使用されている既存薬を他の疾患治療薬として開発する Drug repositioning では、病気の治療薬として確立されている薬剤を他の病気の治療に役立てることによって、新薬開発における時間とコストを削減することができる。

研究成果の概要(英文)：DMF significantly reduced infarct volume and improved neurological function (assessed by hanging wire test) in the C57BL/6 mice, regardless of the absence of DMF-induced upregulation of heme oxygenase 1, a common downstream gene of the Keap1/Nrf2 system. Furthermore, DMF exhibited neuroprotection in the tMCAO model using Nrf2-/- mice. In cultured mouse neural cells, monomethyl fumarate, which is considered a major metabolite of DMF, did not induce upregulation of messenger RNA of heme oxygenase 1. The oral administration of DMF reduced tissue damage and functional deterioration in a murine tMCAO model, but its neuroprotective effects seemed to be independent of the Keap1/Nrf2 system.

研究分野：神経内科学

キーワード：Nrf2 MCA occlusion stroke

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞は我が国では依然として死因の上位にランクされ、生前においても多くの患者に運動障害や痴呆などの後遺症をのこし、医療費全体に占める割合も大きい。そのためその正確な病態解明と治療法の開発は現代医療の急務といえる。

近年、脳虚血の病態解明が進み、細胞障害カスケードを阻害する神経保護薬の開発が積極的に行われるようになってきた。このような脳保護薬の効果の検討には、従来からげっ歯類の動物モデルが使用されており、なかでも最もよく使われるのがマウスの中大脳動脈閉塞(MCAO)モデルである。しかし動物モデルにおいて保護効果を発揮した多くの神経保護物質について臨床試験が行われたが、実際の臨床試験ではほとんど有効性を示すことができなかった。米国で2000-2005年の6年間で治験が行われた85の神経保護候補薬のなかで、FDAに認可されたものはt-PAのみであった。

神経保護薬の失敗は汎用されるラットやマウスの実験脳虚血モデルと実際のヒトの脳梗塞で相違点が多いためと考えられている。このような問題点を鑑み、神経保護薬の開発に関して新しい研究指針が提唱され、1999年にStroke Therapy Academic Industry Roundtable(STAIR)からpreclinical studyの在り方についての勧告が発表された(Stroke 1999;30;2752-2758)。その中では第2相ないし第3相の臨床治験に到達する前に、質の高い動物実験での有効性を示す必要性が指摘されている。その後もSTAIRの勧告が継続的に出されているが、不十分なpreclinical studyが多いという状況は大きく変わっておらず、2006年のsystematic reviewの報告では550の薬剤のうちSTAIRの勧告を満たしていたのは5件のみであった。しかし、動物実験で良好な結果が得られ、STAIRの勧告を満たしていると考えられたNXY-059(フリーラジカル除去剤)においても、臨床試験で有効性を証明できないという事態が生じている。

近年の相次ぐ臨床試験の失敗から、多くの製薬企業は臨床での有効性が検証されていない新規ターゲットあるいは化合物に対する投資を控える傾向がある。このような状況において、新規化合物の開発ではなく、既に市場で使用されている既存薬を他の疾患治療薬として開発するDrug repositioningが注目されている。新薬の開発には多大な時間と費用が必要となるが、既存薬の再活用(Drug repositioning 又は Drug repurposing、Drug Reprofilng)では、病気の治療薬として確立されている薬剤を他の病気の治療に役立てることによって、新薬開発における時間とコストを削減することができる。神経内科領域においても、抗てんかん薬であるゾニサミドのパーキンソン病での使用(Neurosci Res 41:397-399,2001)、遺伝子組換えヒト顆粒球コロニー形成刺激因子の脳梗塞症例に対する投与(J Stroke Cerebrovasc Dis. 22:1088-97, 2013)、脳虚血に用いられていたエダラボンの筋萎縮性側索硬化症に対する使用(Amyotroph Lateral Scler 7:247-251,2006)、パルプロ酸の脳虚血における効果(Eur J Pharmacol. 707:26-31,2013)、シロスタゾールのアルツハイマー型認知症への効果(PLos one 9(2):e89516,2014)など枚挙にいとまがない。これ以外にも研究報告レベルのものをあわせれば多数の論文があり、新規治療薬の開発は決して非現実的なものではないと考えられる。

2. 研究の目的

脳虚血の病態解明が進んできたにもかかわらず、細胞障害カスケードを阻害する神経保護薬で臨床的に世界的なエビデンスをもつ薬剤は開発されていない。Dimethyl fumarate (DMF)は海外での臨床治験では多発性硬化症の再発予防に対し有効性が証明されているが、これまで脳梗塞における有効性を検討した報告はない。本研究では、脳梗塞に効果があると考えられる既存薬を用いて新たな治療法の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) in vitro 実験

マウスE16胎児基底核よりニューロンの初代培養を行い、培養上清へDMFを添加しKeap1/Nrf2 system 活性を評価する。低酸素インキュベーターを用いて、培養ニューロンに低酸素、低グルコース負荷を行い、in vitroでの脳虚血モデルであるOxygen-glucose deprivation (OGD)を作成し影響をみる。

まずはDMFにつき検討するが、効果が乏しい場合、DMFの代謝産物であるMMFなど同じメカニズムで作用すると考えられるその他の薬剤についても効果を検討していく。

(2) in vivo 実験

動物モデルとしては、小泉モデルとして知られるナイロン系による一過性中大脳動脈閉塞モデルを用いる。成熟雄性マウスをイソフルレン吸入麻酔下に頭皮を切開し、頭蓋骨上にレーザードップラープローブを固定、その後頸動脈を露出する。外頸動脈より、6-0 ナイロン系より作成した塞栓糸を挿入、内頸動脈方向に反転した後、内頸動脈内をウィリス動脈輪の中大脳動脈起始部まで挿入する(図1)。レーザードップラーにより血流の変化をリアルタイムに観察すると、塞栓糸の膨大部がちょうど中大動脈起始部に到達した瞬間に血流が急落する。その位置に塞栓糸を40分間定置し脳虚血を作成、その後塞栓糸を抜去し血流を再開させる(図2)。この手法において、平均血流低下率が手術前の85%以下、再灌流率が80%以上であれば再灌流3日後の梗塞体積が安定し、ほぼ50mm³となることがわかっている。

研究代表者はコーネル大学神経生物学教室にて3年間当モデル作成に従事し十分な経験があり、90%以上の手術がこの基準をみたす。

再灌流 72 時間後に脳を摘出、クライオスタットにて 600 μm 毎にスライスを採取、クレシルバイオレット染色により梗塞巣の体積の評価を行う。また、運動機能の評価として Hanging wire test を再灌流後経時的に施行する。また脳の虚血側と健常側で、部位別にサンプルを採取し、Nrf2 の下流の抗酸化遺伝子群の発現を realtime RT-PCR により検討する。

薬剤の梗塞体積縮小効果を確認した後、再灌流後の治療開始時間の差異による梗塞体積の変化を検討し therapeutic window の検討を行う。また薬剤の投与量と梗塞体積の関係を検討し、用量反応曲線の作成を試みる。また、雌性マウス、永久閉塞モデルにおける効果も検討していく。

図 1 . MCAO における塞栓系の挿入法

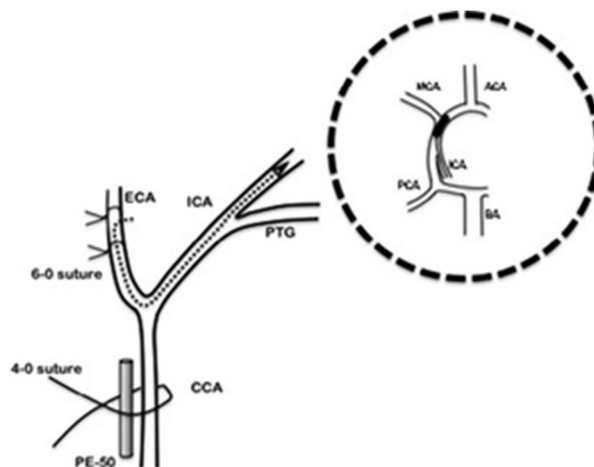
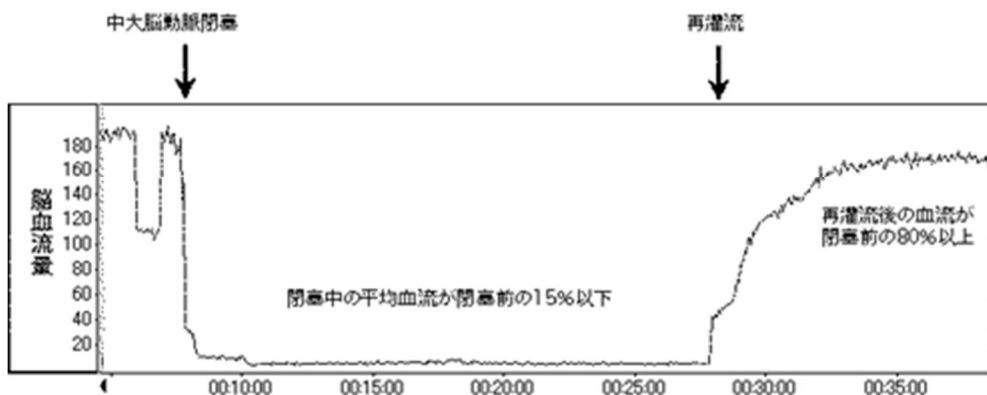


図 2 マウス中大脳動脈閉塞モデルにおける手術中の脳血流変化

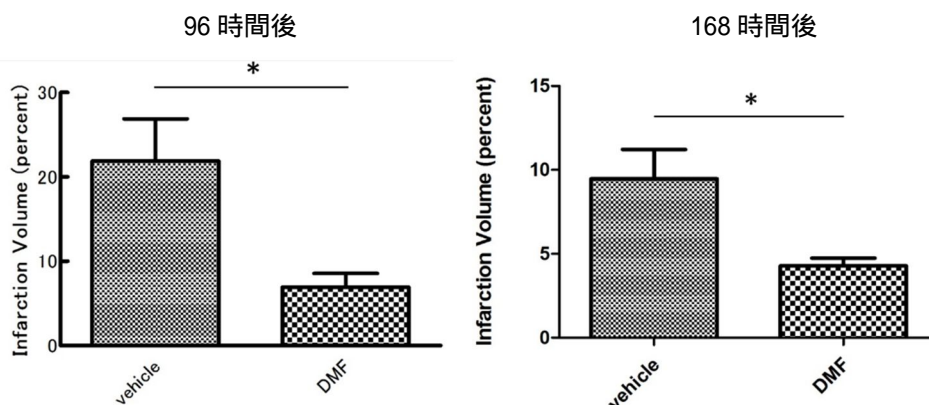


4 . 研究成果

(1) dimethyl fumarate(DMF)の虚血性神経細胞障害保護効果

マウスの中大脳動脈虚血再灌流モデルにおいて、30mg/kg の dimethyl fumarate(DMF)を梗塞後より 2 回/日投与した群では、Vehicle を投与した群に比べ、96 時間、168 時間後に梗塞巣が縮小していた (図 3)。さらに DMF がマウスの脳梗塞後の神経症状に与える影響を検討するため、Hanging wire test により梗塞後の神経症状を評価した。虚血再灌流 168 時間後の時点において、DMF 群では前腕でつかませた wire からの落下までの潜時が 50.6 ± 3.4 秒 ($n=14$) で、control 群の 38.1 ± 4.5 秒 ($n=13$) に比べ優位に延長しており ($p<0.05$)、DMF による神経症状の改善が認められた。

図 3 . DMF 投与後の脳梗塞体積



* $P<0.05$

(2) in vitro における DMF の神経保護機構の検討

また DMF による神経保護メカニズムを培養細胞において検討した。まず RT-PCR により DMF が Keap1/Nrf2 システムに与える影響を検討した。C57BL/6 マウスから培養した細胞 (astroglia、microglia、neurons) を DMSO を投与した vehicle 群、DMF を投与した DMF 群に分け、薬剤投与 6 時間後に mRNA を抽出し、RT-PCR で Nrf2 の下流にある HO-1 の発現の変化を比較した。対照遺伝子としては glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を使用した。各神経系細胞において、DMF 投与により HO-1 の発現が上昇しており、Keap1/Nrf2 系の活性化が示された。

しかし、実際の脳では DMF はまず monomethyl fumarate (MMF) に代謝され、それが血液脳関門を通過し脳に直接作用するといわれている。そのため、MMF でも同様の実験を施行したが、microglia で若干の HO-1 の発現の上昇を認めたものの、neuron、astrocyte では有意な変化を認めなかった。

DMF の神経保護メカニズムを in vivo で解明するため、Nrf2^{-/-}マウスを用いて検討を行った。DMF をマウスに投与し、その後 suture 法による中大脳動脈閉塞再灌流 (MCA-O) モデルを作成し、生じる梗塞体積を検討したところ、野生型マウスでは梗塞体積の縮小を認めたが、Nrf2^{-/-}マウスにおいても梗塞体積が control 群に比べ、DMF 群において縮小していた (DMF 投与群、 $2.7 \pm 0.8\%$ (n=7)、control 群、 $12.5 \pm 3.6\%$ (n=6))。また脳梗塞後の神経症状に与える影響を検討するため、Hanging wire test により梗塞後の神経症状を評価したところ、虚血再灌流 168 時間後の時点において、DMF 群では前腕でつかませた wire からの落下までの潜時が 46.8 ± 2.6 秒 (n=7) で、control 群の 21.8 ± 6.4 秒 (n=6) に比べ優位に延長しており ($p < 0.05$)、DMF による神経症状の改善が認められた。DMF は Nrf2^{-/-}マウスでも神経保護効果を認めており、その効果は Keap1/Nrf2 活性化には依存していないことが推測された。

さらに脳梗塞における DMF の作用機序を検証するために、in vivo で Keap1/Nrf2 システムの下流遺伝子である HO-1 の発現を検討した。まずは正常マウスに DMF を投与することにより HO-1 の発現が上昇するかを検証したが、経胃管及び腹腔内の単回投与では予想に反して DMF を投与しても HO-1 の発現上昇は認められなかった。さらに、MCA-O を行った上で DMF を定期的に投与し HO-1 の発現が変動するか検証した。梗塞側 (右大脳) 健常側 (左大脳) 共に Veh 群と DMF 群で HO-1 の発現に有意な差を認めなかった。しかし、6 時間、12 時間、24 時間いずれの場合でも梗塞側で HO-1 は上昇しており、薬剤とは関係なく生体保護効果が働いていると考えられた。

今後さらに DMF の作用機序を解明するため、HCA2 受容体を介する系、NF- κ B を介する系などについての実験を検討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 南 和志, 安部 貴人, 塚田 直己, 畝川 美悠紀, 菱木 貴子, 末松 誠, 梶村 眞弓, 高橋 慎一, 鈴木 則宏
2. 発表標題 Neuroprotective effects of dimethyl fumarate on transient middle cerebral artery occlusion in mice
3. 学会等名 第59回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazushi Minami, Takato Abe, Naoki Tsukada, Miyuki Unekawa, Shinichi Takahashi, Norihiro Suzuki
2. 発表標題 Neuroprotective effects of dimethyl fumarate on cerebral ischemia-reperfusion injury in mice
3. 学会等名 The 8th Korea-Japan Joint Stroke Conference (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	高橋 慎一 (Takahashi Shinichi) (20236285)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任教授 (32612)	
研究分担者	伊藤 義彰 (Itoh Yoshiaki) (90265786)	大阪市立大学・大学院医学研究科・教授 (24402)	