

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10913

研究課題名(和文) 脊髄損傷に対する新規神経保護薬の開発

研究課題名(英文) Development of a novel neuroprotection drug for spinal cord injury

研究代表者

浅野 毅 (Asano, Tsuyoshi)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：50722493

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：血液脳脊髄関門保護効果を有する薬剤同定のハイスループットスクリーニング(HTS)方法を確立した。次に、既存薬のスクリーニングによって、候補薬剤を同定し、in vitro血液脳脊髄関門モデル、マウス脊髄損傷モデルによって、候補薬剤が血液脳脊髄関門保護効果を持つことを確認した。また、候補薬剤の1つであるBerberineを脊髄損傷マウスに投与することで、歩行機能が向上し、損傷脊髄の損傷範囲が減少することが明らかになった。これら一連の結果は、今回開発したHTS方法が血液脳脊髄関門機能保護効果を持つ薬剤の絞り込みに有用であり、同定された薬剤が脊髄損傷に対する神経保護効果を持つことを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血液脳脊髄関門は中枢神経に広く分布し、中枢神経の恒常性維持に重要な役割を果たしている。血液脳脊髄関門破綻は脊髄損傷のような外傷のほか、神経免疫疾患、神経変性疾患などの病態の増悪に関与しており、血液脳脊髄関門の機能保護は各種中枢神経疾患の予防および治療のターゲットとなっている。本研究で開発した薬剤スクリーニング方法によって同定された薬剤が、実際に血液脳脊髄関門機能保護を介して、神経保護機能を示したことは、本スクリーニング方法の有用性を示し、中枢神経疾患に対する新規薬剤同定方法になりうると考える。

研究成果の概要(英文)：The current study has developed a high-throughput screening assay (HTSA) for identifying drugs to protect the blood brain spinal cord barrier (BBSCB) function. Actual screening of FDA approved drugs by this HTSA identified Berberine as a potential drug to protect BBSCB. Berberine protected BBSCB functions from oxygen-glucose deprivation and reoxygenation stress in vitro coculture model as well as cervical spinal cord injury (SCI) and traumatic brain injury models. Furthermore, Berberine reduced lesion size and neuronal loss and improved gait performances after cervical SCI in mice. The current study established the useful HTSA to find potential neuroprotective drugs by maintaining BBSCB functions and identified Berberine as a novel BBSCB protection drug.

研究分野：整形外科学

キーワード：血液脳脊髄関門 脊髄損傷 神経保護 ハイスループットスクリーニング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳・脊髄損傷などの外傷性中枢神経損傷を受傷すると、一次損傷に引き続き二次損傷が起こり、高度機能障害が生じる。しかし、中枢神経の再生能力は低く、近年の医療の発展にも関わらず、未だ有効な治療方法はなく、新規治療方法の開発が求められている。本質的治癒のために、組織再生が必要であることは論を待たないが、障害を最小限にする二次損傷の軽減もまた同等に重要である。二次損傷は、細胞障害性物質および炎症細胞が損傷周囲組織へ浸潤し、それらが、浮腫、酸化、炎症などを引き起こし、アポトーシス、ネクローシスなどの機序により、神経細胞およびグリア細胞の死とそれに付随した脱髄が起きる複合的な現象であるが、血液脳脊髄関門 (Blood-Brain Spinal Cord Barrier: BBSCB) の破綻が、これらの細胞障害性物質、および炎症細胞の浸潤を拡大させる。

これまでの二次損傷抑制に関する研究は、炎症反応や酸化作用の抑制など、細胞毒性を有する現象を抑制するもの、あるいは神経細胞保護薬によって、それらの毒性に対する、神経細胞の耐性を上げようとするものであった。これらの介入は、動物実験ではある程度の効果を示しているが、臨床的な効果を示すまでには至っていない。一方、BBSCBの破綻を防げれば、二次損傷を軽減できることがわかっていたが、その具体的方法は未だ確立されておらず、血管内皮細胞保護薬に関する研究もほとんどなかった。

2. 研究の目的

以上より、我々は BBSCB に着目し、その主要構成細胞である脳脊髄血管内皮細胞の保護薬は BBSCB の破綻を防ぎ、外傷性中枢神経損傷後の二次損傷を防ぐと仮説を立て、一連の研究を行った。本研究の目的は、(1)脳脊髄血管内皮細胞保護効果を持つ薬剤探索のための high-throughput screening assay (HTSA)を確立すること、(2)新規 HTSA を用いた *in vitro* スクリーニングにより候補化合物を同定すること、さらに(3)候補化合物の効果を *in vivo* により検証することである。

3. 研究の方法

(1)HTSA 確立の条件検討をするため、まずヒト脳血管内皮細胞株 (hCMEC/D3) を 96 well plate で培養し、過酸化水素 (H₂O₂) を細胞障害性負荷として添加した。H₂O₂ の濃度が、細胞活性、細胞毒性、細胞死に与える影響を、各々 PrestoBlue、LDH アッセイ、Propidium Iodide (PI) 染色によって評価し、HTSA に最適な負荷条件を確定した (各 N=3/群)。さらに、スクリーニング薬剤の溶解に使用する Dimethyl sulfoxide (DMSO) の細胞活性に影響を検証した (N=9/群) (図 1)。

(2)HTSA の妥当性、信頼性を評価するため、自動分注装置を使用して最適な負荷条件を再現し、HTSA の評価基準である、Z'-factor, signal/background ratio (S/B ratio), coefficient of variation (CV) を算出した (N=4 × 3sets/群)。

(3)新規 HTSA を用いて、本学が保有する既存薬 1,600 種のスクリーニングを実施した。2SD 以上の細胞活性を示したヒット候補薬剤には再現性試験を 3 回行い、少なくとも 1 回以上再現性があったものをヒット薬剤とした。ヒット薬剤のうち、早期臨床応用可能な薬剤を選定し、候補薬剤として更なる試験を進めた。

(4)候補薬剤の濃度依存性を、候補薬剤を H₂O₂ 負荷と同時に投与して、検討した (N=4/群)。また、異なる細胞傷害性負荷として無酸素・無糖 (oxygen-glucose deprivation; OGD) 条件下での薬剤の血管内皮細胞保護効果を評価した (N=5/群)。

(5)候補薬剤の *in vitro* BBSCB 機能保護効果を検討するため、ラット脳初代培養細胞による *in vitro* BBSCB 共培養モデルを作製し、OGD 負荷条件下に、経上皮電気抵抗 (Trans-endothelial electrical resistance: TEER) と sodium fluorescein (Na-F) 透過性を測定した。また、Western blotting 法で Tight-junction (TJ) protein の発現を検討した。

(6)中枢神経損傷後の BBSCB 機能保護効果を検討するため、成体雄性 C57BL/6 マウスの第四頸椎高位の脊髄後索損傷 (spinal cord injury (SCI) モデル) を wire-knife を使用して作成した。候補薬剤または生理食塩水を損傷作成前日と損傷直後に投与し、損傷部周囲の IgG 漏出範囲を組織学的に定量した (N=6/群)。

(7)中枢神経損傷後の神経保護効果を検討するため、成体雄性 C57BL/6 マウスに前述と同様の SCI モデルを作成し、候補薬剤または生理食塩水を 1 週間投与した。8 週後に損傷範囲と神経細胞死の範囲を組織学的に定量した。また、DigiGait 歩行解析システムを使用した歩行解析を行った (N=12/群)。

4. 研究成果

(1) H₂O₂ 濃度 500 μM 以上、負荷時間 6 時間で、脳血管内皮細胞死を観察した。一方、細胞活性は 350 μM から低下を開始し、細胞毒性は、400 μM から上昇を示し、PrestoBlue を使用した細胞

胞活性が、一番早期に細胞の変化を検知することが判明した。

(2)自動分注装置を用いた HTSA で、H₂O₂ 濃度 450 μM において、Z' -factor が 0.75、S/B ratio は 2.9、CV が 4%と HTSA の妥当性、信頼性の基準 (Z' -factor ≥ 0.5、S/B ratio ≥ 2、CV ≤ 0.1) を最も高い水準でクリアした。

(3)1,600 の既存薬剤をスクリーニングした結果 (図 2)、ヒット薬剤は 44 種 (2.8%)、さらに再現性試験によって、37 種 (2.3%) となった。ヒット薬剤のうち、安全かつ安定した国内承認薬剤である Berberine は早期臨床応用に有利と考え、優先的に更なる試験に進めた。

(4)Berberine は H₂O₂ 負荷との同時投与において、濃度依存的に脳血管内皮細胞保護効果を有した。さらに OGD 条件下でも保護効果を示した。

(5)Berberine は in vivo BBSCB モデルで、OGD 負荷条件下の TEER を有意に増加させ、Na-F 透過性を有意に低下させた。さらに ZO-1、VE-cadherin、occludin、claudin-5 の発現を有意に上昇させた。このことは、Berberine は in vivo BBSCB の機能保護効果があることを示している。

(6)Berberine 投与群と Control 群を比べ、TBI モデル、SCI モデルともに損傷の大きさには差はなかったものの、Berberine 投与群で損傷部周囲の IgG 漏出範囲が有意に小さかった。このことは、Berberine は中枢神経損傷モデルにおいて、BBSCB の機能保護効果があったことを示している。

(7)Berberine 投与群と Control 群を比べ、頸髄損傷部の大きさには差はなかったものの、損傷範囲と神経細胞死の範囲は Berberine 投与群で有意に小さかった。また、歩行解析では、両群間で粗大運動に関するパラメーターには差を認めなかったが、協調運動に関するパラメーターで Berberine 投与群が有意に改善を認めた。

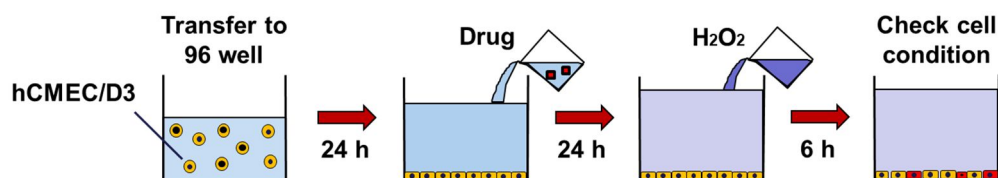


図 1 . HTSA の概要

型コラーゲンでコーティングした 96 well plate に hCMCE/D3 を 5,000 cells/well で EBM-2 培地 80 μL とともに各 well に播種した。24 時間細胞培養し接着させた後、薬剤投与を想定した EBM-2 培地 (血清含有) 20 μL を添加した。さらに 24 時間経過した後、H₂O₂ 含有培地 20 μL を添加し、6 時間後に細胞状態を評価した。

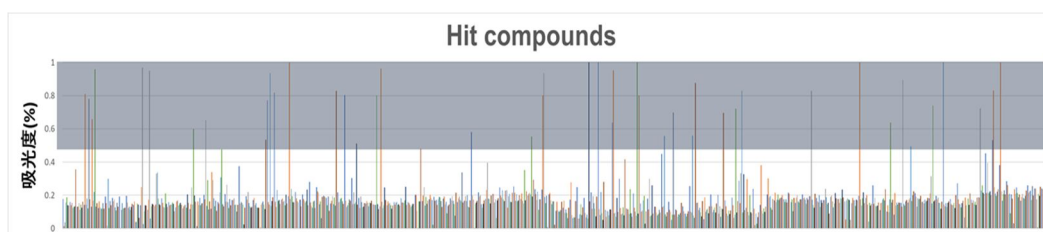


図 2 . 新規 HTS を用いた一次スクリーニング

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 鈴木裕貴、角家健、中川慎介、遠藤健、松居祐樹、袁儒非、浅野毅、岩崎倫政
2. 発表標題 血液脳脊髄関門の機能保護に注目した中枢神経保護薬の開発
3. 学会等名 第24回グリアクラブ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Suzuki Y, Kadoya K, Endo T, Matsui Y, Iwasaki N.
2. 発表標題 Establishment of High-throughput assay for identifying potential compounds to protect brain endothelial cells from oxidative stress
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society 2018 annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Suzuki Y, Kadoya K, Endo T, Matsui Y, Rufei Y, Asano T, Nakagawa S, Iwasaki N
2. 発表標題 Newly Developed High-throughput Screening Assay Identifies Potential Drugs to Protect Blood-Brain Barrier.
3. 学会等名 1st International Symposium on Signal Transduction at the Blood-Brain Barriers (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Suzuki Y, Kadoya K, Endo T, Matsui Y, Rufei Y, Asano T, Nakagawa S, Iwasaki N
2. 発表標題 Newly Developed High-throughput Screening Assay Identifies Berberine as a Potential Drug to Protect Blood-Brain Barrier from toxic stresses
3. 学会等名 Neuroscience 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木裕貴、角家健、中川慎介、遠藤健、松居祐樹、袁儒非、浅野毅、岩崎倫政
2. 発表標題 新規High-throughput screening assayが同定したBerberineの血液脳脊髄関門保護薬としての可能性
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Suzuki Y, Kadoya K, Endo T, Matsui Y, Rufe Y, Asano T, Nakagawa S, Iwasaki N
2. 発表標題 Newly Developed High-throughput Screening Assay Identifies Potential Drugs to Protect Blood-Brain Barrier.
3. 学会等名 1st Mini-symposium on the blood-brain barrier from basic to clinical research (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Suzuki Y, Kadoya K, Endo T, Matsui Y, Rufe Y, Asano T, Nakagawa S, Iwasaki N.
2. 発表標題 Drug repositioning for new CNS injury treatment: Targeting on protection of Blood-brain barrier.
3. 学会等名 The XIV European Meeting on Glial Cells in Health and Disease, (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuki Suzuki, Ken Kadoya, Takeshi Endo, Yuki Matsui, Yuen Rufe Y, Tsuyoshi Asano, Shinsuke Nakagawa, Norimasa Iwasaki.
2. 発表標題 Development of High-throughput Assay to Screen Potential Drugs to Protect Blood Brain Spinal Cord Barrier Identifies Berberine as Neuroprotection Drug for Spinal Cord Injury.
3. 学会等名 The 66th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society 2020 annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木裕貴、角家健、遠藤健、松居祐樹、袁儒非、浅野毅、中川慎介、岩崎倫政
2. 発表標題 ドラッグリポジショニングによる脊髄損傷治療薬の開発：血液脊髄関門機能保護
3. 学会等名 第92回日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木裕貴、角家健、遠藤健、松居祐樹、袁儒非、浅野毅、中川慎介、岩崎倫政
2. 発表標題 血液脊髄関門機能保護に注目した脊髄損傷治療薬の開発
3. 学会等名 第38回日本運動器移植・再生医学研究会
4. 発表年 2019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	中川 慎介 (Asano Shinsuke) (10404211)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・講師 (17301)	
研究 分担者	角家 健 (Kadoya Ken) (30374276)	北海道大学・医学研究院・特任准教授 (10101)	