

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06695

研究課題名(和文) アストログリアを標的とする新規脳浮腫治療薬および脳機能改善薬の開発

研究課題名(英文) Development of novel astrocyte-targeted drugs against brain edema and neuronal injury

研究代表者

小山 豊 (Koyama, Yutaka)

神戸薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：00215435

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：外傷性脳損傷から脳を保護する薬物開発を目的に、マウス脳傷害モデルおよび培養細胞を用い、次の知見を得た。エンドセリン(ET)拮抗薬であるbosentanおよびambrisentanは、外傷性脳損傷による血液脳関門(BBB)の破綻を伴う脳浮腫を抑制した。ET拮抗薬は、アストログリアが産生する脳浮腫惹起因子の産生を抑制すると共に、BBB機能を高める因子の産生を増加させた。培養アストログリアのETB受容体の刺激は、神経突起の伸長を妨げるephrinの発現を抑制した。以上の結果は、アストログリアのETB受容体は、外傷性脳損傷による神経障害を改善する薬物の新たな標的分子となり得ることを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

外傷性脳損傷は、交通事故や高所からの落下により頭部を殴打した際に生じる病態で、単に致命的なだけでなく存命した患者にも半身まひや記憶障害など大きな後遺症を残す。しかし現在、外傷性脳損傷に対する有効な薬物による治療方法は確立されていない。本研究は外傷性脳損傷治療薬の開発を目指し、アストログリアの機能を活用しようとしたものである。動物実験から得られた結果は、アストログリアのET受容体の阻害により外傷性脳損傷での神経障害を抑制し得ることを示すものであった。本研究結果を更に発展させることで、新たな外傷性脳損傷の治療薬が開発される可能性がある。

研究成果の概要(英文)：For the purpose to generate novel neuroprotective drugs, we made basic researches in animal models of traumatic brain injury (TBI) and the following findings were obtained. (1) Endothelin (ET) antagonists bosentan and ambrisentan reduced TBI-induced brain edema accompanied by disruption of the blood-brain barrier (BBB). (2) Administrations of ET antagonists to a mouse TBI model decreased productions of astroglia-derived brain edema-inducing factors, while these ET antagonists increased productions of factors that protect BBB. (3) Stimulation of ETB receptors in cultured astroglia decreased expressions of ephrin, which interferes with neurite outgrowth. These results suggest that the ETB receptor of astroglia may be a new target molecule for drugs that improve nerve damage caused by TBI.

研究分野：薬理学

キーワード：アストログリア エンドセリン 脳浮腫 神経再生 ETB受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳卒中や外傷性脳損傷等の脳疾患の重篤性は単に致死的なだけでなく、存命した患者にも後遺症として、運動、言語・学習能力に大きな障害を残すことにある。しかしその社会的要請に関わらず、未だ有効な薬物治療が確立したとは言えない。脳損傷の急性期では、遅発性神経細胞傷害に先立ち生じる「脳浮腫」が死因となる場合が多い。脳浮腫の発症は、脳血管内皮細胞の透過性亢進が主因で、脳内への流入した膠質分子が頭蓋内圧を上昇させ、神経細胞を圧迫し傷害する。現在、この脳浮腫治療は利尿薬投与など対処治療が行われ、その惹起原因を除くことを目指す「血管の透過性亢進を抑制する脳浮腫治療薬」はない。一方、脳損傷による後遺症の改善についてもその重要性に関わらず、改善法は理学療法のみで、有効な薬物は確立していない。後遺症の改善薬についてはこれまで「神経系再生を促進させ、失った脳機能を回復させる」という考え方から、内因性の神経栄養因子類を修飾したペプチド性薬物や幹細胞を基盤とした細胞製剤の開発研究が行われた。しかしこれらの薬物は、理論的には有効性が期待されたものの、投与方法の困難さ、あるいは末梢組織での有害作用の発生により、広く実用化に至ってはいない。そのため現在、新たな治療戦略に基づく後遺症改善薬の開発が待たれている。一方、グリア細胞の一種であるアストログリアが、「脳浮腫」や「神経系再生」に深く関与することが明らかとなり、アストログリアの機能をこれら脳疾患の改善に利用しようとする検討がなされている。このような背景のもと、我々はエンドセリン B(ET_B)受容体の脳損傷により生じるアストログリアの機能変化における役割を研究し、本受容体がアストログリアの機能変化をコントロールし得ることを明らかにしている。

2. 研究の目的

外傷性脳損傷は、致死的なだけでなく存命した患者にも半身まひや記憶障害など大きな後遺症を残す重篤な病態である。しかし現在、外傷性脳損傷に対する有効な薬物治療方法は確立されていない。我々は既に、アストログリアの ET_B 受容体が、脳損傷時に産生される種々の生理活性物質の発現変化に関わることを明らかにした。そして、これらの知見を発展させ、アストログリアの ET_B 受容体を“脳損傷急性期の脳浮腫の改善する薬物”と“慢性期での神経再生を促進する薬物”という2つのタイプの薬物の標的分子として応用することの可能性を、外傷性脳損傷モデルを用いて検討している。その検討の中で、ET_B 受容体拮抗薬 BQ788 が、外傷的脳損傷モデルでの脳浮腫を抑制することが示された。そこで本研究は、ET_B 受容体拮抗薬の脳浮腫抑制作用のメカニズム、既に臨床応用されている ET 拮抗薬(bosentan および ambrisentan)の脳浮腫抑制に対する有効性 ET_B 受容体、およびアストログリアの神経再生調節因子の発現における ET_B 受容体の作用、を明らかにすることを目的として遂行された。

3. 研究の方法

- (1)ET_B 受容体拮抗薬による外傷性脳損傷による脳血管透過性亢進の抑制：実験には外傷性脳損傷モデルとして頻用される Fluid percussion 傷害(FPI)を用い、ET 拮抗薬の有効性を検討した。マウス大脳に FPI を加え、血管透過性調節因子(MMPs、VEGF、ANG-1、sonic hedgehog)および脳浮腫関連分子(NKCC1)の発現変化を定量的 RT-PCR および ELISA により測定した。次いでこれらの因子が、アストログリアより産生されているのかを、抗体を用いた組織化学により検討した。また同時に、同実験モデルで生じる血液脳関門の破綻が ET_B 拮抗薬により抑制されるかを検討した。透過性の評価は、Evans blue の脳内漏出量の測定により行った。
- (2)In vitro 外傷性脳損傷モデルでの血管透過性調節因子の発現：培養ディッシュに播種されたマウス大脳アストログリアに、FPI 装置を用いて 7 atom の圧をかけ、細胞傷害を惹起した。傷害 48 時間後、total RNA を調整した。
- (3)ET_B 受容体刺激薬による神経突起伸長抑制分子の発現低下：ラット大脳由来培養アストログリアを用い、神経突起伸長抑制分子である ephrin の発現が ET_B 受容体刺激薬により変化するかを定量的 PCR およびイムノプロットで観察した。
- (4)ET_B 受容体刺激薬投与によるラット大脳での ephrin 発現の変化：4 週令のラット脳室内に ET_B 受容体刺激薬 Ala-ET-1(500pmol/day)を、浸透圧ポンプを用いて 7 日間投与した。大脳より total RNA を抽出し、ephrin 発現量を定量的 RT-PCR で測定した。

4. 研究成果

- (1)外傷的脳損傷後の脳浮腫抑制について、臨床で肺動脈性肺高血圧症の治療薬として用いられる ET 受容体拮抗 bosentan と ambrisentan の作用を検討した。マウス外傷性脳損傷モデルにおいて、脳損傷直後からの bosentan および ambrisentan の静脈内投与は血液脳関門の破綻および脳浮腫の発生を抑制した。一方、脳損傷 2 日後からの投与では、bosentan は抑制効果を示した一方、ambrisentan には有意な効果がなかった。このことはこれら既存の ET 拮抗薬は、脳浮腫の改善薬としても有効であることを示唆する(Michinaga et al., *Neuropharmacol.*, 2020)。また、bosentan は、培養アストログリアにおいて ET-1 により発現増加する脳浮腫惹起因子(MMP9, VEGF, prepro-ET-1)の発現を抑制した。これらの結果は、既に臨床応用されている ET 拮抗薬

は、外傷性脳損傷時の脳浮腫抑制に対しても有効性を示すことを示唆する。

- (2)ET_B拮抗薬の脳浮腫抑制メカニズムについて検討し、脳損傷後のET_B受容体拮抗薬 BQ788 が脳微小血管のバリア機能を高める angiopoietin-1 および sonic hedgehog の発現をアストログリアで増加させること、その結果、脳血管内皮細胞でのタイトジャンクション形成を高めることを明らかにした(Michinaga et al.,*J.Neurochem.*,2020; *Neurochem.Int.*,2021)。また、In vitro 外傷性脳損傷モデルで増加した sonic hedgehog 発現に対して、ET-1 はその発現を down-regulate する因子であることが示された。
- (3)Na⁺/K⁺/Cl⁻共輸送体(NKCC1)は、アストログリアに多く発現し、脳傷害時の発現増加が脳浮腫発生の一因となる。培養アストログリアにおいて、ET-1 はNKCC1 の発現を増加させた。また外傷性脳損傷モデルの脳で増加したNKCC1 発現は、BQ788 で抑制された。この結果は、ET_B受容体遮断の脳浮腫抑制作用にNKCC1 の発現減少が関与することを示唆する。
- (4)ET_B受容体を介した反応性アストログリア誘導のメカニズムについて検討し、培養アストログリアのET_B受容体の刺激が、転写因子である Stat3 を活性化すること、マウス外傷性脳損傷モデルでの Stat3 活性化が、BQ788 で減弱することを見出した。また、ET_B受容体を介した Stat3 活性化が、反応性アストログリアの増殖促進に関わることを明らかにした(Koyama et al., *J.Biol.Chem.*,2019)。
- (5)ET-1 は培養アストログリアで、神経突起伸展の抑制分子 ephrin-A2, -A4, -B2 および-B3 の発現を低下させることを見出し、アストログリアの ET_B受容体の刺激が神経突起促進作用を持つことを示唆した(Koyama et al.,*Neurosci Lett.*,2021)。一方、ラット脳室内へのET_B受容体刺激薬 Ala-ET-1(500pmol/day)の持続投与は、脳での ephrin-A2, -A4, -B2 および-B3 発現には影響しなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Michinaga Shotaro, Tanabe Ayami, Nakaya Ryusei, Fukutome Chihiro, Inoue Anna, Iwane Aya, Minato Yukiko, Tujiuchi Yu, Miyake Daisuke, Mizuguchi Hiroyuki, Koyama Yutaka	4. 巻 154
2. 論文標題 Angiotensin 1/Tie 2 signal after focal traumatic brain injury is potentiated by BQ788, an ET B receptor antagonist, in the mouse cerebrum: Involvement in recovery of blood-brain barrier function	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 330 ~ 348
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jnc.14957	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Koyama Yutaka, Sumie Satoshi, Nakano Yasutaka, Nagao Tomoya, Tokumaru Shiho, Michinaga Shotaro	4. 巻 294
2. 論文標題 Endothelin-1 stimulates expression of cyclin D1 and S-phase kinase-associated protein 2 by activating the transcription factor STAT3 in cultured rat astrocytes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 3920 ~ 3933
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA118.005614	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Michinaga Shotaro, Koyama Yutaka	4. 巻 20
2. 論文標題 Dual roles of astrocyte-derived factors in regulation of blood-brain barrier function after brain damage	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 571 ~ 571
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20030571	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Michinaga Shotaro, Inoue Anna, Yamamoto Hayato, Ryu Ryotaro, Inoue Ayana, Mizuguchi Hiroyuki, Koyama Yutaka	4. 巻 175
2. 論文標題 Endothelin receptor antagonists alleviate blood-brain barrier disruption and cerebral edema in a mouse model of traumatic brain injury: A comparison between bosentan and ambrisentan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuropharmacology	6. 最初と最後の頁 108182 ~ 108182
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuropharm.2020.108182	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Koyama Yutaka, Tsuboi Sayaka, Mizogui Fuka	4. 巻 741
2. 論文標題 Endothelin-1 decreases the expression of Ephrin-A and B subtypes in cultured rat astrocytes through ETB receptors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 135393 ~ 135393
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2020.135393	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Michinaga Shotaro, Inoue Ayana, Sonoda Kyomi, Mizuguchi Hiroyuki, Koyama Yutaka	4. 巻 146
2. 論文標題 Down-regulation of astrocytic sonic hedgehog by activation of endothelin ETB receptors: Involvement in traumatic brain injury-induced disruption of blood brain barrier in a mouse model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 105042 ~ 105042
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuint.2021.105042	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Koyama Yutaka	4. 巻 22
2. 論文標題 Endothelin ETB receptor-mediated astrocytic activation: Pathological roles in brain disorders	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4333 ~ 4333
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22094333	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Shotaro Michinaga, Anna Inoue, Hayato Yamamoto, Ryotaro Ryu, Hiroyuki Mizuguchi, Yutaka Koyama
2. 発表標題 Bosentan, an endothelin receptor antagonist ameliorates vasogenic edema after traumatic brain injury in mice
3. 学会等名 The Sixteenth International Conference on Endothelin (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 道永 昌太郎、田邊 彩美、山本 隼人、龍 亮太郎、水口 博之、小山 豊
2. 発表標題 エンドセリンETB受容体拮抗薬BQ788による頭部外傷マウスにおける血管修復因子Angiopoietin-1の発現増加およびTie-2受容体の活性化
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 道永 昌太郎、井上 杏奈、山本 隼人、龍 亮太郎、水口 博之、小山 豊
2. 発表標題 エンドセリン受容体拮抗薬Bosentanによる頭部外傷後の血管原生脳浮腫に対する抑制効果
3. 学会等名 第135回 日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小山 豊、濱田靖祥、井高佐知子、長田彩夏、道永昌太郎
2. 発表標題 エンドセリンETB受容体を介するアストロサイトNa-K-Cl共輸送体-1(NKCC1)の発現増加
3. 学会等名 第136回 日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 道永 昌太郎、田邊 彩美、山本 隼人、水口 博之、小山 豊
2. 発表標題 エンドセリンETB受容体拮抗薬によるAngiopoietin-1-Tie-2シグナルを介した頭部外傷後のBlood-brain barrier破綻に対する抑制効果
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小山 豊
2. 発表標題 アストログリアを標的とした脳機能改善薬の開発：BBB保護と脳浮腫の抑制
3. 学会等名 (社)予防薬理学研究所キックオフシンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yutaka Koyama, Satoshi Sumie, Yasutaka Nakano, Tomoya Nagao, Shiho Tokumaru, and Shotaro Michinaga
2. 発表標題 Endothelin-1 stimulates transcription of cyclin D1 and Skp2 through activation of Stat3 in cultured rat astrocytes
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shotaro Michinaga, Ryusei Nakaya, Chihiro Fukutome, Anna Inoue, Aya Iwane, Ayami Tanabe, Hayato Yamamoto, Ryotaro Ryu, Hiroyuki Mizuguchi and Yutaka Koyama
2. 発表標題 Blockade of endothelin ETB receptor ameliorates brain edema by regulation of astrocyte-derived factors after traumatic brain injury in mice
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 道永 昌太郎, 中谷 隆聖, 福留 千裕, 井上 杏奈, 岩根 綾, 田邊 彩美, 山本 隼人, 龍 亮太郎, 水口 博之, 小山 豊
2. 発表標題 頭部外傷マウスにおけるBlood-brain barrierの破綻および脳浮腫に対するエンドセリン受容体拮抗薬Bosentanの効果
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 道永 昌太郎, 中谷 隆聖, 福留 千裕, 井上 杏奈, 岩根 綾, 田邊 彩美, 山本 隼人, 水口 博之, 小山 豊
2. 発表標題 頭部外傷マウスのBlood-brain barrier破綻に対する エンドセリンETB受容体拮抗薬BQ788による 血管修復因子Angiopoietin-1の発現増加を介した抑制効果
3. 学会等名 第134回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shotaro Michinaga, Ryusei Nakaya, Chihiro Fukutome, Anna Inoue, Aya Iwane, Ayami Tanabe and Yutaka Koyama
2. 発表標題 Blockade of endothelin ETB receptor ameliorates blood-brain barrier disruption through increase of angiopoietin-1 after traumatic brain injury in mice
3. 学会等名 The 18th World Congress of Basical and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 道永 昌太郎, 井ノ上 彩奈, 園田 清美, 水口 博之, 小山 豊
2. 発表標題 エンドセリンETB受容体拮抗薬BQ788によるsonic hedgehogの発現増加を介した頭部外傷後のBlood-brain barrier破綻に対する抑制効果
3. 学会等名 第138回 日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井川 紗央 里, 泉 安彦, 久米 利明, 八巻 耕 也, 小山 豊
2. 発表標題 神経炎症に対するNrf2活性化薬によるドパミン神経保護作用～人工知能による計数～
3. 学会等名 第70回 日本薬学会関西支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 道永 昌太郎, 井上 杏奈, 龍 亮太郎, 大西 一也, 稲月 直樹, 水口 博之, 小山 豊
2. 発表標題 エンドセリン受容体拮抗薬ボセンタンの外傷性脳損傷に対する治療効果の検討
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021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	泉 安彦 (Izumi Yasuhiko) (60456837)	神戸薬科大学・薬学部・講師 (34512)	
研究分担者	道永 昌太郎 (Michinaga Shotaro) (60624054)	大阪大谷大学・薬学部・助教 (34414)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------