

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 3 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2012

課題番号：20591699

研究課題名（和文）クモ膜下出血後の脳血管攣縮に対する蛋白リン酸化酵素 C をターゲットにした創薬の研究

研究課題名（英文）Research for producing therapeutic agents on protein kinase C to inhibit cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage

研究代表者

西澤 茂 (NISHIZAWA SHIGERU)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：40135257

研究成果の概要（和文）：クモ膜下出血後には脳血管攣縮という病態が発生し、クモ膜下出血後の患者の予後を決定づける。脳血管攣縮発生の機序は不明であったが、研究者のこれまでの研究で、脳血管平滑筋細胞内に存在する蛋白リン酸化酵素 C（以下 PKC）がその発生に関与することが明らかになった。PKC には 11 種類の isoform が存在し、脳血管攣縮発生・維持に関与するのは PKCa と PKCd であることを研究者は明らかにした。そこで両者の PKC を阻害することで脳血管攣縮の予防ができるとの仮説のもとに、両者を阻害する創薬を開発することが研究の目的である。まず両者を阻害する化学物質を発見し、それを創薬化し生体に注入することで脳血管連攣縮が予防できるかを検討した。創薬化するために様々な検討、実験を行ったが、創薬化は困難であった。現時点では持続的にクモ膜下腔にカテーテルを挿入し、両者の阻害物質を持続的に注入することがもっとも現実的であると結論された。

研究成果の概要（英文）：Cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage (SAH) is an important factor to improve prognosis of the SAH patients. The mechanisms of cerebral vasospasm has still been unknown. PKCa and PKCd are most important candidates to produce cerebral vasospasm according to our own research results. The aim of this research is to search an inhibitor on both PKC isoforms and to produce therapeutic agents for inhibition of cerebral vasospasm. An inhibitor was found through the research, but production of therapeutic agent has no been available. Insertion of a catheter into subarachnoid space and continuous administration of the drug is considered to be a realistic way so far.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 20 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
平成 21 年度	700,000	210,000	910,000
平成 22 年度	500,000	150,000	650,000
平成 23 年度	500,000	150,000	650,000
平成 24 年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：クモ膜下出血 脳血管攣縮 蛋白リン酸化酵素 C アイソフォーム 創薬

1. 研究開始当初の背景

クモ膜下出血は死亡率の高い脳血管障害であるが、近年手術手技、血管内手術手技等が進歩し、再出血を防止する初期の治療成績は向上している。しかし、クモ膜下出血では出血後数日して発生する遅発性脳血管攣縮という病態があり、これによって遅発性に脳虚血が発生する。初期治療に成功した患者の予後が脳血管攣縮によって決定付けられる。しかし、いまだに脳血管攣縮の発生機序、原因は解明されていない。

研究者自身のこれまでの研究でこの脳血管攣縮発生・持続には脳血管平滑筋内に存在する蛋白リン酸化酵素 C (以下 PKC) が重要な働きをしていることが明らかになった。PKC には 11 種類の isoform があるが、なかでも PKCa と PKCd が重要な役割を果たしていることを明らかにした。PKCd は脳血管攣縮の発生に、PKCa はその持続に関与することを明らかにした。犬を用いた動物実験で PKC 阻害剤をクモ膜下腔に注入すると血管撮影上で脳血管攣縮は抑制され、さらに犬の脳血管を取り出して Western blotting をおこなってみると、PKCa と PKCd の両者の発現が抑制されていることが明らかになった。

2. 研究の目的

研究者自身のこれまでの研究成果から、PKCa と PKCd の両者を抑制する薬剤を発見し、それを創薬として生体内に注入することができれば、クモ膜下出血患者に発生する脳血管攣縮を抑制することができ、治療効果がさらに向上する可能性がある。本研究の目的は PKCa と PKCd の両者を抑制する阻害剤を創薬として開発することである。

3. 研究の方法

(1) まず PKCa と PKCd の両者を抑制できる化学物質を high through-put screening method で発見することである。その中で、PKCa と PKCd の阻害効果が最も効果的なものを検索することである (つまり、両者の IC50 value がほぼ同じであることが必要)。

(2) 犬の自家血 2 回出血モデルでクモ膜下出血、脳血管攣縮モデルを作成し、その後発見された化学物質をクモ膜下腔に注入し、実際に血管撮影上で脳血管攣縮が抑制されるかどうかを検討する。

(3) 脳血管攣縮をおこした犬の脳血管を摘出し、Western blotting で PKCa と PKCd の発現が実際に抑制されているかどうか検討する。

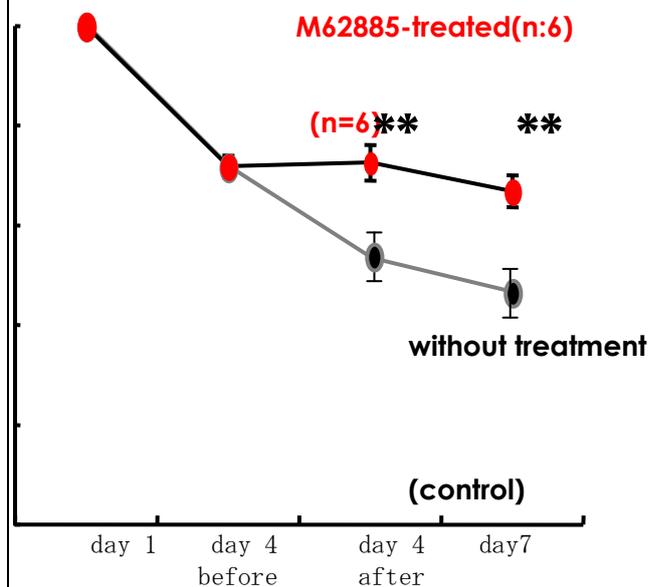
(4) 化学物質を創薬化し、生体内に投与し、

もっとも安全にまた効果的に脳血管攣縮が抑制されるかどうかを検証する。

4. 研究成果

(1) high through-put screening method で検索した結果、M62885 という化学物質が PKCa と PKCd 両者に抑制効果をもつ唯一の化学物質であることが分かった。分子量は 188.6 Da で、IC50 value は PKCd に対しては 0.482mmol/L で、PKCa に対しては 0.345 mmol/L であることが分かった。両者の ic50 value はほぼ近似しており、両者を十分に抑制できる濃度として 1.0 mmol/L をクモ膜下腔に注入してみると、脳血管の PKCa と PKCd 両者の発現が十分に抑制されることがわかった。

(2) 脳血管攣縮抑制効果

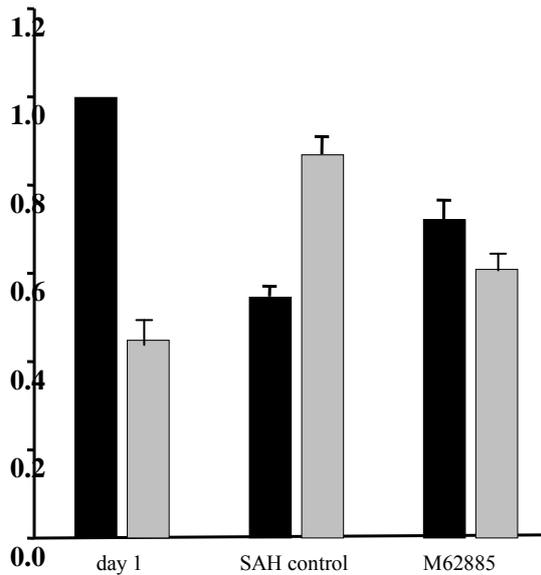


上記グラフで示すように、M62885 で治療を行うと血管撮影上で脳血管径は有意に収縮抑制が得られ、十分な脳血管攣縮効果がえられたことが明らかになった。

(3) Western blotting

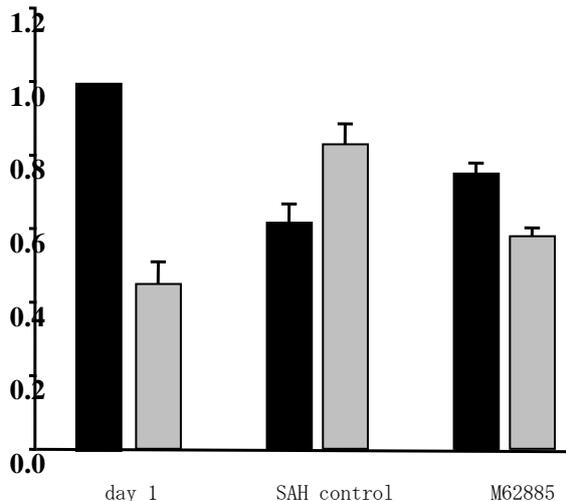
(3)-1

下記のグラフは PKCd に対する発現抑制効果を示しており、black bar は細胞質分画を、dotted bar は細胞膜分画を示している。このグラフで、M62885 で治療を行った群では有意に膜分画への移行が抑制されていることがわかり、PKCd に対する発現が抑制されていることが明らかである。



(3)-2

下記のグラフは PKCa に対する発現抑制効果を示しており、black bar は細胞質分画を、dotted bar は細胞膜分画を示している。PKCd・同様に PKCa においても細胞膜分画への移行抑制が示されている。



この実験結果からは、M62885 で PKCa と PKCd が有意に、かつ効果的に発現が抑制され、その結果のクモ膜下出血のあとの脳血管攣縮も抑制されたことが明らかにされた。

すなわち、M62885 を用いると脳血管攣縮を十分に治療できる可能性が示された。

(4) M62885 の創薬化

これらの実験結果を踏まえ、まず M62885 1.0 $\mu\text{mol/L}$, 2.0 $\mu\text{mol/L}$ をカプセル化してラットの腹腔内に埋め込んだが、カプセルは十分溶解せず、全く原型のままで残存し、M62885 が腹腔内に分散していないことがわかった。

種々の基剤を用いてカプセル化したが、基本的には同じであった。この方法では M62885 を投与することができないことがわかった。

そこで、ついで浸透圧差を利用して生体内に注入できるポンプを同様にラット腹部皮下に埋め込み、ポンプ先端に着いているカテーテルを腹腔内に留置した。様々な濃度の M62885 を注入したが、これでもポンプ内の M62885 は注入時の量そのまま残存し、有効に腹腔内に分散していないことが分かった。現時点では、これらの方法では M62885 を有効に生体内に注入することができなかった。その意味でいまだ M62885 の創薬化には成功していない。

今後さらに工夫を重ね、M62885 の創薬化を試みたいと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Nishizawa S : The role of early brain injury in cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage: From clinical and scientific aspects. *Acta Neurochir (suppl 115)* 207-212,, 2013

査読有

DOI: 10.1007/978-3-7091-1192-5

2. Nishizawa S : Roles of signal transduction mechanisms in cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage: Overview. *Acta Neurochir (suppl 110)* 27-34, 2011

査読有

DOI: 10.1007/978-3-7091-0353-1

[学会発表] (計 3 件)

1. Nishizawa S: The roles of signal transduction systems in pathophysiological mechanisms of cerebral vasospasm - Overview- 11th International Conference of Cerebral Vasospasm (Vasospasm 2011). Cincinnati, Ohio, USA 2011

2. Nishizawa S: Vasospasm Biochemistry 10th International Conference of Cerebral Vasospasm. Istanbul Turkey 2009

3. Nishizawa S: Treatment of vasospasm. - Scientific viewpoints to clinical use- 10th International Conference of

Cerebral Vasospasm. Isutanbul Turkey
2009

[図書] (計 1 件)

1. Koide M, Nishizawa S: Biochemical assessment of cerebral vasospasm: Measurement of cGMP, PKC, and PTR in cerebral arteries.
Part VII Cerebral Vasospasm, in Animal Models of Acute Neurological Injuries II, (Edt: Chen J, Xu XM, Xu ZC, and Zhang J), Humana Press, USA, pp539-552, 2012

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西澤 茂 (NISHIZAWA SHIGERU)
産業医科大学・医学部・教授
研究者番号：40135257

(3) 連携研究者

秋葉 大輔 (AKIBA DAISUKE)
産業医科大学・医学部・助教
研究者番号：20441834

青山 雄一 (AOYAMA YUICHI)
産業医科大学・医学部・助教
研究者番号：50373155
(H20→H21)