

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：21502

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09449

研究課題名（和文）VCP化合物の最適化による新規神経保護薬の開発

研究課題名（英文）Development of a novel neuroprotective drug by optimizing VCP compounds

研究代表者

船木 智（Funaki, Tomo）

山形県立米沢栄養大学・健康栄養学部・助手

研究者番号：10647192

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）：約2400種の化合物をスクリーニングし、VCP化合物の類縁体14剤が培養ヒト脳血管内皮細胞に対する細胞保護作用を持つことを見出した。次に、類縁体を代表する1化合物を脊髄損傷マウスに腹腔内投与した結果、血中濃度が有効薬効濃度に達すること、明らかな副作用を生じないこと、脊髄損傷周囲のIgG漏出面積を抑制することを確認した。続いて、マウス頸髄圧挫損傷を作成後、VCP化合物を腹腔内投与し、8週間後の運動機能、感覚機能を評価した。その結果、治療群は対照群と比較して、機能学的に有意な改善効果を示さず、組織学的にも、治療群は損傷範囲を有意に減少しなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

VCP化合物は北海道大学独自の化合物であり、培養ヒト脳血管内皮細胞に対する濃度依存的細胞保護作用、および、脊髄損傷後の血液脊髄関門保護作用など、脊髄損傷に対する新規神経保護薬としての可能性を示した。長期的には、マウス脊髄損傷に対する治療効果が得られなかったが、本化合物自体の最適化、至適投与方法の検討により、脊髄損傷に対する新規神経保護薬の開発が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Through the screening of 2,400 compounds, 14 analogues of VCP compounds were found to have a protective effect on cultured human brain vascular endothelial cells. Their protective effect was confirmed in a dose dependent manner. The study of intraperitoneal administration of one representing VCP compound to mice with spinal cord injury demonstrated that its blood concentration could reach the effective dose in vitro, that no apparent side effects occurred, and that the leakage of IgG area around the injury site was attenuated, suggesting that this VCP compound has a potential to protect blood spinal cord barrier after spinal cord injury. However, 8 weeks study of functional and histological analysis revealed no therapeutic effect of this compound on injured spinal cord. By optimizing the compound and the administration method, The VCP compound could be neuroprotective against spinal cord injury.

研究分野：神経科学

キーワード：神経保護薬 脊髄損傷 血液脊髄関門

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

交通外傷などにより脊髄を損傷すると、損傷高位以下の麻痺になるが、未だ有効な治療方法はなく、脊髄損傷に対する治療法の確立は急務である。脊髄損傷の治療戦略は、大まかに二次損傷の軽減と組織再生の2つに概略できる。本質的治癒のために、組織再生が必要であるが、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。二次損傷はまず血液脊髄関門 (Blood spinal cord barrier, BSCB) が破綻することで、細胞障害性物質および炎症細胞が中枢組織内への浸潤し、それらが、浮腫、酸化、炎症を引き起こし、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。

今までの研究は、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たが、臨床的な効果を示すまでには至っていない。一方、病態の一つである BSCB の破綻を直接的に防ぐ、脳脊髄血管内皮細胞保護薬に関する研究はほとんどなかった。

そこで、ヒト脳由来血管内皮細胞株 (hCMEC/D3) を利用した、脳血管内皮細胞保護効果を持つ化合物を同定するための、ハイスループットスクリーニング方法を開発し、北海道大学創薬科学研究教育センターが所有するオリジナル化合物ライブラリー2385種をスクリーニングした。その結果、2.4% (59化合物) が候補薬剤となったが、その内、24% (14化合物) が VCP 化合物の類縁体であった。そこで、VCP 化合物は血管内皮細胞保護効果を介した、脊髄損傷に対する新規神経保護薬となりうると仮説を立てた。

### 2. 研究の目的

上記仮説を検討するため、本研究の目的は VCP 化合物の脊髄損傷後の BSCB 保護効果、神経組織保護効果、および機能改善効果を明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

#### (1) VCP 化合物類縁体の濃度依存的脳血管内皮細胞保護効果を明らかにする

培養ヒト脳由来血管内皮細胞株 (hCMEC/D3) に、濃度を変えた 6 剤の VCP 化合物 (HUP001, 005, 006, 009, 0014, 0135) と過酸化水素を同時投与し、24 時間後に、細胞活性を PrestoBlue で評価した。

#### (2) HUP009 の血液代謝動態を確定する

正常マウス、および、脊髄損傷マウスに HUP009 を腹腔内投与し、経時的に血液中の HUP009 濃度を測定した。

#### (3) VCP 化合物類縁体のマウス脊髄損傷モデルでの BBSCB 保護効果を明らかにする

マウスに HUP009 を腹腔内投与後、頸髄に部分切断損傷を作成し、翌日に灌流固定を実施した。脊髄損傷周囲の IgG 漏出範囲を定量した。

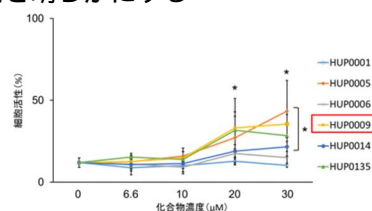
#### (4) 脊髄損傷マウスに対する VCP 化合物の神経保護効果を明らかにする

マウス頸髄に圧挫損傷を作成後、HUP009 を 1 週間腹腔内投与した。その後、トレッドミル型歩行解析 (DigiGait)、Electric von Frey 試験 (UGO BASILE, Gemonio, Italy)、熱刺激試験 (UGO BASILE, Gemonio, Italy) を、損傷後 4 週、8 週目に実施した。その後、灌流固定し、摘出脊髄の水平断切片に免疫蛍光染色 (GFAP、NeuN) を行い、瘢痕面積、グリア瘢痕面積、残存神経細胞数を定量した。

### 4. 研究成果

#### (1) VCP 化合物類縁体の濃度依存的脳血管内皮細胞保護効果を明らかにする

VCP 化合物の類縁体は、濃度依存的に培養ヒト脳血管内皮細胞に対する細胞保護作用を示した (右図)。

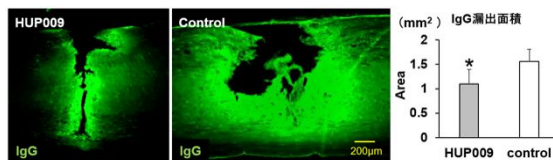


#### (2) HUP009 の血液代謝動態

正常マウス、および、脊髄損傷マウスに HUP009 を腹腔内投与した場合の、血液代謝動態を確定し、投与量の調整により、血中濃度を培養細胞での有効薬効濃度に達することが可能なことを確定した。

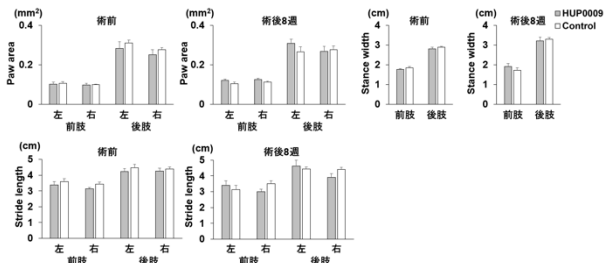
(3) VCP 化合物類縁体のマウス脊髄損傷モデルでの BBSCB 保護効果を明らかにする

HUP009 の腹腔内投与により、脊髄損傷周囲の IgG 漏出範囲が有意に減少した (右図)。また、明らかな副作用を示さなかった。



(4) 脊髄損傷マウスに対する VCP 化合物の神経保護効果を明らかにする

Electric von Frey 試験、熱刺激試験の反応時間は、両群間で有意な差を認めなかった。また、歩行解析の主要な評価項目である、Paw area (最大荷重時の接地面積)、Stance width (歩隔)、Stride length (歩幅)のいずれも、両群間で有意な差を認めなかった (右図)。さらに、癒痕面積、グリア癒痕面積、残存神経細胞数も、両群間で有意な差を認めなかった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木裕貴、角家健、五月女慧人、遠藤健、船木智、周東智、前仲勝実、岩崎倫政
2. 発表標題 VCP化合物による脊髄損傷後血液脊髄関門機能保護作用
3. 学会等名 日本整形外科学会基礎学術総会
4. 発表年 2022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 (Nakagawa Shinsuke) (10404211)	福岡大学・薬学部・准教授  (37111)	
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)	
研究分担者	周東 智 (Shuto Satoshi) (70241346)	北海道大学・薬学研究院・教授  (10101)	

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
---------	---------