

令和 5 年 4 月 12 日現在

機関番号：32684

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16016

研究課題名(和文) アストロサイトの機能分子を標的とした頭部外傷に対する新規治療薬の確立

研究課題名(英文) Development of novel therapeutic drugs for traumatic brain injury focused on functional molecules in astrocytes

研究代表者

道永 昌太郎 (Michinaga, Shotaro)

明治薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：60624054

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：頭部外傷モデルマウスの脳組織では、エンドセリンETB受容体、transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4)、ヒスタミンH2受容体がアストロサイトに高発現していることが見い出された。ETB受容体拮抗薬、TRPV4阻害薬、H2受容体作用薬を投与すると、血液脳関門(BBB)の破綻を促進する血管透過性亢進因子の発現増加が抑制され、BBBの破綻を抑制する血管修復因子の発現が増加しており、頭部外傷によるBBBの破綻と脳浮腫が抑制された。本研究成果は、アストロサイトの機能分子に作用する薬が頭部外傷に対する新規治療薬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

頭部外傷は交通事故、転倒、スポーツなどの際に頭部を強打することで脳が損傷した状態であり、突然死や後遺症を伴う場合もある。日本の患者数は年間30万人以上と推定されているが、現在までに有効な治療薬は確立されていない。本研究成果により、エンドセリンETB受容体拮抗薬、TRPV4阻害薬、ヒスタミンH2受容体作用薬が頭部外傷モデルマウスの病態を抑制できることが示唆されたため、これらの薬は頭部外傷に対する新規治療薬の候補となり得ることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In the injured cerebrum of traumatic brain injury (TBI) model mice, we found that endothelin ETB receptor, transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4), histamine H2 receptor were predominantly expressed in reactive astrocytes. We also showed that repeated administrations of ETB receptor antagonist, TRPV4 antagonist, and H2 receptor agonist alleviated the BBB disruption and brain edema in TBI model mice. Furthermore, these drugs decreased expression level of astrocyte-derived promoting factors for the BBB disruption and increased expression level of astrocyte-derived protective factors in the injured cerebrum after TBI. These results suggest that ETB receptor, TRPV4, and H2 receptor are functional molecules for regulating astrocyte functions and these astrocytic functional molecules are attractive candidates for developing therapeutic drugs to TBI.

研究分野：中枢神経薬理

キーワード：アストロサイト 頭部外傷 血液脳関門 脳浮腫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

頭部外傷は事故やスポーツなどの際に頭部を強打することで脳が損傷した状態であり、日本の患者数は年間 30 万人以上と推定されている。頭部外傷後の脳内ではバリア機能を担う Blood-brain barrier (BBB) が破綻し、血管内容物の漏出による脳浮腫や神経炎症が惹起されることで突然死や後遺症の一因となる。したがって、BBB 破綻の治療は頭部外傷に対する有効な治療戦略であると想定されるが、BBB の破綻を治療することを目的とした薬は未だ開発されていない。BBB の機能には脳内のグリア細胞の一種であるアストロサイトが密接に関わっていることは周知されているが、現存の対症療法薬は脳血管や神経細胞に作用するものが主流であり、アストロサイトに作用させることを目的とした治療薬は開発されていない。したがって、アストロサイトに高発現している機能分子の同定およびそれらを標的とした薬の治療効果の確認が必要であった。

2. 研究の目的

これまでの研究成果により、エンドセリン ET_B 受容体、transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) およびヒスタミン H_2 受容体が頭部外傷モデルマウスの脳組織においてアストロサイトに高発現していることが見い出された。したがって、本研究ではアストロサイトの機能分子として ET_B 受容体、TRPV4 および H_2 受容体に着目して、それぞれの機能分子に作用する薬の頭部外傷モデルマウスの病態に対する治療効果およびそれらの作用機序を明確にすることで新規治療薬の創出を目指す。

3. 研究の方法

(1) 頭部外傷に対する候補治療薬の作用の確認

頭部外傷のモデル動物を作製するためにマウスの脳に流体衝撃傷害を与えた。BBB の破綻はマウスの尾静脈内に投与した Evans blue 色素の脳組織への漏出により評価し、脳浮腫は脳組織の水分含有率を wet-dry 法の計算式 ($(\text{wet weight} - \text{dry weight}) \times 100 / \text{wet weight}$) により算出して評価した。また、BBB の破綻を促進させることが知られている血管透過性亢進因子 (Matrix metalloproteinase-9: MMP-9 および Vascular endothelial growth factor-A: VEGF-A) と BBB の破綻を抑制することが知られている血管修復因子 (Angiopoietin-1: ANG-1 および Sonic hedgehog: SHH) の発現変化を Real-time PCR 法と Enzyme-immunoassay 法により確認した。候補治療薬として ET_B 受容体拮抗薬 (BQ788)、 ET 受容体非選択的拮抗薬 (ボセンタン)、TRPV4 阻害薬 (HC-067047 および RN-1734)、 H_2 受容体作用薬 (Amthamine および Dimaprit) をそれぞれ投与して、これらの候補治療薬の頭部外傷に対する治療効果を確認した。

(2) アストロサイトに対する候補治療薬の作用の確認

候補治療薬のアストロサイトに対する作用を確認するために、マウス的大脑よりアストロサイトの培養細胞を作製した。アストロサイトを培養した 35 mm dish を cell trauma chamber にセットし、流体衝撃傷害を与えた。アストロサイトにおける血管透過性亢進因子および血管修復因子の発現変化は Real-time PCR 法および Enzyme-immunoassay 法により確認した。

4. 研究成果

(1) ET_B 受容体拮抗薬 BQ788 の頭部外傷による BBB の破綻に対する抑制作用 (引用文献 1、3)

頭部外傷モデルマウスの脳組織では Evans blue の漏出が顕著に認められたが、BQ788 の投与により抑制されていた。頭部外傷モデルマウスの脳組織では、血管修復因子 ANG-1 と SHH の発現は主にアストロサイトにおいて観察され、BQ788 を投与すると、これらの発現が有意に増加した。流体衝撃傷害を与えた培養アストロサイトでは、エンドセリンと SHH の発現が増加した。エンドセリンを処置すると ANG-1 と SHH の発現は減少し、これらの発現減少は BQ788 との共処置により阻害された。これらの結果は、BQ788 がアストロサイトにおける血管修復因子の発現を増加させることで、頭部外傷による BBB の破綻を抑制できることを示唆する。

(2) ET 受容体非選択的拮抗薬ボセンタンの頭部外傷による BBB の破綻および脳浮腫に対する抑制作用 (引用文献 2)

頭部外傷モデルマウスの脳組織では Evans blue の漏出および脳水分量の顕著な増加が認められたが、これらはボセンタンの投与により抑制された。頭部外傷モデルマウスの脳組織では血管透過性亢進因子 MMP-9 と VEGF-A の発現が増加していたが、ボセンタンの投与はこれらの発現増加を抑制した。また、ボセンタンの投与により ANG-1 の発現は増加した。エンドセリンを処置した培養アストロサイトでは MMP-9 と VEGF-A の発現が増加し、ANG-1 の発現が減少したが、これらの発現変化はボセンタンとの共処置により阻害された。これらの結果は、ボセンタンがアストロサイトにおける血管透過性亢進因子の発現を減少させ、血管修復因子の発現を増加させることにより、頭部外傷による BBB の破綻と脳浮腫を抑制できることを示唆する。

(3) TRPV4 阻害薬の頭部外傷による BBB の破綻および脳浮腫に対する抑制作用 (引用文献 4)

頭部外傷モデルマウスの脳組織における Evans blue の漏出および脳水分量の増加は、TRPV4 阻害薬 HC-067047 および RN-1734 の投与により抑制された。頭部外傷モデルマウスの脳組織では、エンドセリン、MMP-9 および VEGF-A の発現が増加していたが、HC-067047 および RN-1734 の投与はこれらの発現増加を抑制した。流体衝撃傷害を与えた培養アストロサイトにおいても、エンドセリン、MMP-9 および VEGF-A の発現が増加していたが、HC-067047 および RN-1734 の処置により、これらの発現増加も抑制された。これらの結果は、TRPV4 阻害薬がアストロサイトにおける血管透過性亢進因子の発現増加を抑制することにより、頭部外傷による BBB の破綻および脳浮腫を抑制できることを示唆する。

(4) ヒスタミン H₂ 受容体作用薬の頭部外傷による BBB の破綻に対する抑制作用（引用文献 5）

頭部外傷モデルマウスの脳組織における Evans blue の漏出は、H₂ 受容体作用薬 amthamine および Dimaprit の投与により抑制された。Amthamine および Dimaprit を投与した脳組織では、ANG-1 と SHH の発現が増加していた。また、流体衝撃傷害を与えた培養アストロサイトに amthamine および Dimaprit を処置すると、ANG-1 と SHH の発現が増加した。これらの結果は、H₂ 受容体作用薬がアストロサイトにおける血管修復因子の発現を増加させることにより、頭部外傷による BBB の破綻を抑制できることを示唆する。

< 引用文献 >

1. Shotaro Michinaga, Ayami Tanabe, Ryusei Nakaya, Chihiro Fukutome, Anna Inoue, Aya Iwane, Yukiko Minato, Yu Tujiuchi, Daisuke Miyake, Hiroyuki Mizuguchi, Yutaka Koyama. Angiopietin-1/Tie-2 signal after focal traumatic brain injury is potentiated by BQ788, an ETB receptor antagonist, in the mouse cerebrum: Involvement in recovery of blood-brain barrier function. *Journal of Neurochemistry*. 154(3), 330-348 (2020).
2. Shotaro Michinaga, Anna Inoue, Hayato Yamamoto, Ryotaro Ryu, Ayana Inoue, Hiroyuki Mizuguchi, Yutaka Koyama. 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. *Neuropharmacology*. 175:108182 (2020).
3. Shotaro Michinaga, Ayana Inoue, Kiyomi Sonoda, Hiroyuki Mizuguchi, Yutaka Koyama. 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. *Neurochemistry International*. 146:105042(2021).
4. Shotaro Michinaga, Kazuya Onishi, Kahori Shimizu, Hiroyuki Mizuguchi, Shigeru Hishinuma. Pharmacological Inhibition of Transient Receptor Potential Vanilloid 4 Reduces Vasogenic Edema after Traumatic Brain Injury in Mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 44(11), 1759-1766 (2021).
5. Shotaro Michinaga, Kiyomi Sonoda, Naoki Inazuki, Manae Ezaki, Hiroki Awane, Kahori Shimizu, Shigeru Hishinuma, Hiroyuki Mizuguchi. Selective histamine H₂ receptor agonists alleviate blood-brain barrier disruption by promoting the expression of vascular protective factors following traumatic brain injury in mice. *Journal of Pharmacological Sciences*. 150(3), 135-145 (2022).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Shotaro Michinaga, Kiyomi Sonoda, Naoki Inazuki, Manae Ezaki, Hiroki Awane, Kahori Shimizu, Shigeru Hishinuma, Hiroyuki Mizuguchi	4. 巻 150
2. 論文標題 Selective histamine H2 receptor agonists alleviate blood-brain barrier disruption by promoting the expression of vascular protective factors following traumatic brain injury in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 135-145
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphs.2022.08.003.	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 Shotaro Michinaga, Kazuya Onishi, Kahori Shimizu, Hiroyuki Mizuguchi, Shigeru Hishinuma	4. 巻 44
2. 論文標題 Pharmacological Inhibition of Transient Receptor Potential Vanilloid 4 Reduces Vasogenic Edema after Traumatic Brain Injury in Mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bullentin	6. 最初と最後の頁 1759-1766
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b21-00512.	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 Shotaro Michinaga, Ayana Inoue, Kyomi Sonoda, Hiroyuki Mizuguchi, Yutaka Koyama	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
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
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

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 Angiopoietin-1/Tie-2 signal after focal traumatic brain injury is potentiated by BQ788, an ETB 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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 道永 昌太郎
2. 発表標題 アストロサイトの機能分子を標的とした脳損傷に対する創薬研究
3. 学会等名 日本薬学会第143年会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 道永 昌太郎, 小川 泰弘, 菱沼 滋
2. 発表標題 Sonic hedgehogシグナルは外傷性脳損傷による脳浮腫を抑制する
3. 学会等名 第147回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shotaro Michinaga, Hiroyuki Mizuguchi, Yasuhiro Ogawa, Shigeru Hishinuma, Yutaka Koyama
2. 発表標題 BQ788, a selective ETB receptor antagonist alleviates inflammatory reactions after traumatic brain injury in mice
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 道永 昌太郎, 園田 清美, 稲月 直樹, 江崎 愛永, 粟根 宙生, 清水 かほり, 小川 泰弘, 菱沼 滋, 水口 博之
2. 発表標題 ヒスタミンH2受容体作用薬による血管修復因子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146回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 道永 昌太郎, 大西 一也, 清水 かほり, 水口 博之, 菱沼 滋
2. 発表標題 TRPV4阻害薬による外傷性脳損傷後の血管原性脳浮腫に対する抑制作用
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 道永 昌太郎, 園田 清美, 稲月 直樹, 江崎 愛永, 粟根 宙生, 清水 かほり, 菱沼 滋, 水口 博之
2. 発表標題 ヒスタミンH2受容体作用薬による外傷性脳損傷後のBlood-brain barrier破綻に対する抑制効果
3. 学会等名 第23回日本ヒスタミン学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shotaro Michinaga, Hiroyuki Mizuguchi, Shigeru Hishinuma, Yutaka Koyama
2. 発表標題 BQ788, an endothelin ETB receptor antagonist alleviates blood-brain barrier disruption and brain edema after traumatic brain injury
3. 学会等名 Seventeenth International Conference on Endothelin (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 道永 昌太郎, 水口 博之, 菱沼 滋, 小山 豊
2. 発表標題 アストロサイトの機能分子を標的とした頭部外傷に対する新規治療薬の開発
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 道永 昌太郎, 粟根 宙生, 稲月 直樹, 江崎 愛永, 大西 一也, 清水かほり, 水口 博之, 小山 豊, 菱沼 滋
2. 発表標題 頭部外傷後のBlood-brain barrier破綻に対するSonic hedgehogの抑制効果
3. 学会等名 第144回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2021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

1. 発表者名 Shotaro Michinaga, Kyomi Sonoda, Naoki Inazuki, Tomokazu Watano, Hiroyuki Mizuguchi
2. 発表標題 Anthamine, a selective histamine H2 receptor agonist alleviates cerebrovascular damage after traumatic brain injury in mice
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021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 道永 昌太郎, 園田 清美, 井ノ上 彩奈, 水口 博之
2. 発表標題 ヒスタミンH2受容体作用薬amthamineによる頭部外傷後のBlood-brain barrier破綻に対する抑制効果
3. 学会等名 第137回 日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2020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

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