

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 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：34414

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590108

研究課題名（和文）グリア細胞のエンドセリン受容体を標的とした脳機能改善薬の開発

研究課題名（英文）Basic research for novel neurotrophic drugs targeting glial endothelin receptors

研究代表者

小山 豊 (KOYAMA YUTAKA)

大阪大谷大学薬学部・教授

研究者番号：00215435

研究成果の概要（和文）：高齢者人口の増加に伴い、脳卒中患者が増加している。脳卒中の急性期では、脳浮腫がその死因となる場合が多いが、未だ有効な薬物治療は確立していない。本研究は、動物実験により脳卒中急性期の脳浮腫の発生メカニズムを明らかにし、脳浮腫治療薬の開発に応用することを目的としている。ラット脳内への血管収縮物質であるエンドセリン(ET)の投与は、グリア細胞での脳浮腫を誘発する種々の因子を増加させた。また、この ET の作用は、培養グリア細胞でも観察された。以上の結果は、脳卒中時の ET の阻害が脳浮腫の抑制をもたらす可能性を示す。

研究成果の概要（英文）：On brain insults, such as stroke, subarachnoid hemorrhage and head trauma, brain edema occurs. Although brain edema is a mortal pathology, effective drug treatments for it have not been established. To generate a novel drug against brain edema, mechanisms underlying brain edema formation were examined by using animal models. We found that endothelins, (ETs), a vasoconstricting peptides, are potent inducers of various edema factors in rat brain and in cultured glial cells. These findings suggest that inhibition of ET receptors in glial cells on brain insults have beneficial actions to prevent brain edema formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：薬理学

1. 研究開始当初の背景

高齢者人口の増加に伴い、くも膜下出血や脳血栓などの脳疾患罹患者の増加が予測される。これらの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。脳卒中の急性期には、神経細胞傷害に先立ち脳浮腫が生じる。脳浮腫は脳卒中急性期で、大きな死因となる病態であるが、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脳浮腫治療薬はない。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ことが知られている。しかし、これら脳血管の透過性亢進因子が、脳損傷時にどのようなメカニズムで産生されるのかは明らかではない。このような背景のもと、本研究は、脳浮腫発生メカニズムを解明し、その成果を「脳浮腫を抑制する薬物」の開発に応用することを目指し計画された。

2. 研究の目的

本研究の特徴は「アストログリアの生理活性因子産生能を薬物でコントロールする」という独自の創薬ストラテジーに基づき立案・遂行される点にある。アストログリアはグリア細胞の一種であり、脳傷害時には神経系の病態生理反応惹起のため、多種の生理活性物質を産生・放出する。それらの中には、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)、マトリクスメタロプロテイナーゼ(MMP)やアンジオポエチン(ANG)など脳浮腫の発生に関わる因子が含まれる。即ち「アストログリアの生理活性因子産生能を薬物でコントロールする」とは、脳卒中急性期での脳浮腫惹起因子産生を抑制する薬物を適応し、脳病態の改善を導こうとする考え方である。既に研究代表者らは、血管収縮物質として見出されたエンドセリン(ET)のアストログリアでの役割について研究し、この受容体の作用薬が本細胞の機能のコントロールに有効であることを示している。本研究は、これまでの研究を進展させ、ET受容体作用薬の脳疾患治療薬としての有効性の検証を目的として行われた。

3. 研究の方法

(1)ラット脳室内へのET_Bアゴニスト投与による脳内血管透過性因子の産生変化：ラット脳室内へのET_Bアゴニスト(Ala-ET-1)投与は、ミニ浸透圧ポンプ(Alzet2002, Durect Co.)を用い行った。Wistar系雄性ラットをペントバルビタール麻酔下、頭皮を切開し、bregmaから右2.0mm、後0.5mmの位置に脳室内投与用カニューレを装着した。浸透圧ポンプは皮下に埋め込み、3日または7日間薬物を投与した。薬物投与後にラット大脳を摘出し、常法によりtotal RNAおよび組織抽出物を作成した。血管透過性亢進物質(VEGFs, MMPs, ANGs)のmRNAはRT-PCRで、タンパク発現はELISAおよびイムノブロットで測定した。ET_Bアゴニスト投与による活性化VEGF受容体量の変化は、抗リン酸化VEGF抗体を用い定量した。

(2)ET_Bアゴニスト投与ラットでの免疫組織化学：薬物投与されたラット脳を3%パラホルムアルデヒド液で固定した。凍結後、固定

された脳を15μmの凍結切片とし、血管透過性因子に対する抗体を用いた免疫組織化学的観察に用いた。それらを発現する細胞腫を同定するため、神経細胞、アストログリア、ミクログリア、脳血管内皮細胞のマーカータンパクとの二重染色を行った。

(3)培養アストログリアを用いた脳内血管透過性因子の産生変化：培養アストログリアは、1-2日目のWistar系ラット大脳より調製した。10%ウシ胎児血清を含んだ培地中で培養し、アストログリアの純度が95%以上のものを実験に用いた。培養アストログリアは、ETにより処置された後、total RNAを作成した。細胞外へ遊離した血管透過性亢進物質は、薬物処置後に培養上清を回収し、ELISAにより測定した。

(4)ETによるアクアポリン(AQP)発現の変化：ET_Bアゴニストの脳室内投与によるラット脳でのAQP発現変化は、RT-PCRおよびイムノブロットにより測定した。AQP発現量変化に伴う培養アストロサイト細胞膜の水透過性変化はcalcein-AMを用いたself-quenching法により測定した。

4. 研究成果

(1)ET_Bアゴニストの脳室内投与によるVEGF-A発現の増加：VEGFは脳卒中時に脳

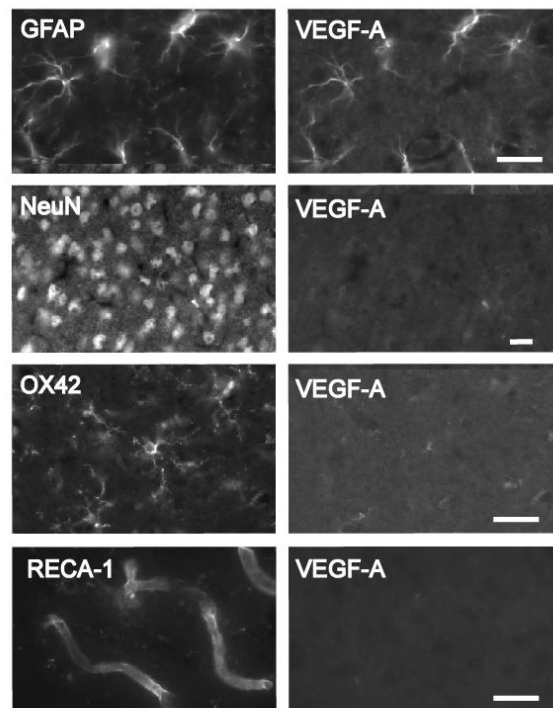


図1. ET_Bアゴニスト投与ラット大脳でのVEGF-A発現 ET_BアゴニストAla-ET-1は、500pmole/dayの用量で7日間ラット脳室内に投与された。脳を固定後、凍結切片を作成し細胞マーカータンパクと共に、VEGF-Aの二重染色を行った。用いたマーカーは、GFPA(アストログリア)、NeuN(神経細胞)、OX42(ミクログリア)、RECA-1(脳血管内皮細胞)

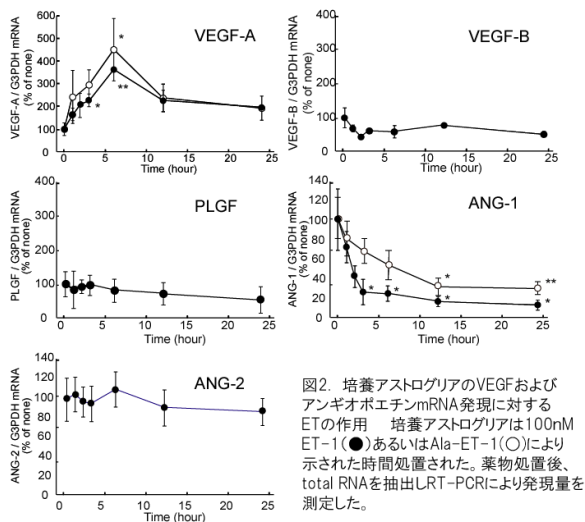


図2. 培養アストログリアのVEGFおよびアンジオポエチンmRNA発現に対するETの作用. 培養アストログリアは100nM ET-1 (●)あるいはAla-ET-1 (○)により示された時間処置された。薬物処置後、total RNAを抽出LRT-PCRにより発現量を測定した。

微小血管内皮細胞に働き、その透過性を高めることで脳浮腫の発生を引き起こす因子である。ET_B アゴニストである Ala-ET-1(500 pmole/day)のラット脳室内投与は、投与後3日および7日において大脳での VEGF-A の mRNA およびタンパク量を増加させた。一方、VEGF-B および PLGF の発現には影響しなかった。免疫組織化学的観察は、ET_B アゴニスト投与ラットの脳では、VEGF-A の発現は GFAP 陽性アストログリアで生じること

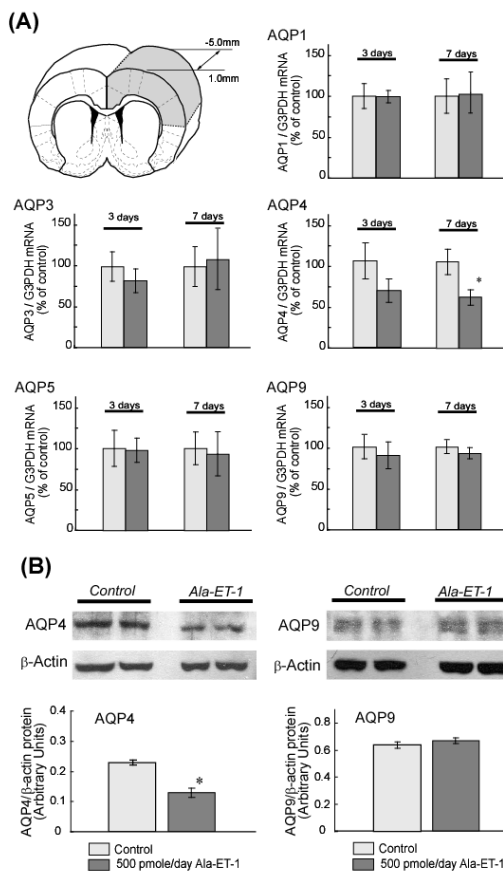


図3. ET_Bアゴニスト投与ラット大脳でのAQP4発現減少. ET_Bアゴニスト Ala-ET-1は、500pmole/dayの用量で3日および7日間ラット脳室内に投与された。AQPのmRNAおよびタンパク量は、RT-PCRとイムノブロットでそれぞれ測定した。

を示した(図1)。ET_B アゴニストの脳室内投与は VEGF-A の発現増加に伴い、ラット脳内の活性化型 VEGF-R1 および VEGF-R2 受容体の量を増加させた。これら活性化型 VEGF 受容体は、脳血管内皮細胞の存在することが示され、ET_B アゴニストにより増加した VEGF-A が脳微小血管に対して血管透過性の亢進をもたらす事が示唆された (Neuroscience, 92, 689-698 (2012))。

(2) ET_B アゴニストによるラット脳および培養アストロサイトでの MMP の発現増加: MMP は脳微小血管を取り巻く基底膜を分解することで脳血管内皮細胞の integrity を低下させ、脳浮腫を増悪するプロテアーゼである。Ala-ET-1(500pmole/day)のラット脳室内投与は、脳での MMP2 および MMP9 の発現量を増加させた。この増加に伴い、脳内の MMP 活性も増加した。免疫組織化学的観察は、これら MMP の発現がアストログリアで生じることを示した。培養アストログリアの ET-1 および Ala-ET-1 での処置は、MMP2 と MMP9 の mRNA 量を増加させた。また、細胞外に遊離する MMP2 と MMP9 タンパクも ET により増加した。以上の結果は、アストログリアの ET_B 受容体刺激が MMP の発現を増加させ、脳卒中急性期の脳浮腫発生に関与することを示唆する (J.Pharmacol.Sci., 114, 433-443 (2010))。

(3) ET による培養アストロサイトでの VEGF の発現増加と ANG-1 の減少: ラット大脳培養アストロサイトの ET-1 処置は、VEGF-A の産生量を増加させた(図2)。一方、VEGF-B および PLGF の発現は ET で変化しなかった。ANG-1 は VEGF による脳血管透過性亢進を抑制する因子で、脳浮腫を抑制する作用を持つ。培養アストロサイトの ANG-1 産生は、ET-1 処置で減少した。これら結果は ET によるアストロサイトの刺激が、VEGF-A の増加と ANG-1 の減少の両者を介して、脳浮腫形成を促進させることを示唆する。

(4) ET によるアクアポリン-4(AQP4)の発現減少: AQP4 はアストログリアに発現し、浮腫を起こした脳からの水の排出経路となるタンパクである。ET_B アゴニストのラット脳室内への持続注入は、大脳皮質の AQP4 mRNA とタンパク量を減少させた(図3)。免疫組織化学的解析により脳内の AQP4 産生細胞はアストロサイトであることを明らかにした (Neuroscience Letters, 469(3), 343-347, (2009))。また、培養アストログリアでの AQP4 発現が、ET-1 および Ala-ET-1 で減少するを明らかにした。また ET-1 での処置は、培養アストログリアの原形質膜を隔てた水の透過を減弱させた (J.Neurosci.Res. 89, 320-328 (2011))。これらの結果は、脳傷害時に ET がアストログリアの AQP4 を減少させ、脳浮腫を増悪させることを示唆する。

(5)脳浮腫の発生におけるアストログリア ET_B 受容体の役割(図 4) : 本研究で得られた結果より、脳浮腫の発生における ET の関与をまとめる次のようになる。①脳卒中や頭部損傷による脳傷害の急性期では、脳内の ET 量の増加が生じる。②増加した ET はアストログリアの ET_B 受容体を活性化する。③アストログリア ET_B 受容体の刺激は VEGF や MMP など脳血管透過性亢進因子の産生促進と、脳浮腫を抑制する ANG-1 の発現減少を同時に引き起こす。これらの変化は、脳浮腫の発生に関わると考えられる。④また、アストログリアの AQP4 発現は、ET_B 受容体の刺激により減少する。AQP4 の減少は、浮腫を起こした脳組織からの水の排出を抑制し、その結果脳浮腫を増悪する。本研究より示唆された脳浮腫の発生機構から、アストログリアの ET_B 受容体の薬理的意義を考察すると、脳卒中や頭部損傷の急性期での ET_B 拮抗薬の投与が、脳浮腫の抑制に有効である可能性が示唆される。

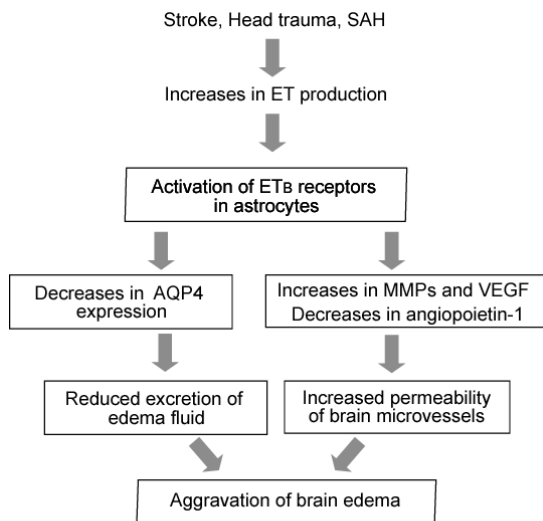


図4. 脳浮腫の発生におけるETの関与。

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 6 件)

- ① Y. Koyama, S. Michinaga, Regulation of astrocytic functions by endothelins: Roles in pathophysiological responses of damaged brain., J Pharmacol Sci., 118, 401-407 (2012)、査読有
- ② Y. Koyama, R. Nagae, S. Tokuyama, K. Tanaka, I.c.v administration of an endothelin ET_B receptor agonist stimulates vascular endothelial growth factor-A production and activates

vascular endothelial growth factor receptors in rat brain, Neuroscience, 192, 689-698, (2012)、査読有

- ③ K. Tanaka, Y. Koyama, Endothelins decrease the expressions of aquaporins and plasma membrane water permeability in cultured rat astrocytes., J Neurosci Res.89, 320-328 (2011)、査読有
- ④ Y. Koyama, T. Tanaka Intracerebroventricular administration of an endothelin ET_B-receptor agonist increases expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in rat brain. J Pharmacol Sci.,114, 433-443 (2010)、査読有
- ⑤ Y. Koyama, T. Tanaka, Decreases in rat brain aquaporin-4 expression following intracerebroventricular administration of an endothelin ET_B receptor agonist, Neuroscience Letters, 469(3), 343-347, (2009)、査読有
- ⑥ R. Hosoi, Y. Matsuyama, S. Hirose, Y. Koyama, T. Matsuda, A. Gee, O. Inoue, Characterization of ¹⁴C-acetate uptake in cultured rat astrocytes. Brain Research, 1253, 69-73, (2009)、査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① 道永昌太郎, 小山 豊 エンドセリンによるアストロサイトの転写因子 Sp1 の活性化: MCP-1 および CINC-1 産生への関与、第 85 回日本薬理学会年会、2012 年 3 月 15 日、京都市
- ② 小山 豊, 永江隆二、徳山尚吾、田中一裕、エンドセリンによるラット大脳での VEGF-A 産生促進と VEGF 受容体の活性化、第 54 回日本神経化学学会大会、2011 年 9 月 26 日、加賀市
- ③ 小山 豊, グリア細胞 - more than just brain glue、第 54 回日本神経化学学会 大会神経科学カレッジ (招待講演)、2011 年 9 月 25 日、加賀市
- ④ 小山 豊, 田中一裕、エンドセリンによるラット大脳および培養アストロサイトでのアクアポリンの発現変化、生体機能と創薬シンポジウム 2010 京都、2010 年 9 月 9 日、京都市
- ⑤ 田中 一裕, 小山 豊, 培養アストロサイトにおけるアクアポリン 4 発現と水透過性に対するエンドセリンの作用、日本神経科学会、2009 年 9 月 19 日、名古屋
- ⑥ 田中 一裕, 小山 豊, 培養アストロサイトおよびラット大脳皮質における VEGF 発現に対するエンドセリンの作用、日本薬理学会、2010 年 3 月 17 日、大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小山 豊 (KOYAMA YUTAKA)
大阪大谷大学・薬学部・教授
研究者番号：00215435