

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 3月31日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591482

研究課題名（和文）非ステロイド性抗炎症薬の神経保護と神経毒性に関する脳代謝画像研究

研究課題名（英文）A cerebral metabolism imaging study on neuroprotection and neurotoxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs

研究代表者 村田 哲人 (Murata, Tetsuhito)

福井大学・医学部・准教授

研究者番号：80200294

研究成果の概要（和文）：

非ステロイド性抗炎症薬（NSAIDs）はその一般的な薬理作用（抗炎症・鎮痛・解熱）に加え、近年ではその細胞傷害性の副作用（Reye 脳症、消化器系潰瘍など）や神経保護効果（神経変性疾患や気分障害などに対して）が注目されてきている。本研究では、ラット新鮮脳切片に dynamic positron autoradiography technique (dPAT) を適用して、グルコース代謝のトレーサーである $[^{18}\text{F}]2\text{-fluoro-2-deoxy-D-glucose}$ ($[^{18}\text{F}]$ FDG) の取り込み実験を行い、様々な NSAIDs の局所脳グルコース代謝率 (CMRglc) に及ぼす影響を定量評価した。古典的な非選択的 NSAIDs (salicylate と indomethacin) では、調べた全ての脳部位で濃度依存的 ($100\ \mu\text{M}\sim 1\ \text{mM}$ の範囲で) に CMRglc が亢進し、選択的 COX-2 阻害薬 (celecoxib と rofecoxib) では全ての脳部位でそれよりもはるかに低い濃度域 ($3\sim 100\ \mu\text{M}$ の範囲で) で CMRglc が亢進した。これらのどちらのタイプの NSAIDs による CMRglc の増加も、いずれも細胞内カルシウムのキレート剤である BAPTA-AM によりほぼ完全に抑制され、COX 選択性に依存しない細胞内カルシウム上昇の関与が示唆された。また、様々な NSAIDs による脳のミトコンドリア機能に及ぼす影響についても検討した。その結果、非選択的 NSAIDs では CMRglc の亢進を認めたのとほぼ同等の濃度で、ミトコンドリア機能が対照群に比べて有意に低下したが、選択的 COX-2 阻害薬ではミトコンドリア機能の有意な低下が認められなかった。以上より、非選択的 NSAIDs 特異的に（選択的 COX-2 阻害薬では観察されない）、細胞内カルシウム上昇を介したミトコンドリアの好氣的糖代謝の障害（代償的な嫌氣的糖代謝の亢進を伴う）が起これ、これらの脳内代謝活動の変化が、NSAIDs の神経毒性および細胞傷害性の副作用（Reye 脳症など）の発症に関与する可能性が示唆された。今後さらに、NSAIDs の神経毒性・保護のメカニズムを掘り下げ、副作用の少ないより優れた新規 NSAIDs 開発の糸口を探ることは、医療や社会への有用性が高く最重要な課題と考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) have recently attracted increasing attention due to their cytotoxic adverse reactions (such as Reye encephalopathy and gastrointestinal ulcer) and neuroprotective efficacy (against neurodegenerative disease, mood disorder, and other conditions), in addition to their general pharmacological actions (anti-inflammatory, analgesic, and antipyretic). In this study, we conducted an experiment involving the incorporation of $[^{18}\text{F}]2\text{-fluoro-2-deoxy-D-glucose}$ ($[^{18}\text{F}]$ FDG), a tracer of glucose metabolism, by applying a dynamic positron autoradiography technique (dPAT) in fresh brain slices obtained from rats, and quantitatively evaluated the effects of different types of NSAID on the local cerebral metabolic rate of glucose (CMRglc). The classic non-selective NSAIDs (salicylate and indomethacin) showed a concentration-dependent ($100\ \mu\text{M}$ to $1\ \text{mM}$) increase of CMRglc in all cerebral regions studied, while the selective COX-2 inhibitors (celecoxib and rofecoxib) demonstrated an increase of CMRglc in a much lower concentration range (3 to $100\ \mu\text{M}$) in all cerebral regions. For both types of NSAID, the increase of CMRglc was almost completely inhibited by BAPTA-AM, a chelate agent for intracellular calcium, suggesting the involvement of a COX selectivity-independent rise in the intracellular calcium level. Furthermore, we investigated the effects of different types

of NSAID on mitochondrial function in the brain. As a result, the non-selective NSAIDs led to a significant decline in mitochondrial function at the concentrations nearly equivalent to those at which an increase in CMRglc was observed compared to the control group, while the selective COX-2 inhibitors led to no significant decline in mitochondrial function. In conclusion, disturbance of mitochondrial aerobic glucose metabolism (together with an increase in compensatory anaerobic glucose metabolism) may occur specifically with non-selective NSAIDs, but not selective COX-2 inhibitors, through a rise in the intracellular calcium level, suggesting the possibility that such variation in metabolic activities in the brain may be involved in the neurotoxicity and cytotoxic adverse reactions (Reye encephalopathy) due to NSAIDs. Further investigation of the mechanisms of neurotoxicity and neuroprotection of NSAIDs, providing clues for the development of new NSAIDs with more benefits and fewer adverse reactions, would be useful for healthcare and society, and is an extremely important issue.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬系

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：脳スライス、NSAIDs、グルコース代謝、ミトコンドリア機能、ポジトロン、神経毒性、神経保護、Reye 脳症

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、これまでに既に連携研究者と共同で、学内のサイクロトロン棟内に dynamic positron autoradiography technique (dPAT)の実験系をセットアップし、神経機能を維持している新鮮脳切片に対するグルコース代謝イメージングを行い、虚血/低酸素、発達や老化、栄養・代謝障害など様々な病態や動物疾患モデルを駆使した研究を展開している。この実験システムでは、棟内のサイクロトロンおよびホットラボ室で合成されたポジトロン標識化合物をトレーサーとして迅速に利用でき、また露光されたラジオリミノグラフィープレートは、サイクロトロン棟内に既存の画像解析装置 (FLA-7000, 富士フィルム社製)を用いて直ちに読み取りが可能であり、設備面での環境は整っている。

新鮮ラット脳切片を用いたグルコース代謝の測定には、¹⁴C 標識化合物を用いた Newmanら(1988)の報告がある。しかしこの方法では脳切片内の領域毎のグルコース代謝を経時的に測定することはできない。それに対して、申請者らが開発した本実験系の特色は、ポジトロン標識化合物の有する高いエ

ネルギーと高感度ラジオリミノグラフィープレートの組み合わせで、脳切片内の領域毎のグルコース代謝を、生理的溶液中に浸したままで経時的に2次元画像情報として描出できる点であり、in vitro 研究と in vivo 研究を橋渡しする有用なモデルになりうると考えられる。

2. 研究の目的

(1) NSAIDsは消炎鎮痛薬として臨床の場で最も汎用される薬剤の一つである。その主たる薬理作用である抗炎症・鎮痛・解熱作用は、アラキドン酸からプロスタグランジン (PG) 類を合成する、いわゆるアラキドン酸カスケードの律速酵素であるシクロオキシゲナーゼ (COX) の阻害作用に基づくと考えられている。COXには、COX-1とCOX-2の2種類のアイソザイムが存在する。COX-1は血小板や胃粘膜などの多くの組織に恒常的に発現しており、血小板凝集や胃粘膜保護などの細胞保護的役割を果たしている。一方、COX-2はサイトカインや成長因子などの刺激によって発現が誘導され、炎症性PGの産生を介して炎症や癌増殖を促進する。ところで、NSAIDsは解熱・鎮痛以外にも、様々な

神経精神疾患やその病態モデルに対する神経保護効果を有することで、近年新たな脚光を浴びている。

例えば脳梗塞など虚血性脳血管障害の治療の一つに非選択的 NSAIDs (非選択的に COX-1 と COX-2 の双方を阻害する) による抗血小板療法があり、一般的に COX-1 の阻害によって血小板凝集が抑制されるためと考えられている。しかし脳梗塞の発症に慢性炎症が深く関わるという近年の報告 (医学のあゆみ 223:365-371, 2007) から、優れた抗炎症作用を有する COX-2 選択的 NSAIDs がより効果的に脳梗塞発症を予防する可能性も考えられる。しかし、COX-2 選択的 NSAIDs は血小板の COX-1 を阻害しないため、血小板凝集は抑制されないと考えられ、古典的な非選択的 NSAIDs と比較した治療効果の優劣は不明である。

近年では、NSAIDs の長期服用でアルツハイマー病 (AD) の発病率が低下すると報告され (N Engl J Med 345:1515-1521, 2001)、その機序として AD 脳で生じている慢性炎症が NSAIDs によって抑制されることが想定されている。また、虚血性脳血管障害や AD のみならず、NSAIDs がパーキンソン病やうつ病など様々な神経精神疾患および病態モデルに対して神経保護効果を有することが報告され、その効果は必ずしも NSAIDs の COX 阻害作用に基づくものでないことが明らかになってきている。しかし、COX 阻害に依存しない NSAIDs の神経保護作用については不明な点が多い。

古典的な NSAIDs は、消化器系副作用 (胃粘膜潰瘍など) が臨床使用の大きな妨げになってきた。これは NSAIDs が非選択的に COX-1 と COX-2 の双方を阻害するため、COX-1 を介した細胞保護的 PG 産生が抑制されるためと考えられている。したがって COX-2 のみを抑制し、COX-1 由来の細胞保護的 PG 産生には影響を与えない選択的 COX-2 阻害薬の開発が精力的に進められてきた。ところで、NSAIDs による細胞傷害誘導のメカニズムとして、COX 阻害作用には依存しない機序の存在が示唆されている。例えば NSAIDs の副作用である消化器系潰瘍 (胃粘膜など) と Reye 症候群 (代謝性脳症と肝機能障害) に共通した所見として、ミトコンドリア障害 (酸化リン酸化の脱共役など) およびミトコンドリア由来活性酸素など、COX 阻害には依存しないメカニズムが注目されている (Arthritis Rheum 48:1438-1444, 2003; Toxicol Appl Pharmacol 147:431-441, 1997)。さらに、NSAIDs が細胞膜のリン脂質に直接作用するとの報告もあり (J Pharm Sci 97:3195-3206, 2008; J Pharm Pharmacol 58:1421-1428, 2006)、NSAIDs が細胞膜を傷害することで細胞死が誘導さ

れ、胃粘膜病変が惹起されることが示唆されている。しかし、これらの COX 阻害作用に依存しない NSAIDs の有害作用については不明な点が多い。

(2) 研究代表者は、平成 8 年度より、ポジトロン標識化合物である [^{18}F]2-fluoro-2-deoxy-D-glucose ([^{18}F]FDG) をグルコース代謝のトレーサーとして、神経機能を維持しているラット脳切片におけるグルコース代謝を動的な 2 次元画像情報として描出できる新しい機能解析法である dPAT に着手し ([^{18}F]FDG 集積画像の例を図 2 に示す)、虚血・低酸素脳障害の病態メカニズムや細胞膜機能の変化について精力的に研究を進めてきた。PET やオートラジオグラフィ法を用いた *in vivo* での計測とは異なり、脳切片は循環動態や末梢組織代謝などを有さないため、dPAT の実験系では、NSAIDs による脳組織のグルコース代謝への直接作用を、灌流液の組成を任意に制御しながら評価することが可能である。

本研究では、NSAIDs による中枢神経系の副作用 (Reye 脳症など) のメカニズムを探るため、NSAIDs による脳内代謝活動 (グルコース代謝やミトコンドリア機能)、および膜の流動性・透過性への影響を評価する。次に、NSAIDs による神経保護効果のメカニズムを探るため、虚血・低酸素負荷の際の脳内代謝活動 (グルコース代謝やミトコンドリア機能) の変化を指標として、NSAIDs の神経保護作用について評価する。さらに、COX 選択性の異なる NSAIDs が、これらの脳内代謝活動や細胞膜へ及ぼす影響の違いを評価することで、NSAIDs の薬理学的作用機序や神経保護・毒性のメカニズムについて検討する。

(3) 新鮮ラット脳切片を用いたグルコース代謝の測定には、 ^{14}C 標識化合物を用いた Newman ら (1988) の報告がある。しかしこの方法では脳切片内の領域毎のグルコース代謝を経時的に測定することはできない。それに対して、申請者らが開発した本実験系の特色は、ポジトロン標識化合物の有する高いエネルギーと高感度ラジオルミノグラフィープレーートの組み合わせで、脳切片内の領域毎のグルコース代謝を、生理的溶液中に浸したままで経時的に 2 次元画像情報として描出できる点であり、*in vitro* 研究と *in vivo* 研究を橋渡しする有用なモデルになりうると考えられる。また、本研究の独創的な点は、この dPAT と様々な生化学的手法 (ミトコンドリア機能、膜の流動性・透過性) とを融合させることによって、脳内代謝機能と分子レベルでの生体现象との関連についての統合された情報を新鮮脳切片から得るシステムを

構築できる点にある。NSAIDs の作用機序や神経保護・毒性のメカニズムを掘り下げ、副作用の少ないより優れた新規 NSAIDs 開発の糸口を探ることは、様々な神経精神疾患(虚血性脳血管障害、AD など)に対するより良い治療を通じて、医療や社会への貢献度は高く、その意義は極めて大きいと考えられる。

3. 研究の方法

NSAIDsによる神経毒性および神経保護効果の検討：dPAT を用いて、ラット脳切片に対しグルコース代謝のトレーサーである [¹⁸F]FDG の取り込み実験を行い、NSAIDs (非選択的 NSAIDs としてサリチル酸とインドメタシン、選択的 COX-2 阻害薬としてセレコキシブとロフェコキシブ) によるグルコース代謝の障害を評価する。次に、NSAIDs によるエネルギー産生機構 (ミトコンドリア機能、ATP 産生能) の変化を検討し、グルコース代謝障害との関連を評価する。

(1) dPAT を用いたラット脳切片の局所脳グルコース代謝の測定：Wistar 系雄性ラット 7 週齢より脳を摘出し、マイクロライサーを用いて 300 μm 厚の矢状断脳切片を作成する。 [¹⁸F]FDG (1-2 Ci/mmol) は、本学サイクロトロン棟で自動合成装置(日本鋼管社製)を用いて合成される。150 kBq/ml に希釈された [¹⁸F]FDG を含む Krebs-Ringer 溶液 (36°C) を灌流用の容器内に入れ、脳切片をインキュベートする。灌流液は 95% O₂/5% CO₂ ガスで持続的にバブリングする。灌流用容器をラジオルミノグラフィープレート (BAS-MP 2040S, 富士フィルム社製) の上に置き、脳切片に集積する放射能をプレートに記録する。一定時間ごとにプレートを交換し、経時的な局所放射能集積画像を得る。露光されたプレートは画像解析装置 (FLA-7000, 富士フィルム社製) によって読み取り、同社製ソフトウェアの Multi Gauge Ver3.0 を用いて解析する。核医学領域で既に確立されている Patlak-plot を、dPAT 法に適用することで、脳切片内への [¹⁸F]FDG 取り込み速度定数 (= k₃*値) を算出し、これを基に局所脳グルコース代謝率を定量する。

(2) NSAIDs による神経毒性の検討：NSAIDs (サリチル酸、インドメタシン、セレコキシブ、ロフェコキシブ) 投与前後の局所脳グルコース代謝率を比較することで、脳組織での NSAIDs によるグルコース代謝の障害を評価する。また、NSAIDs 投与による局所脳グルコース代謝変化の速効性および持続性などの継時的な特徴についても検討する。さらに、NSAIDs による脳局所グルコース代謝変化の濃度依存性や部位特異性、COX 選択性の違いによる特徴について総合

的に評価する。

(3) テトラゾリウム塩 WST-1 を用いた比色分析法によるミトコンドリア機能の検討：テトラゾリウム塩 WST-1 は、ミトコンドリアの呼吸鎖に属する脱水素酵素 (succinate-tetrazolium reductase システム) により還元され、水溶性ホルマザン色素を生じる。この発色を比色定量することにより、NSAIDs による脳切片のミトコンドリア機能の変化を測定する。dPAT と同一の灌流装置を用いて NSAIDs および WST-1 を含む灌流液で脳切片をインキュベートし、組織中の発色を本学内に既存の分光光度計 (UV-1800、島津製作所製) で測定する。

4. 研究成果

古典的な非選択的 NSAIDs (salicylate と indomethacin) では、調べた全ての脳部位で濃度依存的 (100 μM ~ 1 mM の範囲) に CMR_{glc} が亢進し、選択的 COX-2 阻害薬 (celecoxib と rofecoxib) では全ての脳部位でそれよりもはるかに低い濃度域 (3 ~ 100 μM の範囲) で CMR_{glc} が亢進した。これらのどちらのタイプの NSAIDs による CMR_{glc} の増加も、いずれも細胞内カルシウムのキレート剤である BAPTA-AM によりほぼ完全に抑制され、COX 選択性に依存しない細胞内カルシウム上昇の関与が示唆された。

また、様々な NSAIDs による脳のミトコンドリア機能に及ぼす影響についても検討した。その結果、非選択的 NSAIDs では CMR_{glc} の亢進を認めたのとほぼ同等の濃度で、ミトコンドリア機能が対照群に比べて有意に低下したが、選択的 COX-2 阻害薬ではミトコンドリア機能の有意な低下が認められなかった。

以上より、非選択的 NSAIDs 特異的に (選択的 COX-2 阻害薬では観察されない)、細胞内カルシウム上昇を介したミトコンドリアの好氣的糖代謝の障害 (代償的な嫌氣的糖代謝の亢進を伴う) が起こり、これらの脳内代謝活動の変化が、NSAIDs の神経毒性および細胞傷害性の副作用 (Reye 脳症など) の発症に関与する可能性が示唆された。今後さらに、NSAIDs の神経毒性・保護のメカニズムを掘り下げ、副作用の少ないより優れた新規 NSAIDs 開発の糸口を探ることは、医療や社会への有用性が高く極めて重要な課題と考えられる。

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 Omata N, Murata T, Narita K,

Maruoka N, Mitsuya H, Mita K, Nishimoto T, Sato M, Wada Y. Effects of antidepressants and mood stabilizers on serum levels of adiponectin. Neuro Endocrinol Lett 査読有 (印刷中)

② 小俣直人、村田哲人、和田有司 神経保護効果に基づいた気分安定薬の作用メカニズム、臨床神経薬理、査読有、14 巻 9 号、2011、1455-1462

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

特記すべきことなし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 哲人 (MURATA TETSUHITO)

福井大学・医学部・准教授

研究者番号：80200294

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

藤林 康久 (FUJIBAYASHI YASUHISA)

放射線医学総合研究所・分子イメージングセンター・センター長

研究者番号：50165411