

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460106

研究課題名(和文)新規脳保護薬のメカニズムと脳梗塞治療薬としての可能性の検討

研究課題名(英文)Protective effects of GR-103691-related compound on the stroke mouse model

研究代表者

石毛 久美子 (ISHIGE, Kumiko)

日本大学・薬学部・教授

研究者番号：40212873

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ローズベンガル投与と緑色光照射により作製した脳梗塞モデルマウスにおいて、梗塞体積は24時間後では1時間後より拡大したが、72時間後では24時間後と差がなかった。ローターロッド潜時は、1及び24時間後はshamより短かったが48時間後は差がなかった。自発運動量、立ち上がり回数及び、テイルサスペンション試験、抵抗性試験及び行動停止時間をもとにした神経障害スコアは、1時間後に最も障害され徐々に回復したが72時間後でもshamより低下していた。エダラボン及びGR103691誘導体は、梗塞体積を減少させ、行動障害を抑制した。以上、GR103691誘導体は、脳梗塞治療のリード化合物となることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the stroke mouse model induced by rose bengal injection and irradiation (IR) of middle cerebral artery, the ischemic volume of 24 h after IR by TTC staining enlarged from 1 h, however, the difference was not observed 72 h after. Latency to fall in rotor rod test decreased for 1 h and 24 h after ischemia, and recovered to a sham level 48 h after. In contrast, The spontaneous motor activities (locomotor and vertical activities) and neuropathy scores assessed by posture, tail suspension test and platform walk test were dramatically damaged 1 h after IR, and then slowly recovered. There is a significant difference in these index between sham and ischemic group even after 72 h. In addition, significant correlation between the ischemic volume and neuropathy score 72 h after IR was observed. Edaravone and a GR103691-related compound decreased ischemic volume and suppressed behavioral damage. These data suggests that a GR103691-related compound will be lead compound for treatment of stroke.

研究分野：薬理学

キーワード：脳梗塞 GR103691

1. 研究開始当初の背景

(1) 脳血管疾患の現状：脳血管疾患は、以前は、我が国の死亡原因の第1位であったが、急性期の治療法の進歩などにより、死亡率は徐々に低下し、1990年代半ばより、悪性新生物、心臓疾患に次いで第3位となり、2012年、ついに肺炎と入れ替わり第4位となった(①)。脳血管疾患の内訳を見ると、近年は、脳梗塞の割合が増加し、全体の6割以上を占めている。脳血管疾患の死亡数は減少しつつある一方で、患者数は減少しておらず、入院、通院中をあわせた患者数は150万人以上と推定され、今なお増加傾向にあると考えられている。これらの中には、麻痺、言語障害、認知機能障害などの重篤な後遺症に苦しんでいる患者も多く、介護を必要とする者も多い。脳血管疾患は、寝たきりを含め要介護状態に陥る原因疾患の第1位を占め、要介護者全体の3割以上を占めている。また、肺炎による死亡者の中には、脳血管障害が引き金となって誤嚥性肺炎を発症するケースが少なからず含まれており、肺炎による死亡者増加に脳血管障害の患者数増加も密接に関連している。超高齢化社会を迎える我が国において、脳血管疾患の発症率は、今後、さらに増加すること、およびそれに伴って、後遺症に苦しむ患者数も増加することが容易に予想される。以上より、今後の脳血管障害治療においては、救命率のさらなる上昇に加え患者の後遺症をいかに軽減できるかが重要なポイントである。

(2) 脳梗塞治療における脳保護薬：脳血管疾患の内訳を見ると、近年は、脳梗塞の割合が増加し、全体の6割以上を占めるようになっている。脳梗塞のような虚血性疾患の治療において、血流の再開は不可欠であるが、この血流再開により、活性酸素種（ROS）が急激に増加し、これにより障害が助長されること、すなわち、再灌流障害を誘発することが

明らかにされ、このことが後遺症にも関与することが明らかにされつつある。これに対し、我が国では、脳梗塞急性期の治療の1つとしてエダラボン投与による脳神経保護療法が行われており、日本脳卒中学会による治療ガイドライン(②)でも急性期の治療法として推奨されている。エダラボンは、現在、脳神経保護療法に用いられる唯一の薬物で、ラジカルスカベンジャーであり、ROSを消去することも明らかにされており、後遺症の軽減に少なからず寄与しているものと考えられる。しかしながら、エダラボンには重篤な腎障害などの副作用も多く、そのために使用できない患者も存在する。また、使用しても無効であった症例も報告されており、新たな脳保護薬の開発が必要となっている。

(3) GR103691の細胞死抑制作用：GR103691（GR）は、ドパミンD3受容体の拮抗薬として市販されている化合物である。研究代表者は、GRが、受容体への作用とは無関係に脳梗塞の*in vitro*モデルであるマウス海馬神経由来のHT22細胞の低酸素再酸素化誘発細胞死を抑制することを明らかにした。また、その抑制は、エダラボンと同程度であった。その後、GRが脳梗塞の*in vivo*モデルである前脳虚血マウスにおいてもエダラボンと同程度の細胞死保護作用を示すことを明らかにし、GRが新たな細胞死抑制薬またはそのリード化合物となる可能性を考えた。

2. 研究の目的

本研究課題においては、脳梗塞モデルマウスにおいて、新規脳保護薬またはそのリード化合物を見出し、その保護メカニズムを検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) HT22細胞におけるGR誘導体の細胞死保護作用の検討：GRを基に各種化合物（GR

誘導体)を合成し、HT22細胞において、GR誘導体の低酸素再酸素化誘発細胞死に及ぼす影響をLDHアッセイにより調べた。

(2) ローズベンガルを用いた脳梗塞モデルマウス(ローズベンガルモデル)における検討:ローズベンガルモデルは、脳梗塞モデルとしては比較的簡便なモデルである。このモデルは、ローズベンガルという色素が緑色光により硬化することを利用しており、作成にあたっては、ローズベンガルを静脈投与後、血栓を生じさせたい部位に外側から緑色光を一定時間照射して血栓を生じさせる。実験にはddY系雄性マウスを用いた。マウスを密閉容器に入れ、4%イソフルラン/空気で麻酔誘導後、2%で維持した。マウスの左側頭部の皮膚を切開した後、側頭筋を切開し硬膜下に中大脳動脈(MCA)を確認できるまで頭蓋骨を露出させた。ローズベンガルを尾静脈より投与し、直後に照射機をセットして照射を開始した。一定時間照射後、皮膚を縫合し、覚醒させた。Sham群のマウスは、光照射を除き、同様に処置した。

動物実験は、すべて、日本大学動物実験委員会の承認後に実施した。

① ローズベンガルモデルの作成条件の検討:ローズベンガルの投与量と照射時間を変えて、重症度を比較した。照射24時間後の脳梗塞体積と行動薬理的指標により、重症度を判定した。

② 脳梗塞体積の測定:マウスを4%イソフルラン/空気で麻酔し、脳を摘出した。あらかじめ -30°C で15分間予冷却した脳マトリックスの中に入れ、 -30°C で8分間冷却後、1mm間隔にスライスした。作製した切片を2%TTC溶液中で 37°C 、15分間インキュベーションし、その後、4%ホルムアルデヒド溶液にて固定した。2,3,5-triphenyltetrazolium

chloride(TTC)で染色されない部分を梗塞巣とし、コンピュータソフトを用いて、各切片の面積を求め、体積を算出した。

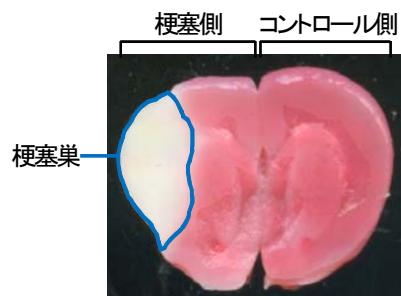


図1. TTC染色切片:ローズベンガルモデルより切片を作製し、方法に記したようにTTC染色をした。染色されなかった部分(青線で囲んだ白い部分)が梗塞巣である。

③ 行動薬理的検討:行動薬理的検討として、自発運動量、立ち上がり回数および行動停止時間の測定、テイルサスペンション試験、抵抗性試験、およびローターロッド試験(15rpm、カットオフ:60sec)を、緑色光照射1、24、48および72時間後に行った。72時間後の行動薬理試験終了後に脳梗塞巣の体積を測定した。

4. 研究成果

(1) HT22細胞におけるGR誘導体の細胞死保護作用の検討:HT22細胞において、GR誘導体の低酸素再酸素化誘発細胞死に及ぼす影響をLDHアッセイにより調べた。まず、10および $100\mu\text{M}$ の影響から、調べた36化合物中18化合物にGRと同等かより強力な保護作用があると判定した。次にこれら18化合物について、さらに詳細に濃度依存性を調べ、GRより強力な保護作用を持つ化合物を絞り込んだ。少なくとも10化合物がGRより強力な効果を示すと判定されたが、一部の化合物は、高濃度になると単独で、細胞死を誘発する可能性が認められたため、それ以外の化合物を新規保護薬の候補物質と考えた。なお、本研究で用いた化合物の詳細につ

いては、特許申請の観点から現段階では、公表を差し控える。

(2) ローズベンガルモデルの作成条件の検討：ローズベンガルモデルは、もともとはラットで作製されたモデルである。最近ではマウスへも応用されるようになってきているが、ラットの作製条件をそのまま適用しているのが現状であった。そこで、実際に使用するマウスで、投与量 (iv) と緑色光照射時間が梗塞巣の体積に及ぼす影響を調べた結果、梗塞巣の大きさの調節は緑色光照射時間ではなく、主にローズベンガルの投与量に依存することが明らかとなった。今回の検討において、ローズベンガルは、20 mg/kg から 80 mg/kg まで、用量依存的に梗塞体積を増大させた。また、20 mg/kg のローズベンガルによっては、照射 24 時間後に明らかに梗塞巣が認められるもののローターロッド試験では、sham 群との間に差が認められなかった。一方、60 mg/kg および 80 mg/kg のローズベンガル投与後は、24 時間後のローターロッド潜時においても、sham 群との間に差が認められた。これらの結果より、以後の実験は、ローズベンガルの投与量を 80 mg/kg とし、緑色光照射時間を 10 分としてモデルを作製した。

(3) ローズベンガルモデルの障害と脳保護薬の効果：緑色光照射後の梗塞体積は、24 時間後では 1 時間後より拡大していたが、72 時間後では 24 時間後と差は認められなかった。したがって、梗塞巣は、照射後 1 時間では、完全に形成されていないが、24 時間後までには形成されることが明らかとなった。次にモデルマウスで行動薬理学試験を行ったところ、自発運動量、および立ち上がり回数は 1 時間後に最も低下し、その後、徐々に回復していったが 72 時間後でも sham 群より低下していた。テイルサスペンション試験、

抵抗性試験および行動停止時間をもとにした神経障害スコアは 1 時間後に最も高く、その後低下したが、72 時間後でも sham 群より有意に高かった。各マウスの 72 時間後の自発運動量、立ち上がり回数または神経障害スコアと梗塞体積の間には相関関係が認められた。ローターロッド試験においても 1 時間後の潜時は sham 群より短く、24 時間後でも短縮が認められたが、48 時間後には sham 群との間に差が認められなくなった。

(4) ローズベンガルモデルに及ぼすエダラボンおよび GR 誘導体の影響：光照射直後に、現在、実際の脳梗塞急性期に臨床適用されているエダラボンおよび GR 誘導体の中から HT22 細胞で比較的細胞死保護作用の強かった 1 化合物 (化合物 A) の塩酸塩を静脈投与して、梗塞巣の体積および行動障害に及ぼす影響を調べた。エダラボンおよび化合物 A はともに、24 時間後の脳梗塞体積を顕著に縮小させ、行動薬理試験のスコアを改善した。以上より、化合物 A は、ローズベンガルモデルにおいて脳保護作用を持つことが明らかとなった。

(5) まとめ：GR 誘導体である化合物 A は、HT22 細胞の低酸素再酸素化細胞死だけではなく、脳梗塞モデルでも細胞保護作用を持つことが明らかとなった。化合物 A 以外の GR 誘導体についても、ローズベンガルモデルに及ぼす影響について、順次、検討し、*in vivo* モデルで、最も高価の高い化合物を見出したいと考えている。一方、ローズベンガルモデルにおいて、細胞死に関わる細胞内情報伝達系、および化合物 A の保護メカニズムについて、現在、検討中である。以上、今後、さらに検討が必要な所も残されてはいるが、GR 誘導体は、脳梗塞による障害を保護する物質として有用であると考えられた。

<引用文献>

- ① 人口動態 厚生労働省
- ② 日本脳卒中学会 脳卒中ガイドライン
委員会編集、脳卒中治療ガイドライン
2015、2015、72-73

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1件)

- ① Ishiuchi K, Kosuge Y, Hamagami H, Ozaki M, Ishige K, Ito Y, Kitanaka S. : Chemical constituents isolated from *Juncus effusus* induce cytotoxicity in HT22 cells. (査読有)、69巻、2015年、421-426

[学会発表] (計3件)

- ① 石毛久美子、坪井海頼、井口智絵、伊藤芳久：光血栓脳梗塞モデルにおける行動障害の評価、第90回日本薬理学会年会、2017年3月16日長崎ブリックホール(長崎県長崎市)
- ② 吉田佳織、藤井雅人、石毛久美子、小菅康弘、伊藤芳久：マウスにおけるMPTP投与が協調運動に及ぼす影響、第59回日本薬学会関東支部大会、2015年9月12日、日本大学薬学部(千葉県船橋市)
- ③ 藤井雅人、石毛久美子、小菅康弘、MPTP投与マウスにおけるEdaravoneの保護効果、第130回日本薬理学会関東部会、2014年7月5日、星薬科大学(東京都品川区)

6. 研究組織

(1)研究代表者

石毛 久美子 (ISHIGE, Kumiko)

日本大学・薬学部・教授

研究者番号：40212873