

平成 21 年 4 月 27 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007 年度 ～ 2008 年度

課題番号：19591012

研究課題名 (和文) 小胞体ストレス、HIF を標的とした新規脳保護薬の開発

研究課題名 (英文) Novel cerebroprotectants targeting ER stress or hypoxia inducible factor

研究代表者 瀧澤 俊也 (TAKIZAWA SHUNYA)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：70197234

研究成果の概要：

AGE形成抑制作用をもつ新規化合物TM2002は小胞体ストレス・AGE形成・フリーラジカル産生を抑制しラット脳梗塞巣の縮小効果を認めた。HIF活性を高める新規化合物TM6008は、glut-3増加作用を介して海馬の遅延型神経細胞死を回避し、apoptosisを抑制した。TM6008は低酸素環境負荷後の培養細胞において、HIFの発現を活性化・持続させ、VEGFなどHIF下流因子群を発現させた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：神経病態薬理学

1. 研究開始当初の背景

脳卒中は単一臓器疾患として本邦で最も死亡率が高く、より良い治療法を確立することが喫緊の課題となっている。臨床的に幾つかの脳梗塞治療薬が使用されているが、残念ながら「日本脳卒中治療ガイドライン2004」で Grade A にランクされているのは tissue plasminogen activator (t-PA) と aspirin の内服治療だけである。さらに、t-PA の therapeutic time window (TTW) は短く発症 3 時間以内に限られ、且つ使用可能な症例も脳梗塞患者全体の 1.6-4.1% に過ぎない。このように、脳梗塞の治療オプションはまだ充分とは言えず、梗塞後の脳組織を保護したり、TTW を広げるような新たな薬剤の開発が待たれている。本研究で我々が開発する脳保護薬は、小胞体ストレス・糖化蛋白修飾 (Advanced glycation end product, AGEs) 形成阻害と虚血誘導因子 (Hypoxia inducible factor, HIF) を標的とするものであり、従来の抗血栓薬 (抗凝固薬、抗血小板薬) や抗酸化ストレス (エダ

ラボン) などの治療コンセプトとは全く異なる機序に基づく。

2. 研究の目的

アンギオテンシン受容体拮抗薬 (ARB) の脳保護作用が大規模臨床試験で証明されているが、興味有ることにこの脳保護作用は降圧作用と独立している。我々は、ARB はレニンアンギオテンシン抑制に基づく降圧作用以外にも数々の pleiotropic effects を有することを証明してきた (J Am Soc Nephrol 16: 3631-3641, 2005)。脳梗塞時の脳傷害では、小胞体ストレス、酸化ストレス、糖化蛋白修飾 (Advanced glycation end product, AGEs) 形成など数々の因子が関わる。ARB 投与により改善するこれら幾つかの因子をレニンアンギオテンシン抑制とは独立に制御する化合物 (出来れば特異的に) を探索することが出来れば、これら化合物の有用性を動物モデルで検討することで、どの因子が傷害に重要なかを理解出来るばかりでなく (病態理解)、治療のコンセプトも提唱でき

る(治療オプションの提案)。酸化ストレスに対する治療薬は既に存在するので、本研究では、降圧或いはレニンアンジオテンシン抑制とは独立して小胞体ストレス、糖化蛋白修飾(Advanced glycation end product、AGEs)形成を抑制する新規化合物TM2002と、HIF活性化薬TM6008を用い、その有用性を検討する。

3. 研究の方法

A) AGE形成抑制薬TM2002

ARBの構造類縁ライブラリー(1332化合物)からAGE形成抑制作用をもつヒット化合物7つを検出し、更に誘導体を合成し構造最適化の結果TM2002を合成した。

まず、*in vitro*でORP150^{+/+}mice動脈平滑筋を用いtunicamycin(Tu)負荷での細胞死を評価した。また、SD rat26匹をTM2002群・edaravone群・vehicle投与群に分け、2時間中大脳動脈一過性閉塞し22時間後に、梗塞巣同定、ORP150、HSP70i、HSP60染色を行った。

B) HIF活性化薬TM6008

a) 脳梗塞モデルにおける内在性神経幹細胞へ及ぼすTM6008の影響

マウス中大脳動脈永久閉塞モデルを用い、TM6008投与による脳梗塞容積への影響、梗塞巣および海馬歯状回・側脳室下帯における内在性神経幹細胞の増殖・分化への影響を検討した。

b) 低酸素負荷培養神経前駆細胞における細胞分化・増殖へのTM6008の影響

1) 培養細胞

実験には、HeLa細胞とヒト神経芽細胞腫由来の神経系培養株SHSY-5Y細胞を用いた。培養細胞は、いずれの細胞においても37度、5%CO₂の環境下で、インキュベーターを使用して培養を行った。HeLa細胞は、Dulbecco's Modified Eagle's Mediumに10% Fetal Bovine Serum、100U/ml Penicilin Streptomycinを加えた培地で培養を行い、100mm dishに80%の割合で発育してから実験を行った。

SHSY-5Y細胞は、ヒト神経芽細胞腫由来の神経系培養株であり、DMEM (High Glucose)に10% FBS、100U/ml PSを加えた培地で培養を行った。SHSY-5Y細胞は、100mm dishに60-70%の割合で発育してからレチノイン酸を10mMとなるように加えた同様の培地で一週間培養し、神経細胞を分化誘導させた。

2) 低酸素負荷

低酸素環境はGAS-PACK法(Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA)を用いて作成した。すなわち本法は、密閉容器内において水とホウ酸ナトリウムとクエン酸を反応させる事により炭酸ガスと水素を発生させ、発生した水素を容器内の酸素と反応させて水を作り出す事によって容器内の酸素を消費させ、低酸素環境を作り出す方法である。

低酸素負荷時間は、細胞が50%死滅する状態を基準として決定し、HeLa細胞においては36時間、レチノイン酸で分化させたSHSY-5Y細胞においては18時間、それぞれ低酸素環境を負荷とした。TM6008の細胞への添加濃度は、低酸素環境負荷後にTM6008を50μMの濃度となるように添加した群と添加しない群を作成し、それぞれを更に3日間培養した。3日後にそれぞれの細胞を集め、免疫組織学的検討、蛋白質解析、遺伝子発現解析を行った。

3) 免疫組織学的検討

HeLa細胞、レチノイン酸で分化させたSHSY-5Y細胞のそれぞれにおいて、低酸素環境負荷直前・低酸素環境負荷直後・低酸素環境負荷後3日間培養継続(TM6008投与群・非投与群)の4群において免疫組織学的検討を行った。4% Paraformaldehyde (PFA)で固定後にPBSにて洗浄し、0.1% Triton-Xで5分間、室温にてインキュベーションした。その後、PBSにて、3回ほど洗浄後にBlocking solutionで2時間ほど室温にてインキュベーションした後に一次抗体(HIF-1α抗体)にて4度で一昼夜反応させた。その後、再びPBSで3回ほど洗浄後、二次抗体(Rabbit-Alexa594)を室温で2時間ほど反応させ、PBSで洗浄した。核染色としてDAPIを使用した。また、アポトーシスの判定にはTUNEL法を用いた。

4) ウェスタンブロット法

上述した4群においてウェスタンブロット法を行なった。それぞれの検体にCell lysate bufferを100μl加え、sonicationして細胞を破壊した。更にBenzonazeを加え30分間静置した。15,000 rpmにて10分間、4℃にて遠心し、上清を得た。その上清につき蛋白質定量を行い、各レーン20ugずつアプライした。4-12%のグラディエント・ゲルを使用し、その後、PVDF膜に転写した。転写後Blocking solutionにて37℃、30分間した後に各々の一次抗体で反応させた。二次抗体で反応後にPBS-Tで洗浄後にECLキットにて反応させて、Coolsaver(ATA, AE-6955)で撮影した。一次抗体として使用したものは、HIF-1α抗体、Vascular endothelial growth factor (VEGF)抗体、erythropoietin (EPO)抗体、Human Heme oxygenase-1 (HO-1)抗体、p53抗体(p53)であり、Controlとしてβ-Actinを使用した。

5) RT-PCR法

上述した4群においてRT-PCR法を行ない、controlとしてGAPDHを使用した。それぞれの検体からTRIzol試薬を使用して、Total RNAを抽出した。次にreverse transcriptaseを用いてcDNAをそれぞれの検体につき合成した。これら検体のcDNAに下記のような条件でPCRを施行した。94℃、30秒でdenatureし、55℃、30秒でannealingして、30サイクル行った。

C) AGE reader による脳梗塞患者測定

対象は、臨床症候と MRI 画像からアテローム性脳血栓症と診断されて 1 か月以上経ている症候性脳梗塞群 (n=95)、臨床的には無症候ではあるが、MRI 画像により脳梗塞病巣を確認した無症候性脳梗塞群 (n=40)、MRI にて明らかな脳梗塞病巣を認めない年齢を補正したコントロール群 (n=34) の 3 群とした。さらに、症候性脳梗塞群のうち、スタチンと ARB 両者の服用群 (n=5)、スタチン単独服用群 (n=9)、ARB 単独服用群 (n=30)、両者非服用群 (n=51) に分けて、AGE reader を用いて AGE 値を比較検討した。

4. 研究成果

A) AGE 形成抑制薬 TM2002

1) Tunicamycin (Tu) 負荷での ORP150^{+/+} mice 動脈平滑筋への影響
Tu 負荷での細胞死は TM2002 で抑制された (図 1)。

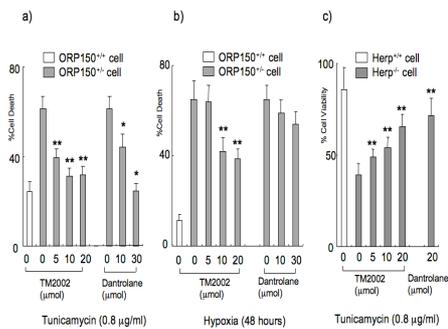


Fig. 1

図1

2) 脳梗塞巣は、Vehicle 群と比較し TM2002 群・Edaravone 群で有意な縮小を認めた (図 2)。

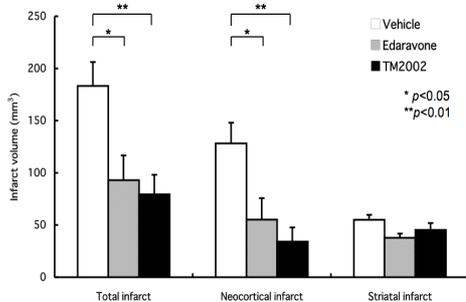


Fig. 2

図2

3) Rotor Rod test での運動機能は、Vehicle 群と比較し TM2002 群・Edaravone 群で改善傾向を認めた。

4) 前頭葉 penumbra において AGE および HO-1 陽性細胞は、Vehicle 群・Edaravone 群・TM2002 群の順序で有意に減少した。

5) TUNEL 陽性細胞・ORP150 陽性細胞は、Vehicle 群と比較し TM2002 群で有意に減少した。

6) OxyBlot は、Vehicle 群と比較し TM2002 群で有意な反応低下を認めた。

以上のごとく、TM2002 は AGE・free radical・ER stress の産生阻害を介して一過性脳虚血モデルの梗塞縮小効果が確認され、新たな脳保護薬として期待される。

B) HIF 活性化薬 TM6008

a) 脳梗塞モデルにおける内在性神経幹細胞へ及ぼす TM6008 の影響

C57BL/6J mouse の右中大脳動脈を永久閉塞し、vehicle 群と TM6008 群の 2 群に分けた。両群とも 7 日と 14 日目に運動機能評価し、sacrifice して採血・HIF-1 及び BrdU 陽性細胞数・梗塞体積の評価を行った。その結果、7 日では両群間で差はなかったものの、14 日では TM-6008 群で脳萎縮率は減少傾向を認め、BrdU 陽性細胞は有意に増加していた。以上より TM-6008 は内在性神経細胞を増加させ、脳保護的に作用する可能性が示唆された。4 日では TM-6008 群で脳萎縮率は減少傾向を認め、BrdU 陽性細胞は有意に増加していた。以上より TM-6008 は内在性神経細胞を増加させ、脳保護的に作用する可能性が示唆された。

b) 低酸素負荷培養神経前駆細胞における細胞分化・増殖への TM6008 の影響

1) HeLa 細胞

低酸素負荷直後には、生存細胞数が約 50% に減少すると HIF 陽性細胞の割合が全体の生存細胞の中で 5.04% から 18.75% へと上昇した (P<0.05)。また、TUNEL 陽性細胞の割合が 4.32% から 16.25% へと上昇した (P<0.05)。低酸素負荷後に 3 日間培養を継続した群においては、HIF 陽性細胞の割合は TM6008 投与群 (32%)、TM6008 非投与群 (13.75%) と、TM6008 投与群において HIF 陽性細胞が多く存在する傾向であった。TUNEL 陽性細胞の割合は、TM6008 投与群で 8%、TM6008 非投与群で 16.25% と、TM6008 投与群において細胞生存率が維持されていた (P<0.01) (図 3)。また、低酸素負荷後、HIF 下流の遺伝子群は、蛋白質発現量では TM6008 投与群において VEGF の発現増加を認め、遺伝子の発現レベルでは同じく TM6008 投与群で VEGF、HIF-1 α 、Glut-1 の増加を認めた (図 4)。

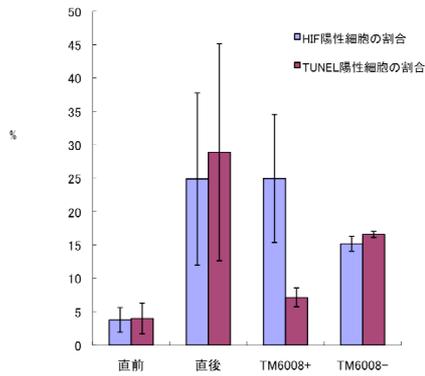


図 3

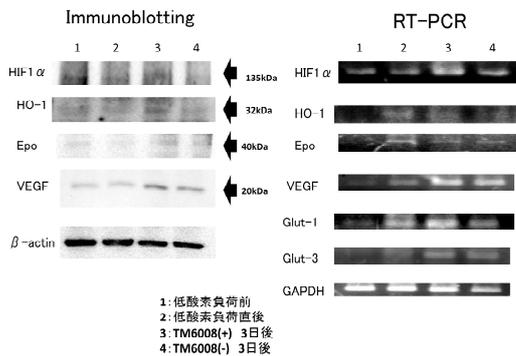


図 4

1) SHSY-5Y 細胞

HeLa 細胞と同様に低酸素負荷直後に生存細胞数が約 50%に減少すると低酸素負荷直前と比較して、低酸素負荷直後には HIF 陽性細胞が全体の生存細胞数に対して 20.23%から 29.95%へと上昇しており、TUNEL 陽性細胞は 21.98%から 56.3%へと上昇し、p53 陽性細胞は 3.325%から 18.13%へと上昇していた。低酸素負荷後に 3 日間培養を継続した群においては、HIF 陽性細胞は TM6008 投与群 (52.25%)、TM6008 非投与群 (32.44%) と、TM6008 投与群において陽性率は上昇傾向を認めており、TUNEL 陽性細胞の割合は、TM6008 投与群 (35.2%)、TM6008 非投与群 (29.6%) と、著変は認めなかった。p53 陽性細胞の割合は、TM6008 投与群 (15.87%)、TM6008 非投与群 (22%) と、TM6008 投与群において低下傾向を認めた (図 5)。また、低酸素負荷後、HIF 下流の遺伝子群において蛋白質発現量では TM6008 投与群において HIF-1 α の発現増加を認め、p53 の発現に減少傾向を認めた (図 6)。

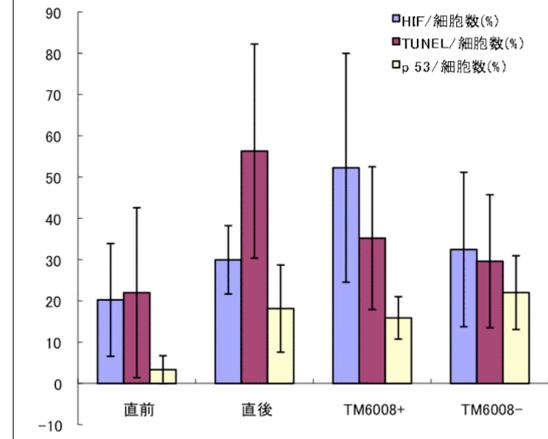


図 5

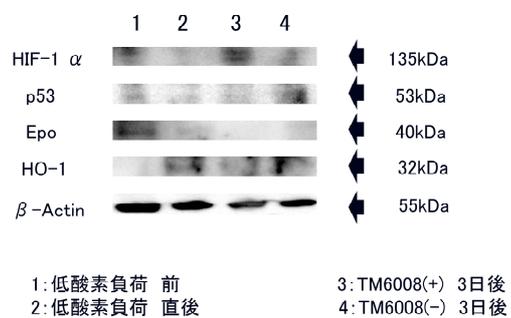


図 6

【考察】

PHD を阻害する新規低分子化合物 TM6008 は、低酸素環境負荷後の培養細胞において、HIF の発現を活性化し、持続させることが蛋白・遺伝子レベルで確認された。また、VEGF を初めとする HIF 下流因子群の発現も、TM6008 投与群において、非投与群と比較して増加している事が蛋白・遺伝子レベルで確認された。TUNEL 陽性細胞の割合も TM6008 投与群において低下する傾向が認められたことから、TM6008 がアポトーシスを抑制し、低酸素負荷による細胞死を抑制していることが確認できた。しかし、今回の実験で VEGF の発現上昇が見られたが、VEGF は主に血管新生を促すとされており、培養細胞系では血管新生が直接的に細胞死などに関与するとは考えられず、VEGF が血管新生以外にも低酸素に対する細胞保護作用を持つか、VEGF が顕著な差を示したものの Glut-1 の増加も認めていることからそれによる糖新生の促進が細胞保護的に働いたこと、もしくはそれ以外の HIF 下流因子の発現が HIF の発現増加に伴い促され細胞保護的に働いたこと、などが推察される。

神経系培養細胞である SHSY-5Y 細胞では、TM6008 投与群において、蛋白質発現レベルで HIF1- α の発現増加傾向を認め、p53 発現は減少傾向を認めた。P53 は細胞 (DNA) が障害を受けた際に出現し、細胞周期を停止さ

せ、細胞死を誘導し、異常細胞の増殖を抑制する事により細胞の癌化を防いでいるとされている。低酸素負荷後 3 日間培養を継続した群では、TM6008 投与群と非投与群で TUNEL 陽性細胞の割合には著変を認めないものの、TM6008 投与群において HIF1- α の発現が増加し p53 の発現が低下している事から、TM6008 は細胞死の誘導を減少させている可能性があり、今後、培養期間を延長することで細胞の腫瘍性増殖などの可能性も懸念される。神経系培養細胞である SHSY-5Y 細胞と比較して、Hela 細胞ではより顕著な反応性が認められたが、Hela 細胞は HIF を強く発現するという報告がある事から、HIF の発現程度による反応性の違いがその要因である可能性がある。

以上より、PDH 阻害薬である TM6008 は、低酸素環境下後の HIF の発現を増加させることにより、その下流因子の発現を促し細胞死を減少させ、細胞保護的に働き、低酸素状態後の培養細胞の生存維持に重要な役割を果たしていると推測され、神経系細胞においても同様の傾向を認めることができた。

C) AGE reader による脳梗塞患者測定
症候性脳梗塞及び無症候性脳梗塞群の AGE 値は、コントロール群に比べて有意に上昇していた (p<0.05)。一方、症候性と無症候性脳梗塞群間には AGE 値の有意差を認めなかった。スタチンおよび ARB 内服による AGE 値への明らかな影響は確認できなかった。

今回検討した非侵襲的皮膚 AGE は、症候性のみならず無症候性脳梗塞において上昇を示しており、将来的に体内の酸化ストレスおよび血管障害のサロゲートマーカーとして位置づけられる可能性が示唆された。この結果より、臨床患者においても AGE を標的とした治療が有効になりうると判断された。

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 4 件)

1. Ohnuki Y, Nagano R, Takizawa S, Takagi S, Miyata S. Advanced glycation end products in patients with cerebral infarction. Intern Med, in press, 2009. 査読あり
2. Izuhara Y, Nangaku M, Takizawa S, Takahashi S, Shao J, Oishi H, Kobayashi H, Charles van Ypersele de Strihou, Miyata T. A novel class of inhibitor of advanced glycation end products ameliorates renal and cardiovascular damage in experimental rat models. Nephrol. Dial. Transpl. 23: 497-509, 2008. 査読あり
3. Nangaku M, Izuhara Y, Takizawa S,

Yamashita T, Ohneda O, Yamamoto M, van Ypersele de Strihou C, Hirayama N, Miyata T. A novel class of prolyl hydroxylase inhibitors induces angiogenesis and exerts organ protection against ischemia. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 27: 2548-2554, 2007. 査読あり

4. Takizawa S, Izuhara Y, Kitao Y, Hori O, Ogawa S, Morita Y, Takagi S, Kurokawa K, van Ypersele de Strihou C, Miyata T. A novel inhibitor of advanced glycation and endoplasmic reticulum stress reduces infarct volume in rat focal cerebral ischemia. Brain Res 1183: 124-137, 2007. 査読あり

[学会発表] (計 7 件)

1. Takizawa S, Izuhara Y, Uesugi T, Nagata E, Takagi S, Miyata T. A novel sartan derivative with very low angiotensin II type 1 receptor affinity reduces infarct volume in rat focal cerebral ischemia. The 4th Korean-Japan Stroke Conference. Fukuoka Nov 21-23, 2008.
2. 紺谷智、永田栄一郎、瀧澤俊也、高木繁治。新規 prolyl hydroxylase 阻害薬が神経細胞系培養細胞において HIF 下流因子に与える影響。第 20 回日本脳循環代謝学会総会 (東京、11 月 6-7 日、2008 年)
3. 紺谷智、永田栄一郎、清水美衣、瀧澤俊也、高木繁治、宮田敏男。新規 prolylhydroxylase 阻害薬が HIF 下流因子に与える影響。第 49 回日本神経学会総会 (横浜、5 月 15-17 日、2008 年)
4. Takizawa S, Morita Y, Nagano R, Izuhara Y, Takagi S, Miyata T. Advanced glycation end products in patients with cerebral infarction. The 2nd Meeting of Asian Stroke Forum, Kyoto, Sept 27-28, 2007.
5. Uesugi T, Takizawa S, Izuhara Y, Morita Y, Takagi S, Miyata T. Inhibiting degradation of hypoxia-inducible factor increases neural stem cells in mouse focal ischemia. XXIIInd International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism, and Function, Osaka, May 20-24, 2007.
6. Takizawa S, Izuhara Y, Morita Y, Uesugi T, Takagi S, Miyata T. A novel inhibitor of advanced glycation and endoplasmic reticulum stress reduces infarct volume in rat transient focal

ischemia. XXIIIInd International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism, and Function, Osaka, May 20-24, 2007.

7. 植杉剛 森田優子 瀧澤俊也 高木繁治 宮田敏男。マウス中大脳動脈永久閉塞モデルでの虚血誘導因子の脳保護効果の検討。第48回日本神経学会総会。(名古屋、5月16-18日、2007年)

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

○取得状況 (計 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀧澤 俊也 (TAKIZAWA SHUNYA)
東海大学・医学部・教授
研究者番号：70197234

(2) 研究分担者

宮田 敏男 (MIYATA TOSHIO)
東北大学・医学部・教授
研究者番号：10222332

(3) 連携研究者