

令和元年6月24日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07981

研究課題名(和文) エンドセリンETB受容体を標的とした新規脳機能改善薬の開発

研究課題名(英文) Research and development of novel neuroprotective drugs targeting endothelin ETB receptor

研究代表者

小山 豊 (Koyama, Yutaka)

神戸薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：00215435

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)：脳病態時におけるエンドセリン(ET)の役割について、以下の知見および実績を得た。1)ETB受容体拮抗薬BQ788が、マウス脳挫傷モデルでの脳浮腫の発生を抑制する事、その機構として、アストロサイト由来脳浮腫惹起因子の産生を抑制されることを明らかにした。2)BQ788の抗脳浮腫作用について検討し、これが脳血管のバリア機能を高めるANG-1発現を増大させることを見出した。3)アストロサイトの神経突起伸長抑制分子であるEphrin発現に対し、ET-1はそれらの発現を低下させた。このことは、脳損傷時のET受容体の刺激が、神経系再生過程での神経突起伸長を促進する可能性を示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳卒中や頭挫傷などの際に生じる脳浮腫の抑制は、患者の予後の向上に重要である。また、それら脳疾患による後遺症も、患者QOL向上のための治療法の開発が急がれている。しかし現在「脳浮腫の抑制」および「後遺障害の軽減」を意図する薬物治療は確立されていない。本研究の結果は、神経細胞を取り巻くアストログリアに多く発現するETB受容体の遮断あるいは刺激で、脳浮腫の成因となる血液脳関門の破綻の抑制や、傷害後の神経突起伸長を促し得ることを示すもので、この知見を基に新たな脳機能改善薬が開発されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Pathophysiological roles of endothelin (ET) on brain edema and neurite extension was studied, and the following findings were obtained. 1) ETB receptor antagonist BQ 788 reduced the development of brain edema in mouse traumatic brain injury model. As for the mechanisms of anti-edema actions, BQ788 decreased the productions of astrocyte-derived brain edema factors including VEGF and MMP9. 2) The anti-brain edema action of BQ788 was examined, and it was found that it increases ANG-1 expression, which enhances the barrier function of cerebrovascular. 3) ET-1 reduced Ephrin-B1 and Ephrin-B3 expression, which are neurite outgrowth inhibitory molecules of astrocytes. This suggests that stimulation of ET receptors during brain injury may promote neurite outgrowth during neural regeneration.

研究分野：薬理学

キーワード：エンドセリン 脳浮腫 アストロサイト ETB受容体

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 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。脳卒中の急性期では、遅発性神経細胞傷害に先立ち生じる「脳浮腫」が死因となる場合が多い。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。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「血管の透過性亢進を抑制する脳浮腫治療薬」はない。一方、脳卒中による後遺症の改善についてもその重要性に関わらず、改善法は理学療法のみで、有効な薬物は確立していない。後遺症の改善薬についてはこれまで「神経系再生を促進させ、失った脳機能を回復させる」という考え方から、内因性の神経栄養因子類を修飾したペプチド性薬物の開発研究が行われた。しかしこれらの薬物は、理論的には有効性が期待されたものの、投与方法の困難さ、あるいは末梢組織での有害作用の発生により、実用化に至ってはいない。そのため現在、新たな治療ストラテジーに基づく後遺症改善薬の開発が待たれている。このような背景のもと、我々は「脳卒中急性期の脳浮腫を抑制する薬物」と「慢性期での神経再生を促す薬物」という2つのタイプの薬物の開発に向けた研究を行ってきた。その中で本申請期間では、それらの原形となる化合物を用い、実験動物レベルでの有効性を確認するまでを達成目標とする。

### 2. 研究の目的

脳卒中や頭挫傷などの際に生じる脳浮腫の抑制は、患者の予後の向上に重要である。また、それら脳疾患による後遺症も、患者 QOL 向上のための治療法の開発が急がれている。しかし現在「脳浮腫の抑制」および「神経系の再生」を意図する薬物治療は確立されていない。本研究の目的は、これら病態・症状を改善する薬物の開発であり、「脳において病態生理反応の惹起因子を産生・放出する“活性化アストロサイト”をコントロールする」と言う新しい治療ストラテジーに立脚することを特徴とする。本研究の代表者らは、これまでにアストログリアに多く発現するエンドセリン B(ET<sub>B</sub>)受容体がこの細胞の活性化に関与することを明らかにしている。そこで、本研究は ET<sub>B</sub> 受容体の刺激あるいは遮断が、「脳浮腫の抑制」および「神経系の再生」に有効であるかを検証した。

### 3. 研究の方法

#### (1) ET<sub>B</sub> 受容体拮抗薬による頭部外傷時の脳血管透過性の抑制：

実験には脳挫傷モデルとして頻用される Fluid percussion 傷害(FPI)を用い、ET<sub>B</sub> 拮抗薬の有効性を検討した。マウス大脳に FPI を加え、血管透過性亢進因子(MMPs、VEGF、ANG-1)および脳浮腫関連分子(NKCC1)の発現変化を Real-time PCR および ELISA により測定した。次いでこれらの因子が、アストロサイトより産生されているのかを、抗体を用いた組織化学により検討した。また同時に、同実験モデルで生じる血液脳関門の破綻が ET<sub>B</sub> 拮抗薬により抑制されるかを検討する。透過性の評価は、既報の方法(PLoS One.,9:e102009(2014))に従い、マーカー分子(内因性アルブミンおよび Evans blue)の脳内漏出量の測定により行った。

#### (2) ET<sub>B</sub> 受容体刺激薬による神経突起伸長抑制分子の発現低下：

ラット大脳由来培養アストロサイトを用い、神経突起伸長抑制分子である Ephrin の発現が ET 刺激により変化するかを定量的 PCR およびイムノプロットで観察した。

### 4. 研究成果

#### (1) ET<sub>B</sub> 受容体拮抗薬による頭部外傷時の脳血管透過性の抑制：

マウス大脳への FPI 後 2 日目より ET<sub>B</sub> 受容体拮抗薬 BQ788 を投与したところ、大脳での水分含量および血管透過性の増加が抑制された。また脳血管透過性の亢進に伴う密着結合タンパク(c Claudin-5、ZO-1、occluding)の減少は BQ788 により抑制された。一方、ET<sub>A</sub> 受容体拮抗薬 FR139317 の投与は、FPI による水分含量の増加に影響しなかった。以上の結果より、FPI により増加した ET-1 が脳浮腫の発生に関与することを示唆した(Michinaga et al., J.Neurotrauma., 2018)。

ET<sub>B</sub> 受容体と脳浮腫の関連と明らかにするため、ET<sub>B</sub> 受容体発現に対する抗脳浮腫作用を有する既存薬の作用を検討した。抗浮腫作用を持つデキサメタゾン(DEX)は、ラット培養アストロサイトでの ET<sub>B</sub> 受容体 mRNA およびタンパクの発現量を低下させた。このことより、DEX の抗脳浮腫作用の一部に、ET<sub>B</sub> 受容体の発現抑制が関わる可能性が示された(Koyama et al., Mol.Pharmacol., 2017)。

BQ788 による脳浮腫抑制作用の分子機構を検討し、BQ788 が、FPI による活性化アストロサイトの発生を抑制することを明らかにした。またその際に活性化アストロサイトの産生する脳浮腫惹起因子(VEGF-A、MMP9)発現が、BQ788 により減少する一方、脳微小血管のバリア機能を高める ANG-1 発現を増加させることを明らかにした。

Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> 共輸送体(NKCC1)は、アストロサイトに多く発現し、脳傷害時の発現増加が脳浮腫発生の一因となる。培養アストロサイトにおいて、ET-1 は NKCC1 の発現を増加させた。この作用は BQ788 で抑制された。この結果は、BQ788 の脳浮腫抑制作用に NKCC1 の発現抑制が関与する

ことを示唆する。

(2) ET<sub>B</sub> 受容体刺激薬による神経突起伸長抑制分子の発現低下：

Ephrin ファミリーは、脳損傷時にアストロサイトの細胞膜上に発現し、神経突起伸長を抑制する。培養アストロサイトの Ephrin 発現に対する ET の作用を検討した。ET-1 は、培養アストロサイトでの Ephrin-B1 および Ephrin-B3 の mRNA 発現を低下させた。このことは、脳損傷時の ET 受容体の刺激が、Ephrin の発現を低下させ神経系再生過程での神経突起伸長を促進する可能性を示唆する。

## 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 9 件 )

- Michinaga S, Kimura A, Hatanaka S, Minami S, Asano A, Ikushima Y, Matsui S, Toriyama Y, Fujii M, Koyama Y. Delayed administration of BQ788, an ET<sub>B</sub> antagonist, after experimental traumatic brain injury promotes recovery of blood-brain barrier function and a reduction of cerebral edema in mice. *J Neurotrauma*. 査読有り 35:1481-1494. (2018) doi: 10.1089/neu.2017.5421.
- Michinaga S, Koyama Y. Protection of the blood-brain barrier as a therapeutic strategy for brain damage. *Biol Pharm Bull*. 査読有り (2017)40:569-575. doi: 10.1248/bpb.b16-00991.
- Koyama Y, Ukita A, Abe K, Iwamae K, Tokuyama S, Tanaka K, Kotake Y. (2017) Dexamethasone downregulates endothelin receptors and reduces endothelin-induced production of matrix metalloproteinases in cultured rat astrocytes. *Mol Pharmacol*. 査読有り 92:57-66. doi: 10.1124/mol.116.107300.
- Nakamoto K, Aizawa F, Miyagi K, Yamashita T, Mankura M, Koyama Y, Kasuya F, Hirasawa A, Kurihara T, Miyata A, Tokuyama S. Dysfunctional GPR40/FFAR1 signaling exacerbates pain behavior in mice. *PLoS One*. 査読有り(2017) 12:e0180610. doi: 10.1371/journal.pone.0180610.
- Nakamoto K, Aizawa F, Kinoshita M, Koyama Y, Tokuyama S. Astrocyte activation in locus coeruleus is involved in neuropathic pain exacerbation mediated by maternal separation and social isolation stress. *Front Pharmacol*. 査読有り 8:401. (2017) doi: 10.3389/fphar.2017.00401.
- Aizawa F, Nishinaka T, Yamashita T, Nakamoto K, Koyama Y, Kasuya F, Tokuyama S. Astrocytes release polyunsaturated fatty acids by lipopolysaccharide stimuli. *Biol Pharm Bull*. 査読有り 39:1100-1106. (2016) doi: 10.1248/bpb.b15-01037.
- Koyama Y. Functional alterations of astrocytes in mental disorders: pharmacological significance as a drug target. *Front Cell Neurosci*. 査読有り 9:261. (2015) doi: 10.3389/fncel.2015.00261
- Michinaga S, Seno N, Fuka M, Yamamoto Y, Minami S, Kimura A, Hatanaka S, Nagase M, Matsuyama E, Yamanaka D, Koyama Y. Improvement of cold injury-induced mouse brain edema by endothelin ET<sub>B</sub> antagonists is accompanied by decreases in matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor-A. *Eur J Neurosci*. 査読有り 42:2356-2370. (2015) doi: 10.1111/ejn.13020
- Michinaga S, Koyama Y. Pathogenesis of brain edema and investigation into anti-edema drugs. *Int J Mol Sci*. 査読有り 16:9949-9975. (2015) doi: 10.3390/ijms16059949

[ 学会発表 ] ( 計 12 件 )

- 道永 昌太郎、鳥山 佳勇、藤井 愛望、小山 豊 「頭部外傷マウスにおける Blood-brain barrier の破綻に対するエンドセリン ET<sub>B</sub> 受容体拮抗薬の効果」 日本薬学会 第 138 回年会 (2018)
- 道永 昌太郎 「脳挫傷後のマウス脳浮腫に対するエンドセリン ET<sub>B</sub> 受容体拮抗薬 BQ788 の効果」 第 67 回日本薬学会近畿支部総会・大会 (2017)
- 道永 昌太郎、小山 豊 「脳挫傷後の脳血管障害に対するエンドセリン ET<sub>B</sub> 受容体拮抗薬の効果」 第 19 回応用薬理シンポジウム (2017)
- Shotaro Michinaga, Yoshiya Toriyama, Manami Fujii, Yutaka Koyama 「Amelioration of BBB disruption and brain edema by BQ788, an endothelin ET<sub>B</sub> receptor antagonist through attenuation of matrix metalloproteinase-9 in cerebral contusion mice」 第 40 回日本神経科学学会 (2017)
- 小山 豊、浮田彰乃、阿部華奈、岩前邦明、田中啓介、小竹優希 「デキサメタゾンによる培養アストロサイトのエンドセリン ET<sub>A</sub> および ET<sub>B</sub> 受容体の Down-regulation」 第 131 回日本薬理学会近畿支部会 (2017)
- 道永 昌太郎、麻野 有沙、生島 佑起、松井 伸悟、木村 章政、畠中駿一、南 志津保、小山 豊 「エンドセリン ET<sub>B</sub> 受容体遮断薬 BQ788 による脳挫傷後の血液脳関門破綻に対する

抑制効果の機序解明-VEGF-A および claudin-5 の関与-」第 90 回日本薬理学会年会 (2017)  
道永 昌太郎, 木村 章政, 畠中 駿一, 南 志津保, 麻野 有沙, 生島佑起, 松井 伸悟,  
小山 豊 「Fluid percussion injury 後のマウス脳浮腫に対するエンドセリン受容体遮断薬  
の効果-ET<sub>A</sub>遮断薬と ET<sub>B</sub>遮断薬の異なる効果-」第 129 回日本薬理学会近畿部会 (2016)  
Shotaro Michinaga, Akimasa Kimura, Shunichi Hatanaka, Shizuho Minami, Arisa Asano,  
Yuki Ikushima, Shingo Matsui, Yutaka Koyama 「Effects of endothelin ET<sub>B</sub> receptor  
antagonist on acceleration of cerebral microvascular permeability and brain edema  
formation after fluid percussion injury in mice」第 39 回日本神経科学大会 (2016)  
道永 昌太郎, 麻野 有沙, 生島 佑起, 松井 伸悟, 木村 光克, 畠中駿一, 南 志津保,  
小山 豊 「流体衝撃による脳傷害後のマウス脳浮腫に対するエンドセリン ET<sub>B</sub>受容体遮断薬  
の効果 -血管透過性亢進因子 VEGF-A の関与-」第 66 回 日本薬学会近畿支部総会・大会  
(2016)  
小山 豊、林 美央、小西智洋 「培養アストロサイトでのエンドセリンによる VEGF-R1 の発  
現変化と受容体シグナル系の増強」日本薬学会第 136 年会 (2016)  
Shotaro Michinaga, Akimasa Kimura, Shunichi Hatanaka, Shizuho Minami, Yutaka Koyama  
「Attenuation of fluid percussion injury induced-brain edema formation by BQ788, an  
endothelin ET<sub>B</sub> receptor antagonist in mice」第 89 回 日本薬理学会年会 (2016)  
Yutaka Koyama 「Regulation of animal behaviors through brain reward system: Mechanisms  
underlying pleasure and aversion」The 25th International symposium of itch (2015)

〔図書〕(計 1 件)

Koyama Y, Pointer CB, Vaz AR, Ito J, Nova Scientific Publishers Inc. 「New  
developments in astrocytes research」 pp1-33 (2015)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：道永 昌太郎

ローマ字氏名：(MICHINAGA, Shotaro)

所属研究機関名：大阪大谷大学

部局名：薬学部

職名：助教

研究者番号 (8 桁)：60624054

(2)研究協力者  
研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。