

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08317

研究課題名(和文) 脳梗塞及び筋萎縮性側索硬化症を標的とした新規脳保護薬の検討

研究課題名(英文) Experimental study in new drugs for stroke and Amyotrophic lateral sclerosis

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：現在、エダラボンが治療薬として承認されている脳梗塞および筋萎縮性側索硬化症(ALS)を中心に研究代表者らが抗酸化作用を報告したGR103691(GR)関連化合物の新規治療薬候補物質としての有用性について検討した。マウス海馬神経由来のHT22細胞においては、エダラボンGRおよびGR関連化合物がいずれもグルタミン酸(Glu)による酸化ストレス誘発細胞死を抑制した。また、その細胞死誘導にLamin B1の分解の関与が示唆された。脳梗塞モデルにおいては、GR関連化合物の梗塞体積縮小作用および行動障害抑制作用が示された。以上よりGR関連化合物は、新規治療薬候補物質として有力であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ラジカスカルベンジャーであるエダラボンは脳梗塞の後遺症軽減および、ほとんど治療のないALSにおける進行抑制に寄与すると考えられるが、無効症例や禁忌症例があり、また副作用のために使用できない場合もある。両疾患においてエダラボンの代わりとなる薬物も存在しない。脳梗塞の後遺症により要介護者となる人は、要介護者全体の約3割を占めると推定されており、後遺症軽減は、社会的にも非常に有意義である。また、ALSは、現在、根本治療法が存在しないため、進行抑制に関与する薬物の選択肢を増やすことは重要な課題である。これらよりGR関連化合物がエダラボンの代替薬となる可能性を示した本研究の意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：The present study aims to establish the new candidate for therapeutic drugs in stroke and amyotrophic lateral sclerosis (ALS). In the HT22 cells, derived from a mouse hippocampal neuron, it was demonstrated that edaravone, GR and GR related compounds suppressed glutamic acid (Glu)-induced cell death by oxidative stress. Western blot revealed that nuclear Lamin B1 but not Histone H3 is decreased before the cell death. Edaravone and GR related compound suppressed the infarct volume as identified by TTC staining at 24 h after irradiation in the stroke model induced by rose bengal injection and irradiation of middle cerebral artery. In addition, both drugs also suppressed behavioral score (locomotor activities, vertical activities and neuropathy scores assessed by posture, tail suspension test and platform walk test). These results suggest that GR related compound is useful as a candidate for new therapeutic drug of the diseases caused by oxidative stress including stroke.

研究分野：神経薬理学

キーワード：GR103691 脳梗塞 酸化ストレス 細胞死

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 脳梗塞：かつて、我が国の死亡原因の第1位であった脳血管疾患(脳梗塞、脳内出血等)は、治療法の進歩等により、急性期の死亡者は減少し、2012年に第4位となった。しかし、患者数は減少しておらず、130万人以上と推定されている上に、患者の8割以上に麻痺、言語障害、認知機能障害等の後遺症が残る。そのため要介護者となる者も多く、寝たきりを含め要介護状態に陥る原因疾患の第1位で、要介護者全体の3割以上を占めている。超高齢化社会の我が国において、脳血管疾患患者のさらなる増加および後遺症に苦しむ要介護者の増加が容易に予想されることから、今後の治療においては、救命率のさらなる向上に加え後遺症をいかに軽減できるかが重要なポイントである。現在、脳血管疾患の中で、最も多いのが脳梗塞で、全体の6割以上を占めている。脳梗塞の治療に不可欠な血流の再開は、活性酸素種(ROS)を急激に増加させ、それにより障害を助長する、すなわち、再灌流障害を誘発すること、およびこれが後遺症にも関与することが明らかにされている。我が国では、脳梗塞急性期にエダラボンによる脳神経保護療法が行われており、日本脳卒中学会の治療ガイドラインでも急性期の治療法として推奨されている。ラジカルスカベンジャーであるエダラボンは、現在、脳神経保護療法に用いられる唯一の薬物で、後遺症の軽減に少なからず寄与していると考えられるが、副作用も多く使用できない患者もいる。また、無効例も報告されており、新たな脳保護薬の開発が望まれている。

(2) 筋萎縮性側索硬化症(ALS)：ALSは、運動神経が選択的に変性・脱落する極めて予後不良な神経変性疾患である。その発症メカニズムには、酸化ストレス説をはじめ諸説あるが、詳細は未だに不明で根本的な治療法は皆無である。我が国の患者数は、毎年僅かずつ増加し、約1万人であると推定されている。研究代表者らは、ALSの病態解明および治療薬開発を目的に、ALSモデルマウスおよび運動神経のモデル細胞として汎用されているNSC-34を用いた検討から、細胞死におけるプロスタグランジンE2の役割等について報告している。リルゾールが唯一の治療薬であったALSにエダラボン(先発品のラジカットのみ)が2015年6月から適用可能となったが、さらなる治療薬の開発が望まれている。エダラボンがALSの障害抑制薬となったことからROS除去能を有するGR誘導体もまたALSの障害抑制薬となる可能性が期待される。

(3) エダラボン：エダラボンは、上記(1)および(2)にも記したように、現在、脳梗塞およびALSの治療薬として承認されている医薬品である。しかし、エダラボンには副作用も多く、禁忌となる患者も存在する。また、脳梗塞へ使用した場合には、無効例も報告されている。一方、現在、エダラボンに代わるラジカルスカベンジャー(医薬品)は存在しない。脳梗塞の後遺症により要介護者となる人は、要介護者全体の約3割を占めると推定されているが、エダラボンは、この後遺症軽減に少なからず寄与していると考えられ、その社会的意義も大きいと思われる。また、ALSは、現在、根本治療法が存在しないため、進行抑制に関与するエダラボンのような薬物の選択肢を増やすことは重要な課題である。このようにエダラボンは、脳梗塞およびALSにとって、補助的治療薬であり、根本的治療薬ではないが、患者にとって、有用な治療薬となっていることも事実であり、副作用等のために使用できない患者には、エダラボンに代わる新たな選択肢を供給することが求められている。

(4) GR103691(GR)誘導体：GRは、ドパミンD3受容体アンタゴニストとして市販されている化合物である。申請者は、GRに細胞死保護作用があることを見出したことを契機として、より強力な保護物質の探索を目的にGRの構造を基に化合物を合成した。それらの物質(GR誘導体)には、新規化合物が含まれ、GRより強力な細胞死保護作用を持つ化合物が含まれていた。

2. 研究の目的

上記の背景のもと、本研究課題においては、GR誘導体がエダラボンに代わる治療薬候補となりうるか否かを検討することを目的として、まず、現在エダラボンの使用が承認されている脳梗塞治療薬(後遺症軽減薬)としての可能性をさらに追究するため、*in vivo*実験系におけるGR誘導体の効果の検証および効力の高い化合物の細胞死保護メカニズムの詳細な検討を実施する。また、*in vitro*実験系における検討から、ALSの治療薬(進行抑制薬)としての可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 動物：ddYマウス(日本エスエルシー)を用いた。すべての動物実験は日本大学実験動物運営内規に従って実施した。

(2) 脳梗塞モデル：脳梗塞モデルとして、ローズベンガルによる光血栓モデルマウス(PITモデル)を用いた。PITモデルは、ddYマウスをイソフルラン麻酔下、ローズベンガルを尾静脈より投与し、中大脳動脈に頭蓋骨上から緑色光(540nm、85,000-90,000lx)を10分間照射して作成した。光照射を除いて同様に処置したマウスをSham群とした。

(3) PITモデルマウスでの検討：PITモデルマウスにおいて行動薬理学的試験を実施した。また、行動薬理試験後、脳を摘出して切片を作成し、2,3,5-triphenyltetrazolium chloride(TTC)染色により梗塞体積を算出した。また、細胞死メカニズムの検討のために摘出脳において定法によりWestern blotを行った。

(4)細胞：マウス海馬神経由来の HT22 細胞を使用した。HT22 細胞は、10%ウシ胎児血清を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 中、37℃、CO2 インキュベータ内で培養した。

(5) HT22 細胞での検討：HT22 細胞に対してグルタミン酸 (Glu) により、酸化ストレスによる細胞死誘導し、GR 誘導体等の保護作用を LDH 法により検討した。また、細胞死に関するメカニズムを検討するために定法により Western blot を行った。

4. 研究成果

(1) PIT モデルにおける成果：研究方法に記載の条件では、照射側の前頭部に梗塞巣が出現した。TTC 染色により、梗塞巣は、緑色光照射 1 時間後には出現することを確認した。また、24 時間後の梗塞巣は、1 時間後より明らかに拡大していたが、72 時間後との間には差が認められなかった。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、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、その後回復したが、72 時間後でも sham 群より有意に高かった。GR 関連化合物の 1 つ (化合物 A の塩酸塩) (10 mg/kg) は、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 (図 1)。この障害改善作用はエダラボン (10 mg/kg) と同程度であった。

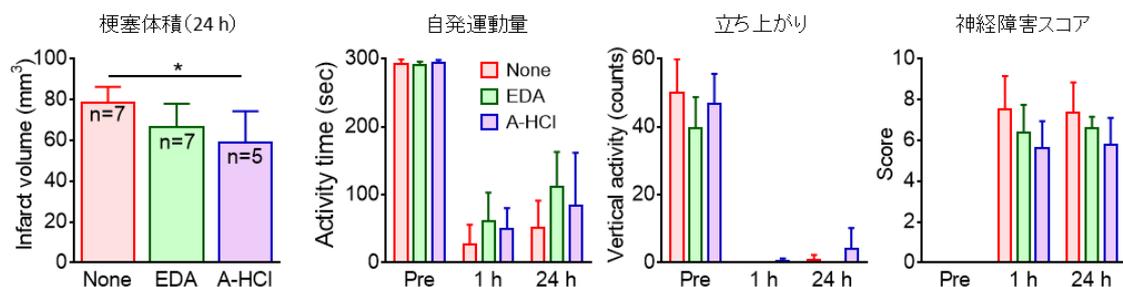


Fig. 1 エダラボン (EDA) および化合物 A の塩酸塩 (A-HCl) が脳梗塞体積および行動障害に及ぼす影響: EDA (10 mg/kg) または、A-HCl (10 mg/kg) を照射直後に尾静脈より投与した。梗塞体積は、24 時間後の行動試験終了後に測定した。* P<0.05

次に、緑色光照射後の所定の時間に麻酔下で脳を摘出し、前後左右に 4 分割し、Western blot 法により、Nrf2 経路関連因子の変動を検討した。本検討には、緑色光照射 1 時間後に神経障害スコアにより、行動障害を確認したマウスを用いた。梗塞巣出現の初期に梗塞領域のほとんどを含む梗塞側前部細胞抽出液において、Nrf2 の上昇傾向が観察されたが、有意な変化ではなく、また、核抽出液における変化も観察されなかったことから本モデルにおいて Nrf2 経路が変動する可能性は低いと考えられた。この検討過程で、脳梗塞モデルマウスにおいて、梗塞側前部のみマウス IgG 抗体で検出される 71~75 kDa のタンパク質の顕著な上昇が認められた。Sham では 4 部位ともこの発現上昇は認められなかった。これらより、このタンパク質が梗塞に深く関連することは明らかである。このタンパク質の最終的な同定には至っていないが、現在までの検討の結果からは、IgG そのものと考えられる。本タンパク質は、治療薬の新規ターゲットとなる可能性があり、興味深い知見であるが、さらなる検討が必要である。

(2) HT22 細胞における成果：まず、Glu による酸化ストレス誘発細胞死に対する及ぼすエダラボン、GR、化合物 A および化合物 A 塩酸塩の影響を調べた。これらの 4 化合物は、いずれも濃度依存的な細胞死抑制作用を示した。化合物 A の細胞死保護作用は、GR と同等か強力であり、化合物 A 塩酸塩との間には差が認められなかった。また、GR は、高濃度になると、それ自体で細胞死を誘発する傾向が認められたが、化合物 A および化合物 A の塩酸塩は調べた濃度範囲ではそのような作用を示さなかった。したがって、治療薬候補物質としては、GR そのものではなく、化合物 A の方が優れていると判断した。また、化合物 A とその塩酸塩では効果に違いが認められなかったが塩酸塩にすると、わずかではあるが水溶性が高まったため、実験には塩酸塩を用いることとした。次に Glu 曝露後 6 時間までの全細胞抽出液、核抽出液および、核を除く細胞抽出液の 3 種の抽出液をサンプルとして Western blot で Nrf2 発現量検討した。酸化ストレス誘発細胞死の保護作用に関与することが報告されている (引用文献 1)。なお、Glu 曝露 6 時間後は、LDH アッセイにより、一部の細胞がすでに死に至っている時間で、その後の 2 時間で死細胞が急激に増加することを確認している。Nrf2 の発現量は、グルタミン酸曝露 6 時間後までの調べた全ての時間において、3 サンプルともに変化は認められなかった。これに対し、核抽出液における Lamin B1 の発現量は、Glu 曝露 1.5 時間後から時間依存的に低下し、3 時間後以降は、有意に低下した。また、細胞質抽出液においては、3 時間以降、Cleaved Lamin B1 の時間依存的な発現量上昇が認められた。一方、Lamin B1 の変動が観察されたのと同じ核抽出液において、Histon H3 発現量には変化が認められなかった。以上より、詳細は不明であるが、Glu 誘発細胞死に Lamin B1 の分解が関与することが示唆された。

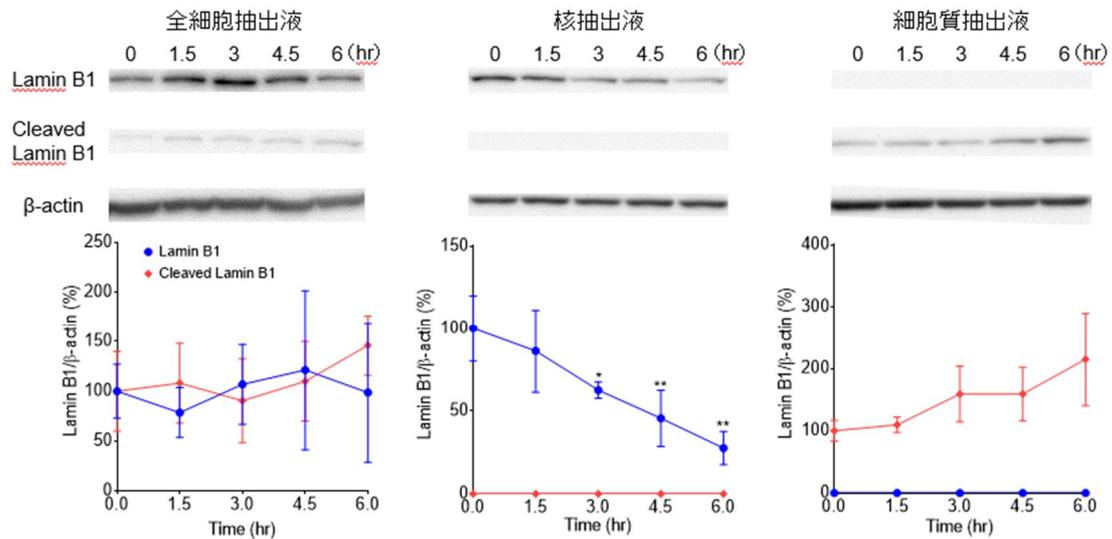


Fig. 2 グルタミン酸(Glu)曝露がLamin B1発現に及ぼす影響: 2.5mM Glu曝露後、6時間までのLamin B1の発現をWestern blotで検討した。写真は代表的な一例を示し、グラフの値は、それぞれの0時間の発現量を100%とし、各時間のバンド強度を3例の平均値 \pm 標準偏差で示した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. 0 hr.

(3)まとめ: 上記のHT22の結果より、脳梗塞およびALSをはじめとする酸化ストレスがその障害誘導に深く関与すると考えられる疾病の抑制に化合物Aが有用である可能性が示唆された。また、脳梗塞モデルマウスを用いた検討からも化合物Aの障害保護作用が認められ、また、その作用がエダラボンと同程度であったことからこの化合物が、エダラボンと同様の効果を持つ医薬品の候補物質として有用であることが示唆された。保護メカニズムに関しては、in vitroおよびin vivoの両モデルにおいてNrf2の関与について否定されると結果となった。一方で、本検討中に障害誘導に関与すると思われる新たな分子が見出されているが、その詳細については今後の検討課題となる。

<引用文献>

Wang C, Liao Y, Wang S, Wang D, Wu N, Xu Q, Jiang W, Qiu M, Liu C, Cytoprotective Effects of Diosmetin Against Hydrogen Peroxide-Induced L02 Cell Oxidative Damage via Activation of the Nrf2-ARE Signaling Pathway, Mol Med Rep, vol 17, 7331-7338

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kosuge Yasuhiro, Saito Hiroaki, Haraguchi Tatsuki, Ichimaru Yoshimi, Ohashi Sachiyo, Miyagishi Hiroko, Kobayashi Shunsuke, Ishige Kumiko, Miyairi Shinichi, Ito Yoshihisa	4. 巻 27
2. 論文標題 Indirubin derivatives protect against endoplasmic reticulum stress-induced cytotoxicity and down-regulate CHOP levels in HT22 cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 5122 ~ 5125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2017.10.069	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kosuge Yasuhiro, Miyagishi Hiroko, Yoneoka Yuki, Yoneda Keiko, Nango Hiroshi, Ishige Kumiko, Ito Yoshihisa	4. 巻 119
2. 論文標題 Pathophysiological role of prostaglandin E2-induced up-regulation of the EP2 receptor in motor neuron-like NSC-34 cells and lumbar motor neurons in ALS model mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 132 ~ 139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuint.2017.06.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木勇太、井口智絵、飯島千陽、片山翔太、小菅康弘、石毛久美子、伊藤芳久
2. 発表標題 GR103691誘導体の脳梗塞モデルマウスにおける障害抑制作用について
3. 学会等名 第19回応用薬理シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 石毛久美子、井口智絵、坪井海頼、片山翔太、齋藤弘明、宮本葵、藤井まき子、小菅康弘、宮入伸一、松本宜明、伊藤芳久
2. 発表標題 脳梗塞モデルマウスにおけるGR103691誘導体の脳保護作用
3. 学会等名 第39回日本生物学的精神医学会 第47回日本神経精神薬理学会 合同年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 石毛 久美子、海野 遥香、飯島 千陽、山頭 博彰、宮岸 寛子、小菅 康弘
2. 発表標題 HT22細胞におけるグルタミン酸誘発細胞死に対するLamin B1の関与、
3. 学会等名 第142回日本薬理学会関東部会、2020
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----