

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08955

研究課題名(和文)ポスターフリーラジカルをターゲットにした新規脳虚血治療の開発

研究課題名(英文) Novel ischemic therapy targetting post-free radical molecules

研究代表者

森岡 基浩 (Morioka, Motohiro)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：20295140

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：脳梗塞急性期の神経保護薬は数多く報告されてきたが一度脳虚血が発生するとフリーラジカルが産生されその後の細胞障害が急速に進行する。4-ヒドロキシノネナル(4-HNE)はその細胞障害作用の中心となる分子である。我々は新しくこの4-HNEを消去する薬剤L-カルノシンノネナル(CNN)を合成し神経細胞保護効果を様々なモデルで検証した。1) CNNは神経系培養細胞に対する4-HNEによる細胞毒性を完全に阻害した。2) スナズミー過性前脳虚血による海馬CA1細胞の脱落を抑制した。3) ラット中大脳動脈閉塞モデルにて脳梗塞領域を有意に縮小させた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳血管の閉塞/狭窄による脳虚血状態は神経細胞障害/神経細胞死をもたらす。今まではこの脳梗塞の障害が始まった後には止めることができる有効な薬剤が存在しなかった。我々は今回の研究で新しくL-カルノシンノネナル(CNN)を合成した。このCNNは実際の脳梗塞の治療において脳梗塞の障害が始まった後に投与しても細胞障害の進行に中心的な役割をしている分子4-HNEを抑制することができる。このことは脳梗塞が発症してもその後の投与で神経細胞障害を予防でき後遺症を極力軽くできると考えられる。

研究成果の概要(英文)：4-hydroxy-trans-2-nonenal (4-HNE), a highly cytotoxic aldehyde, which is produced by peroxide lipid oxidation, induces neuronal cell death in the ischemic disease. We synthesized a novel 4-HNE scavenger; a carnosine-hydrazide derivative, L-carnosine hydrazide (CNN). We examined the anti-ischemic effect of CNN in various models. This compound completely inhibited 4-HNE induced cell toxicity in cultured neuronal cells. In animal models, CNN protected hippocampal CA1 pyramidal neuronal cell death after transient forebrain ischemia in Mongolian gerbil. Furthermore, in the rat middle cerebral artery occlusion model, CNN reduced the infarction area. Our novel chemical compound of CNN can be used as neuroprotective medication even after ischemic disease onset.

研究分野：脳神経外科

キーワード：脳梗塞 神経細胞障害 活性酸素

1. 研究開始当初の背景

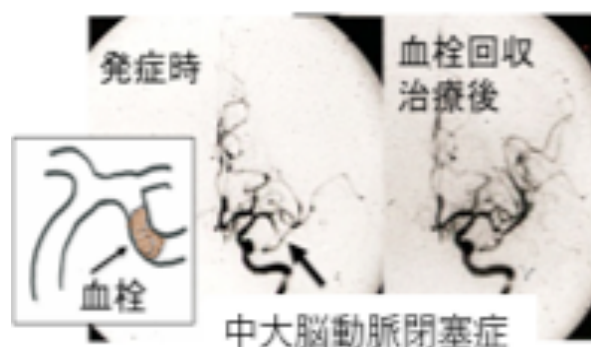
我が国の脳卒中患者は今後も増加の一途をたどることが予想され現在でも要介護4/5の40%を占めている。脳卒中の7-8割は脳梗塞でありさらに高齢化に伴い重篤な脳塞栓症が増加している。こういった現状と我が国の医療費の高騰を考慮すると脳梗塞治療成績を向上させ後遺症を軽減させることは喫緊の課題といえる。

現在の脳梗塞の治療は

A) 早期に閉塞血管を再開通させる(tPA 静脈注射またはカテーテルによる血栓回収)。

B) 虚血壊死組織 (コア) 周辺 (ペナンプラ) の神経細胞を生存させる。

に大別される。A) に関しては画期的治療として導入され成果が得られつつあるがその成果はまだ十分とは言えないのが現状である。その最大の理由として血栓解除により完全に再開通がえられたと思われても脳梗塞が広範にみられる症例がまだまだ存在していることが最大の要因である。この理由の一つとして完全に再



開通されたと思われる状態で血流の再灌流により活性酸素を主体とするフリーラジカル反応が起こり組織の障害、脳出血などが起こる事(再灌流障害)が最後の問題として横たわっているからである。このフリーラジカル反応は病態 B)のペナンプラでも発生し神経細胞障害の原因となっている。我が国ではフリーラジカル捕捉消去剤;Edaravonが認可され効果が認められており本剤は脳梗塞全般に効果がある事から病態 B)のペナンプラ治療にもラジカル反応が関与している事は明白である。

それでは、Edaravon などのフリーラジカル捕食消去剤を投与しても何故脳梗塞治療は完全となりえないのか?それはフリーラジカルの存在が短時間でありその障害反応が急速に進行してしまうためである。つまり病態進行の中で今後発生するであろうフリーラジカル消去には効果があってもすでにフリーラジカルによりスイッチの入った脳神経障害のカスケードを食い止める事が困難であるからと考えられる。

2. 研究の目的

脳虚血治療の研究においては1)フリーラジカルの発生抑制物質・酵素(SOD: superoxide dismutase など)や2)前述の Edaravon などのフリーラジカル捕捉消去剤に注目が集まっているのが現状であり、過酸化反応後の細胞障害性物質に対する治療薬の研究は少なく、臨床的に使用される薬剤も存在しないのが現状である。

確かに過酸化反応後は様々な反応分子に拡散して行くため、単一の薬剤が著効するという結果が得られにくいという予想はあながち誤りではなく研究者の興味も失われがちである。しかし一つ一つの反応系を抑制してゆく研究を行わなければ脳虚血治療の今後の展開は困難となる。

ラジカル反応後細胞毒性物質の主体として知られている物質として4-ヒドロキシノ

ネナール (HNE) がある。HNE は脂質過酸化反応促進の際に過酸化脂質から生成される。以前から ALS (筋萎縮性側索硬化症) などの神経変性疾患の脳脊髄液に高濃度で存在する事が報告されておりこの HNE の無毒化は脳虚血以外にも脳神経疾患の治療に広く適応できる可能性を持っている。本研究のターゲットはそのポストフリーラジカル反応生成物質の中でも最も毒性が高いこの HNE を標的にし捕捉・消去により成果が上げればその他の毒物への治療を上乗せして行く事でラジカルによる障害後の反応への治療の新たな展望が広がるものと考えられた。

我々は熊本大学薬学部と共同開発にてこの HNE を強力に消去する新規ヒスチジン誘導体カルノシンヒドラジド (CNN) (水溶性、血液脳関門通過型)を開発した。

本研究ではフリーラジカル反応後の細胞毒性物質をターゲットにしたユニークな薬剤による新しい脳梗塞治療薬、更に神経保護薬剤として汎用できるものを確立したい。

3. 研究の方法

A) CNN 合成後の基礎研究

4-HNE の捕捉・消去作用の検討

ラット腹腔内投与(100-150mg/kg)による安全性確認および

PC-12 細胞の HNE による細胞障害に対する CNN の保護効果検討

B) 動物実験

本研究の目的は我々の開発した CNN が脳虚血治療薬として十分な効果があることを動物実験により確認する事である。今回の研究は3つの異なる脳虚血の病態について研究を行う。それぞれの実験と実臨床における病態 (括弧内) との対比は以下のようなものである。

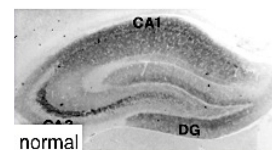
I) 永久的脳梗塞 (臨床的に完成された脳梗塞)

II) 主要血管閉塞後再灌流 (超急性期 tPA・stent による血栓回収による血行再建後)

III) 短時間一過性血行遮断 (虚血に脆弱な神経の保護: 手術時の大血管一時遮断)

(1) スナネズミ両側内頸動脈一過性閉塞モデル(DND モデル)

本モデルは海馬 CA1 に特異的神経細胞障害(DND:Delayed Neuronal Death)が発現しそのメカニズムにはフリーラジカルも関与しアポトーシス類似のものと考えられている。



本研究では a)虚血前 10分 10.0 - 100.0 mg/kg 腹腔内投与

b)虚血後 10分 10.0 - 100.0 mg/kg 腹腔内投与

を行い DND の状況評価する。更に病理学的に Hsp 70 や HNE 等の過酸化反応物質免疫染色、ウエスタンブロットを行い 脳虚血保護効果のメカニズムを解析する

(2)ラット中大脳動脈閉塞モデル

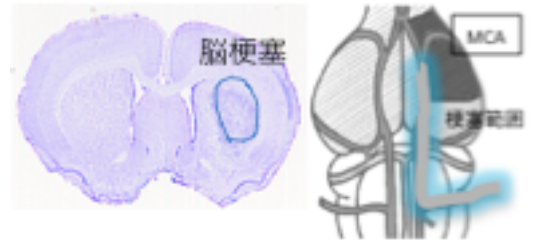
(MCAO ;middle cerebral artery-occlusion)

本モデルは臨床に近い形の脳梗塞モデルでラットの中大脳動脈 (MCA;middle cerebral artery) にナイロン糸を挿入し血流を遮断し以下の2つの病態を作成する

a)永久閉塞 (広範囲脳梗塞モデル)

b)任意の時間(2時間後)に糸を抜去し再灌流させる (再開通モデル)

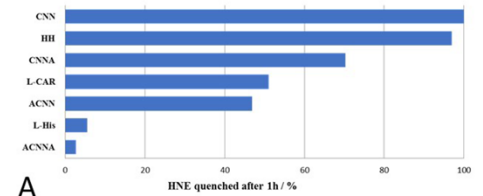
本研究では それぞれのモデル a), b) に対し
 虚血前 10 分、虚血後 30 分腹腔内投与を行い脳梗塞の範
 囲を測定比較する。



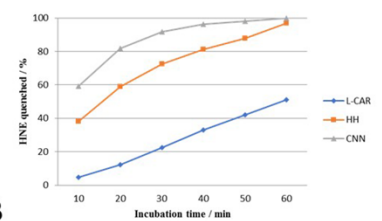
4. 研究成果

(1) CNN の HNE 補足／消去効果

In vitro の実験にていくつかの HNE 補足効果が報告され
 ている化合物と HNE 補足効果を比較した (右図 A) CNN と
 HH が明らかに補足効果において有効性が高い結果が得
 られたが time-course を比較すると CNN の方が初期の段
 階で高い消去／補足効果が見られた。



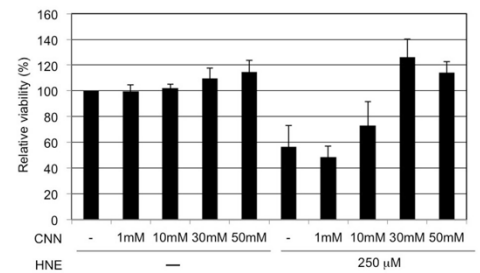
A



B

(2) 細胞障害抑制実験

神経系細胞として PC-12 細胞 / MTT-assay を用いた。ま
 ず CNN 単独の細胞に対する影響を確認したところ細胞障
 害性は認められずむしろ濃度の増加に伴い、細胞増殖効
 果が見られた。その後 CNN 前処理後に HNE 250 μM 刺激
 を行うと CNN 30mM 以上では細胞障害性を完全に消去し
 ていることが明らかになった。



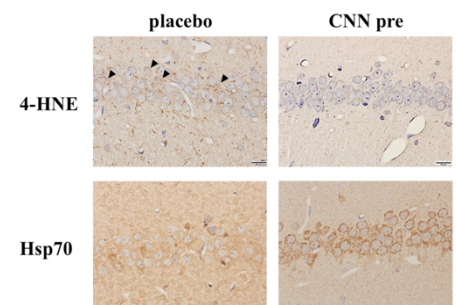
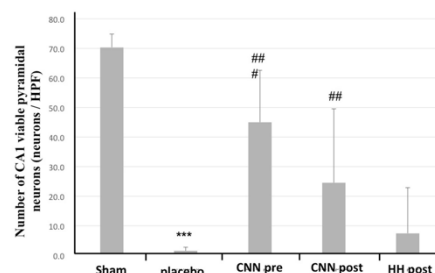
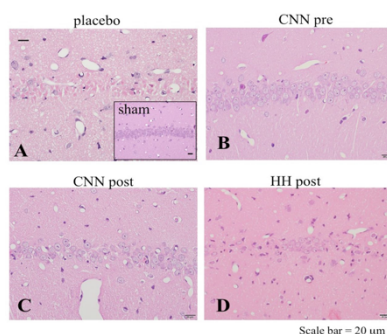
このことから CNN は HNE 消去／補足効果により細胞障害
 を抑制する効果があると判断された。

(3) 脳虚血細胞障害への効果

スナネズミ 両側頸動脈 5 分結紮の一過性前脳虚血モデルを用いて一週間後の海馬 CA1
 領域の錐体細胞の細胞死とその抑制効果を検討した。CNN を虚血前に腹腔内投与を行う
 と右図に示す通り錐体細胞の残存が認められ、脳虚血後の遅発性神経細胞死
 (DND: Delayed neuronal death) の抑制効果があることが明らかになった。

さらにこの効果は脳虚血後 10 分後に投与しても神経細胞死を抑制していた。さらにそ
 の分子メカニズムとして Hsp70 の発現を誘導していることが明らかとなった。

さらに中大脳動脈閉塞モデルにおいても脳梗塞巣の縮小が見られた (data not shown)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Takesue Y, Wei F-Y, Tomizawa K, Morioka M et al.,	4. 巻 66
2. 論文標題 Regulation of growth hormone biosynthesis by Cdk5 regulatory subunit associated protein 1-like 1 (CDKAL1) in pituitary adenomas	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 807-816
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1507/endorcj.EJ18-0536	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Komaki S, Sugita Y, Furuta T, Morioka M et al.,	4. 巻 78
2. 論文標題 Expression of GLUT1 in pseudopalisaded and perivascular tumor cells is an independent prognostic factor for patients with glioblastomas	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Neuropathology and Experimental Neurology	6. 最初と最後の頁 389-397
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jnen/nly124	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sugita Y, Furuta T, Komaki S, Ohshima K, Sakata K, Morioka M	4. 巻 39
2. 論文標題 Malignant progression of an extraventricular neurocytoma arising from	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuropathology	6. 最初と最後の頁 120-126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/neup.12533.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Koga M, Aoki T, Negoto T, Makizono T, Sugi K, Fujimori K, Kajiwarra S, Komaki S, Yoshitomi M, Sugita Y, Morioka M.	4. 巻 pii: S1878-8750(19)30469-3.
2. 論文標題 Leptomeningeal carcinomatosis following neoplastic cerebral aneurysm rupture: a case report.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 World Neurosurg.	6. 最初と最後の頁 0469-3.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.wneu.2019.02.058.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto M, Orito K, Nakamura Y, Takeshige N, Yoshitomi M, Takeuchi Y, Uzu H, Takasu O, Abe T, Tanoue S, Uchiyama Y, Morioka M.	4. 巻 161(2)
2. 論文標題 Leakage sign for acute subdural hematoma in clinical treatment.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Neurochir (Wien).	6. 最初と最後の頁 233-238.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00701-018-3755-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Noguchi Kei, Ali Taha F.S., Miyoshi Junko, Orito Kimihiko, Negoto Tetsuya, Biswas Tanima, Taira Naomi, Koga Ryoko, Okamoto Yoshinari, Fujita Mikako, Otsuka Masami, Morioka Motohiro	4. 巻 163
2. 論文標題 Neuroprotective effects of a novel carnosine-hydrazide derivative on hippocampal CA1 damage after transient cerebral ischemia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 European Journal of Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 207 ~ 214
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejmech.2018.11.060	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamakawa Yukako, Morioka Motohiro, Negoto Tetsuya, Orito Kimihiko, Yoshitomi Munetake, Nakamura Yukihiko, Takeshige Nobuyuki, Yamamoto Masafumi, Takeuchi Yasuharu, Oda Kazutaka, Jono Hirofumi, Saito Hideyuki	4. 巻 9
2. 論文標題 A novel step down infusion method of barbiturate therapy: Its safety and effectiveness for intracranial pressure control	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmacology Research & Perspectives	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/prp2.719	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Furuta Takuya, Sugita Yasuo, Komaki Satoru, Ohshima Koichi, Morioka Motohiro, Uchida Yasuo, Tachikawa Masanori, Ohtsuki Sumio, Terasaki Tetsuya, Nakada Mitsutoshi	4. 巻 79
2. 論文標題 The Multipotential of Leucine-Rich -2 Glycoprotein 1 as a Clinicopathological Biomarker of Glioblastoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neuropathology & Experimental Neurology	6. 最初と最後の頁 873 ~ 879
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jnen/nlaa058	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kikuchi Kiyoshi, Setoyama Kentaro, Takada Seiya, Otsuka Shotaro, Nakanishi Kazuki, Norimatsu Kosuke, Tani Akira, Sakakima Harutoshi, Kawahara Ko-ichi, Hosokawa Kazuya, Kiyama Ryoji, Sumizono Megumi, Tancharoen Salunya, Maruyama Ikuro, Hattori Gohsuke, Morioka Motohiro, Tanaka Eiichiro, Uchikado Hisaaki	4. 巻 21
2. 論文標題 E8002 Inhibits Peripheral Nerve Adhesion by Enhancing Fibrinolysis of L-Ascorbic Acid in a Rat Sciatic Nerve Model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3972 ~ 3972
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21113972	査読の有無 無
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 3件)

1. 発表者名 Kawano T, Mukasa A, Morioka M
2. 発表標題 Factors correlation with CBF, CVR change after revascularization surgery for patients with moyamoya disease
3. 学会等名 5th European Stroke Organisation Conference 2019.5.22-24 (Milan) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Morioka M, Noguchi K, Orito K, Fujita M, Ali T, Ohtsuka M
2. 発表標題 Neuroprotective effects of a novel carnosine-hydrazide derivative on hippocampal CA1 damage after transient cerebral ischemia.
3. 学会等名 BRAIN & BRAIN PET 2019 2019.7.4-7 (Yokohama) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Orito K, Yoshitomi M, Yamamoto M, Takeuchi Y, Hirohata M, Morioka M
2. 発表標題 Leakage sign for intracerebral hemorrhage in relation to the site of hemorrhage
3. 学会等名 BRAIN & BRAIN PET 2019 2019.7.4-7 (Yokohama) (国際学会)
4. 発表年 2019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
研究分担者	広畑 優 (Hirohata Masaru) (40218863)	久留米大学・医学部・教授 (37104)	
研究分担者	折戸 公彦 (Orito Kimihiko) (50597408)	久留米大学・医学部・講師 (37104)	
研究分担者	吉富 宗健 (Yoshitomi Munetake) (80529462)	久留米大学・医学部・助教 (37104)	
研究分担者	青木 孝親 (Aoki Takachika) (70330842)	久留米大学・医学部・講師 (37104)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------