

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14958

研究課題名（和文）酢酸誘発脳梗塞モデルマウスを用いた新規治療薬の探索および作用メカニズムの解明

研究課題名（英文）Evaluation of the effects of a new series of SMTPs in the acetic acid-induced embolic cerebral infarct mouse model

研究代表者

柴田 佳太 (Shibata, Keita)

昭和大学・薬学部・准教授

研究者番号：50727328

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：脳梗塞の急性期に用いられるt-PAによる血栓溶解療法は、著名な症状改善が認められるが、脳内出血等の重大な副作用をもたらすため、発症からの投与時間が制限されている。本研究では、我々が独自に開発した血栓溶解作用の評価が可能な酢酸誘発脳梗塞モデルマウスを用い、真菌由来化合物（SMTPs）のうち、SMTP-22およびSMTP-43を投与した際に、脳梗塞に対する著名な効果を示すことを明らかとした。また、両薬物はプラスミン活性作用、抗炎症作用および抗酸化作用を有していることが明らかとなり、既存薬のt-PAにはない作用を有していることから、新規脳梗塞治療薬としての将来性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳梗塞の急性期治療において、既存薬であるt-PAのような発症後の投与時間制限がある薬剤しか存在しない現状を踏まえると、新規脳梗塞治療薬の候補化合物を見い出せたことは、臨床的に非常に意義深いことである。また、血栓溶解作用のみではなく、抗炎症作用や抗酸化作用を併せ持つことの重要性を示せたことも、学術的に意義深いことである。

研究成果の概要（英文）：Tissue plasminogen activator (t-PA) has a short therapeutic time window for administration (4.5 h) and carries a risk of promoting intracerebral hemorrhage. The aim of the present study was to evaluate and compare the effect of a new series of SMTPs in the acetic acid-induced embolic cerebral infarct mouse model. Treatment with either SMTP-22 or SMTP-43 (10mg/kg), which have plasmin, anti-inflammatory and anti-oxidant activities, resulted in reduced infarct area, neurological score and edema. Coexistence of all these three activities appears to be important for the treatment of embolic infarction because SMTP-6, SMTP-25, and SMTP-44D (10mg/kg), which are each missing at least one of the three functions, were not as effective. Therefore, these results indicate that SMTP-22 and SMTP-43 have potential as medicinal compounds for the treatment of embolic cerebral infarction.

研究分野：薬理学

キーワード：脳梗塞 SMTPs 血栓溶解薬 プラスミン活性作用 抗炎症作用 抗酸化作用

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳血管疾患は、日本の主要死因別疾患割合の第4位であり、全体の8.7%と高い割合を占めている。その脳血管疾患の約6割を脳梗塞が占めているのが現状である。脳梗塞は、再発や高度な後遺症に悩まされるリスクが高く、平均在院日数も他疾患の3倍以上となる。従って、患者のQOL (quality of life) ばかりでなく家族の負担も非常に大きい。また、付随する医療費、介護費用の負担増も深刻な問題であるため、脳梗塞のより良い治療法や治療薬の開発が強く求められている。現在の脳梗塞急性期治療に用いられている tissue plasminogen activator (t-PA) による血栓溶解療法は、顕著な症状改善が認められるが、脳内出血等の重大な副作用をもたらすリスクが高いため、発症からの投与時間が4.5時間以内と厳しく制限されている。そのため、t-PA の恩恵を受けられている患者はわずか数%しか存在しない。従って、これらの問題点を克服した新規脳梗塞治療薬の開発は、学術的・臨床的に強く望まれている。

新規脳梗塞治療薬の候補物質を適切に評価するためには、ヒトでの病態を反映した動物モデルが必要である。現在までに種々の脳梗塞モデル動物が報告されているが、血栓溶解剤の評価が困難であること、外科的侵襲が大きいこと、あるいは発症の再現性が乏しいことなどから、十分に満足すべき脳梗塞モデル動物は得られていなかった。我々は、頸動脈に酢酸を塗布することによって作成した血栓を、血流により脳内に送り込むことで、ヒトでの発症に近い新規脳梗塞モデル動物を開発することに成功した (Hashimoto, Shibata et al. J Pharmacol Sci 2010)。本モデルでは、血栓が中大脳動脈内に留まり虚血状態を惹起すること、低侵襲にて t-PA の薬効が評価可能であることから、新規化合物の薬効評価に有用なモデル動物であると考えられる。

我々は以前、*Stachybotrys microspora* IF0 30018 が産生する SMTP-7 に着目し、前述の新規脳梗塞モデル動物を用いて薬理効果の検討を行った。SMTP-7 は、既存薬である t-PA のような投与時間の制限はなく、出血の発生頻度も有意に低かった。また、SMTP-7 は十分な血流改善作用およびプラスミン活性作用を持ち、t-PA とは異なり、抗炎症作用および抗酸化作用を持つことが明らかとなった (Shibata et al. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2010; Hashimoto, Shibata et al. J Pharmacol Sci 2010; Shibata et al. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2011; Miyazaki, Shibata et al. Stroke 2011)。これらの複合的な作用が SMTP-7 の特徴であり、投与時間が遅れた際にも顕著な薬理活性を示す要因であることが考えられた。これらの効果に関して 2011 年に特許を取得し、治験によってヒトにおける効果の検討中である。近年、共同研究者らにより、SMTP-7 に比べてさらに低分子である誘導体について報告されている (Koide et al. J Antibiot 2012)。SMTP-22 と SMTP-25 は SMTP-7 と同等のプラスミン活性作用を持っており、ラジカル消去能は 1.7 倍以上であると報告されている。また、SMTP-43 にもプラスミン活性作用があると報告されている。これらの低分子化合物は、経口投与を行うことができる可能性を有しており、出血を引き起こさずに血栓溶解作用や神経保護作用が認められれば、脳梗塞再発予防の治療にも有用であると期待される。

2. 研究の目的

上記背景から、我々が独自に開発した血栓溶解作用の検討が可能な酢酸誘発脳梗塞モデルマウスを用い、新規 SMTPs の脳梗塞に対する効果を比較検討し、著効を示した SMTPs の作用メカニズムを解明し、将来的な医薬品としての可能性を示すことを目的とする。

3. 研究の方法

我々がこれまでに報告した方法に準じ、酢酸誘発脳梗塞モデルマウスを作成し (Hashimoto, Shibata et al. J Pharmacol Sci 2010)、虚血開始 1 時間後に各々の SMTPs (SMTP-6, -22, -25, -43, -44D) を大腿静脈より 10 mg/kg 投与した。投与は、全量の 10% をボラスで投与し、残りを 30 分間かけて持続投与を行った。この条件下にて、脳梗塞発症 24 時間後の脳梗塞領域割合、神経欠損症状、脳浮腫率を指標として、各 SMTPs の薬効を評価した。また、各 SMTPs 投与 0、1、3 時間後に採血した血液を用いて、ザイモグラフィー法によりプラスミン活性、脳梗塞発症 24 時間後の摘出脳を用いて、real time RT-PCR 法により炎症性サイトカイン (IL-1 β 、TNF- α 、IL-6)、in vitro での TBA Reactive Substances (TBARS) 法により酸化ストレスの変動を評価した。

4. 研究成果

脳梗塞領域割合、神経欠損症状、脳浮腫率の検討

対照群の脳梗塞領域割合、神経欠損症状、脳浮腫率 (11.9 \pm 2.5%、3.2 \pm 0.5、13.2 \pm 1.8%) は、偽手術群の値 (3.0 \pm 0.3%、0.0 \pm 0.0、0.6 \pm 0.8%) より有意に高く、脳梗塞モデルマウスが正常に作製されたことが示された。10 mg/kg の SMTP-22 (4.4 \pm 0.5%、1.7 \pm 0.4、4.6 \pm 1.0%) および SMTP-43 (5.7 \pm 1.2%、1.5 \pm 0.5、3.3 \pm 1.4%) の投与は、脳梗塞領域割合、神経欠損症状、脳浮腫率の全てを有意に改善した。それぞれ、脳梗塞領域割合が 84.6% および 69.7%、神経欠損症状が 47.4% および 52.6%、脳浮腫率が 68.5% と 78.5% の改善であった。SMTP-44D の投与 (7.7 \pm 2.7%、2.2 \pm 0.4、6.9 \pm 2.9%) は、脳浮腫率のみが有意に改善された。

プラスミン活性

各 SMTPs 投与 0、1、3、時間後に採血した血液を用いてプラスミン活性を検討したところ、対照群 ($7.9 \pm 2.1\%$ 、 $8.0 \pm 2.2\%$ 、 $7.8 \pm 1.8\%$) と比較して、SMTP-25 ($19.3 \pm 2.2\%$ 、 $21.2 \pm 2.6\%$ 、 $23.6 \pm 4.7\%$) および SMTP-43 ($20.9 \pm 4.4\%$ 、 $24.1 \pm 3.7\%$ 、 $25.2 \pm 6.2\%$) を投与した際に、約 3 倍の有意な上昇を示した。SMTP-22 ($14.2 \pm 1.7\%$ 、 $16.5 \pm 2.6\%$ 、 $15.7 \pm 6.2\%$) を投与した際にも、0 および 1 時間の時点でのみプラスミン活性が有意に上昇した。一方、SMTP-6 と SMTP-44D は、どの時点でもプラスミン活性の上昇を示さなかった。

抗炎症作用

脳梗塞発症 24 時間後に摘出脳を用いて IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 の発現変化を検討したところ、対照群 (0.12 ± 0.043 、 0.47 ± 0.19 、 0.17 ± 0.046) は、TNF- α および IL-6 の発現が、偽手術群 (0.0036 ± 0.00068 、 0.010 ± 0.0033 、 0.0024 ± 0.00046) に比べて有意に高く、IL-1 β の発現は増加傾向を示した。SMTP-22 の投与 (0.040 ± 0.014 、 0.087 ± 0.030 、 0.040 ± 0.014)、SMTP-25 の投与 (0.060 ± 0.025 、 0.049 ± 0.016 、 0.056 ± 0.026)、SMTP-43 の投与 (0.025 ± 0.012 、 0.058 ± 0.015 、 0.023 ± 0.016) および SMTP-44D の投与 (0.070 ± 0.044 、 0.081 ± 0.030 、 0.081 ± 0.030) により、IL-1 β 、TNF- α および IL-6 の発現を低下させた。一方で、SMTP-6 の投与は、炎症性サイトカインの低下を示さなかった。

抗酸化作用

In vitro での酸化ストレスを検討したところ、すべての SMTPs (SMTP-25, $15.5 \pm 1.1 \mu\text{M}$; SMTP-6, $3.1 \pm 0.7 \mu\text{M}$; SMTP-22, $5.3 \pm 0.2 \mu\text{M}$; SMTP-43, $4.6 \pm 0.1 \mu\text{M}$; SMTP-44D, $5.0 \pm 0.5 \mu\text{M}$) は、対照群 ($29.0 \pm 0.3 \mu\text{M}$) に比べて有意に酸化ストレスを抑制した。しかし、SMTP-25 の抗酸化作用は、他の SMTP よりも有意に低かった。

上記結果より、SMTP-22 と SMTP-43 が新規脳梗塞治療薬としての候補化合物となることが示唆され、脳梗塞の治療薬として顕著な作用を示すためには、プラスミン活性、抗炎症作用および十分な抗酸化作用の 3 つを有していることが非常に重要であることが示唆された。

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 Shibata Keita, Hashimoto Terumasa, Hasumi Keiji, Honda Kazuo, Nobe Koji	4. 巻 818
2. 論文標題 Evaluation of the effects of a new series of SMTPs in the acetic acid-induced embolic cerebral infarct mouse model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 221 ~ 227
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejphar.2017.10.055	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 Shibata Keita, Hashimoto Terumasa, Miyazaki Takuro, Miyazaki Akira, Nobe Koji	4. 巻 25
2. 論文標題 Thrombolytic Therapy for Acute Ischemic Stroke: Past and Future	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Pharmaceutical Design	6. 最初と最後の頁 242 ~ 250
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2174/1381612825666190319115018	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

昭和大学 薬学部 基礎医療薬学講座 薬理学部門 ホームページ https://yakuyakuri.wixsite.com/pharmacology Researchmap - 柴田佳太 https://researchmap.jp/k.shibata Researchgate - Keita Shibata https://www.researchgate.net/profile/Keita_Shibata

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
---------------------------	-----------------------	----