

平成 22 年 4 月 20 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19390150

研究課題名(和文) 脳血管障害治療に有効な新しい作用機序を有する脳保護薬の開発

研究課題名(英文) Development of novel neuroprotective drugs targeting for neurovascular unit therapy.

研究代表者 福永 浩司 (FUKUNAGA KOHJI)

東北大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：90136721

研究成果の概要(和文)：私達はこれまでに2種の新しい作用機序を有する神経保護薬を開発してきた。カルモデュリン阻害剤 DY-9760e とプロテインキナーゼ B 活性化薬 VO(OPT) は脳虚血に伴う神経細胞死を抑制した。しかし、これらの化合物の神経血管保護作用のメカニズムは不明である。私達は DY-9760e とその活性代謝物 DY-9836 がカルシウム/カルモデュリン依存性一酸化窒素合成酵素 (NOS) を阻害することを見出した。本研究ではフェニレフリン誘導肥大心筋細胞を用いて、eNOS による障害性スーパーオキシド産生機構と、DY-9836 によるスーパーオキシド産生抑制の機序について検討した。フェニレフリン誘導肥大心筋細胞におけるスーパーオキシドの産生は eNOS のアンカップリングにより起こることが明らかとなった。eNOS のアンカップリングによる持続的なスーパーオキシドの産生は心筋細胞のアポトーシスを誘導した。DY-9836 の心筋保護効果は eNOS によるスーパーオキシドの産生抑制と相関した。さらに eNOS の足場蛋白質として機能している caveolin-3/dystrophin の分解も DY-9836 は抑制した。脳においても同様に、脳虚血後の血管内皮細胞におけるスーパーオキシドの産生を DY-9836 は抑制した。従って、DY-9760e/DY9836 によるスーパーオキシド産生抑制作用は神経血管保護作用において極めて重要である。

海馬顆粒細胞下層 (SGZ) における神経新生は学習や記憶形成に重要である。私達は PI3 キナーゼ/Akt と ERK の活性化薬 [VO(OPT)] が虚血後の神経新生を促進できるのか検討した。VO(OPT) の腹腔内投与は脳虚血後の SGZ における神経新生を促進した。PI3 キナーゼ/Akt と ERK の阻害剤である wortmannin と U-0126 は各々の活性を抑制する濃度で、VO(OPT) による SGZ における神経新生を完全に抑制した。さらに、VO(OPT) による神経新生促進効果は脳虚血に伴う認知機能障害の改善効果と良く相関した。本研究により VO(OPT) は PI3 キナーゼ/Akt と ERK の活性化反応を介して神経新生を促進すること、Akt と ERK による神経新生促進は脳虚血に伴う認知機能障害の改善に重要であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We have introduced novel neuroprotective drugs including calmodulin antagonist DY-9760e and protein kinase B (Akt) activator VO(OPT) in the ischemic neurodegeneration. However, the mechanisms underlying neurovascular unit protection by these compounds remain unclear. We found that DY-9760e and its active metabolite, DY-9836 are potent inhibitors of calcium/calmodulin dependent nitric oxide synthase (NOS) in vivo. We here defined pathophysiological role and mechanism of superoxide generation through uncoupled eNOS in phenylephrine (PE)-induced hypertrophic cardiomyocytes. In PE-induced hypertrophic cardiomyocytes, the superoxide generation was associated with increased uncoupling state of eNOS. Thus, uncoupling of eNOS accounts for superoxide generation by prolonged PE exposure, thereby inducing apoptotic cell death. Furthermore, cardioprotective effects of DY-9836 well correlated with inhibition of aberrant superoxide generation by suppression of eNOS activity. DY-9836 treatment also protected cardiomyocytes from breakdown of caveolin-3/dystrophin, which are major components to scaffold eNOS in cardiomyocyte caveolae. Similarly, DY-9836 treatment also attenuated superoxide generation following brain ischemia by uncoupled eNOS in vascular endothelial cells. Thus the inhibition of superoxide production by DY-9760e/DY9836 is critical for protection of neurovascular units in ischemia-induced neurodegeneration.

Neurogenesis is well documented in the subgranular zone (SGZ) of hippocampus. Especially, in the hippocampal neurogenesis, fundamental role of neurogenesis in learning and memory formation has been addressed. We here assessed whether VO(OPT), a stimulator of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt and extracellular signal regulated kinase (ERK) pathways promotes neurogenesis

following brain ischemia using a mouse transient middle cerebral artery occlusion (MCAO) model. Intraperitoneal administrations of VO(OPT), which is a potent inhibitor for protein tyrosine phosphatases (PTPs), stimulated neurogenesis in the adult dentate gyrus (DG) following brain ischemia. VO(OPT) led to activation of PI3K/Akt and ERK pathways, which are inhibited by treatment with specific inhibitor, wortmannin or U-0126, respectively. Each treatment of them significantly inhibited the neurogenesis, suggesting that both pathways need to elicit VO(OPT)-induced neurogenesis following brain ischemia. In some behavioral studies, we showed that VO(OPT)-induced neurogenesis accounts for improvement of memory deficits following brain ischemia. These results suggest that intraperitoneal administrations of VO(OPT) stimulate neurogenesis following brain ischemia through PI3K/Akt and ERK activation. Moreover, Akt- and ERK-induced neurogenesis is critical for improvement of memory deficits following brain ischemia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2008年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2009年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：薬物治療学

### 1. 研究開始当初の背景

私達は脳梗塞モデルを用いて新しいメカニズムの脳保護薬の薬理学研究を行ってきた。ラット四血管閉塞、ラット・マウス中大脳動脈閉塞、ラット脳塞栓モデルを用いて、新規カルモデュリン阻害剤 DY-9760e が強力な脳保護作用を示すこと、その脳保護作用機序を明らかにした。即ち、DY-9760e は過剰な一酸化窒素合成酵素 (nNOS、eNOS) の活性化を抑制し、一酸化窒素と活性酸素の反応物であるパーオキシナイトライトの産生を抑制した。また、形質膜の骨格タンパク質であるフォドリンへのカルモデュリンの結合を抑制してカルパインによる分解を阻止した。さらに、最近 DY-9760e が強力な脳血管保護作用を示し、DY-9760e による eNOS の抑制は活性酸素産生を抑制することにより、脳血管保護作用を発揮すると考えられる。しかし、細胞系を用いての eNOS による酸化ストレス障害における役割は不明である。次に、チロシンホスファターゼ阻害剤であるバナジウム化合物が末梢投与により脳虚血再灌流障害を抑制することを明らかにした。無機バナジウム化合物であるオルトバナジウム酸は細胞の生存シグナルであるプロテインキナーゼ B (Akt) と細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK) を活性化することにより細

胞保護作用を発揮した。齧歯類では脳虚血障害において大脳皮質の側脳室下帯 (SVZ)、海馬歯状回の顆粒細胞層下層 (SGZ) での神経新生が促進されることが知られている。バナジウム化合物はチロシンホスファターゼ (PTP-1B) を抑制して、神経幹細胞の増殖と神経細胞への分化に関わる Akt と ERK を活性化する。従って、バナジウム化合物は末梢投与で有効な神経新生促進薬として期待できる。

### 2. 研究の目的

DY-9760e に関して、これまで脳保護薬として開発を行ってきた。今回、DY-9760e の活性代謝物である DY-9836 を用いて eNOS 抑制効果と活性酸素障害抑制の関連性を明らかにする。次に、5 価のオルトバナジウム酸に比べて脳内移行性が良く、安全域も広い 4 価バナジウム有機錯体、bis(1-oxy-2-pyridinethiolato)oxovanadium (IV)、[VO(OPT)] を創製した。VO(OPT) が虚血後の神経細胞新生を促進することを発見した。新規バナジウム化合物 VO(OPT) の SGZ における神経新生、分化誘導のメカニズムと脳高次機能改善効果を明らかにする。

### 3. 研究の方法

新生ラットから単離培養した心筋細胞をフェニレフリン (10 microM) に 96 時間曝

露することにより、心筋肥大から心筋不全に至る細胞系を作製した。心筋障害はカベオリン-3、ジストロフィン分解を指標にした。さらにスーパーオキシドと一酸化窒素 (NO) 産生について蛍光性指示薬を用いて定量した。

C57BL/6N マウスを用いて、中大脳動脈閉塞モデルを作成した。脳虚血 1 週間後から BrdU とバナジウム化合物の投与を 4 日間行った。脳虚血 2 週間後に免疫染色法により、BrdU 陽性細胞数、BrdU/NeuN 両陽性細胞数を定量した。また、hilus border からの新生ニューロンの移動を検討するため、BrdU/DCX 両陽性細胞の検討を行った。免疫ブロット法により海馬歯状回における Akt、ERK の活性を測定した。さらに、バナジウム化合物による認知機能の回復を評価するために行動解析を行った。

#### 4. 研究成果

96 時間のフェニレフリン曝露により、肥大した心筋細胞ではカベオラに局在するカベオリン-3、eNOS が細胞質へ移行した。それに伴い、カルシウム非依存性の一酸化窒素 (NO) とスーパーオキシド産生が見られた。スーパーオキシド産生は eNOS の細胞質への移行と酵素のアンカップリング状態とよく関連した。この NO とスーパーオキシド上昇は eNOS 阻害剤である L-NAME およびカルモデュリン阻害剤、DY-9836 でほぼ完全に抑制された。さらに eNOS のアンカップリング反応も DY-9836 で抑制されることから、eNOS のアンカップリングは病態ではスーパーオキシド産生に関わると考えられる。eNOS による過剰な NO およびスーパーオキシド産生は心不全への進展に関与し、DY-9836 はフェニレフリン曝露による心筋障害を抑制することが明らかとなった。

バナジウム化合物の投与により脳虚血による神経新生が亢進し、同時に、新生した神経細胞の hilus border から顆粒細胞層への移動も促進された。私達はバナジウム化合物が PI3K/Akt 経路と ERK 経路を活性化することを既に明らかにしている。免疫ブロット法により、海馬歯状回においてバナジウム化合物投与後に Akt、ERK の活性が有意に上昇していることを確認した。さらに、それぞれの阻害剤である wortmannin,U-0126 を脳室内に投与し検討を行ったところ、どちらの処置によっても神経新生が阻害された。Y-maze task, novel object recognition task, passive avoidance task の行動解析によりバナジウム化合物投与が脳虚血後の認知機能低下を改善することを確認した。これらの結果より、脳虚血における神経新生には Akt、ERK の活性化が関与しており、それらを亢進させる薬剤 VO(OPT) は新生ニューロンを成熟させ、脳虚血により低下した認知機能を改善する

ことが示された。

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 18 件)

1. YM. Lu, N. Shioda, Y. Yamamoto, F. Han, K. Fukunaga: Transcriptional upregulation of calcineurin Abeta by endothelin-1 is partially mediated by calcium/calmodulin-dependent protein kinase IIdelta3 in rat cardiomyocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* in press (2010) 査読有り
2. N. Shioda, Y. Yamamoto, M. Watanabe, B. Binas, Y. Owada, K. Fukunaga: Heart-type fatty acid binding protein regulates dopamine D2 receptor function in mouse brain. *J Neurosci.* 30, 3146-3155 (2010) 査読有り
3. N. Shioda, Y. Yamamoto, F. Han, S. Moriguchi, Y. Yamaguchi, M. Hino, K. Fukunaga: A Novel Cognitive Enhancer, ZSET1446/ST101, Promotes Hippocampal Neurogenesis and Ameliorates Depressive Behavior in Olfactory Bulbectomized Mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 333, 43-50 (2010) 査読有り
4. F. Han, YM. Lu, H. Hasegawa, H. Kanai, E. Hachimura, Y. Shirasaki, K. Fukunaga: Inhibition of dystrophin breakdown and endothelial nitric-oxide synthase uncoupling accounts for cytoprotection by 3-[2-[4-(3-chloro-2-methylphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-5,6-dimethoxy-1-(4-imidazolylmethyl)-1H-indazole dihydrochloride 3.5 hydrate

- (DY-9760e) in left ventricular hypertrophied Mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 332, 421-428 (2010) 査読有り
5. YM. Lu, F. Han, N. Shioda, S. Moriguchi, Y. Shirasaki, ZH. Qin and K. Fukunaga: Phenylephrine-induced cardiomyocyte injury is triggered by superoxide generation through uncoupled endothelial nitric-oxide synthase and ameliorated by 3-[2-[4-(3-chloro-2-methylphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-5,6-dimethoxyindazole (DY-9836), a novel calmodulin antagonist. *Mol. Pharmacol.* 75, 101-112 (2009) 査読有り
  6. MS. Bhuiyan, N. Shioda, M. Shibuya, Y. Iwabuchi and K. Fukunaga: Activation of endothelial nitric oxide synthase by a vanadium compound ameliorates pressure overload-induced cardiac injury in ovariectomized rats. *Hypertension* 53, 57-63 (2009) 査読有り
  7. YM. Lu, N. Shioda, F. Han, A. Kamata, Y. Shirasaki, ZH. Qin and K. Fukunaga: DY-9760e inhibits endothelin-1-induced cardiomyocyte hypertrophy through inhibition of CaMKII and ERK activities. *Cardiovasc. Ther.* 27, 17-27 (2009) 査読有り
  8. F. Han, T. Nakano, Y. Yamamoto, N. Shioda, YM. Lu and K. Fukunaga: Improvement of depressive behaviors by nefiracetam is associated with activation of CaM kinases in olfactory bulbectomized mice. *Brain Res.* 1265, 205-214 (2009) 査読有り
  9. N. Shioda, F. Han and K. Fukunaga: Role of Akt and ERK signaling in the neurogenesis following brain ischemia. *Int. Rev. Neurobiol.* 85, 375-387 (2009) 査読有り
  10. F. Han, N. Shioda, S. Moriguchi, ZH. Qin and K. Fukunaga: Downregulation of glutamate transporters is associated with elevation in extracellular glutamate concentration following rat microsphere embolism. *Neurosci. Lett.* 430, 275-280 (2008) 査読有り
  11. F. Han, N. Shioda, S. Moriguchi, Y. Yamamoto, AY. Raie, Y. Yamaguchi, M. Hino, K. Fukunaga: Spiro[imidazo[1,2-a]pyridine-3,2-indan]-2(3H)-one (ZSET1446/ST101) treatment rescues olfactory bulbectomy-induced memory impairment by activating Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase II and protein kinase C in mouse hippocampus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 326, 127-134 (2008) 査読有り
  12. MS. Bhuiyan, Y. Takada, N. Shioda, S. Moriguchi, J. Kasahara and K. Fukunaga: Cardioprotective effect of vanadyl sulfate on ischemia/reperfusion-induced injury in rat heart in vivo is mediated by activation of protein kinase B and induction of FLICE-inhibitory protein. *Cardiovasc. Ther.* 26, 10-23 (2008) 査読有り
  13. F. Han, N. Shioda, S. Moriguchi, ZH. Qin and K. Fukunaga: The vanadium (IV) compound rescues

- septo-hippocampal cholinergic neurons from neurodegeneration in olfactory bulbectomized mice. *Neuroscience* 151, 671-679 (2008) 査読有り
14. N. Shioda, F. Han, M. Morioka and K. Fukunaga: Bis(1-oxy-2-pyridinethiolato)oxovanadium(IV) enhances neurogenesis via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and extracellular signal regulated kinase activation in the hippocampal subgranular zone after mouse focal cerebral ischemia. *Neuroscience* 155, 876-887 (2008) 査読有り
  15. F. Han, A. Ali Raie, N. Shioda, ZH. Qin and K. Fukunaga: Accumulation of beta-amyloid in the brain microvessels accompanies increased hyperphosphorylated tau proteins following microsphere embolism in aged rats. *Neuroscience* 153, 414-427 (2008) 査読有り
  16. MS. Bhuiyan, M. Shibuya, N. Shioda, S. Moriguchi, J. Kasahara, Y. Iwabuchi and K. Fukunaga: Cytoprotective effect of bis(1-oxy-2-pyridinethiolato)oxovanadium(IV) on myocardial ischemia/reperfusion injury elicits inhibition of Fas ligand and Bim expression and elevation of FLIP expression. *Eur. J. Pharmacol.* 571, 180-188 (2007) 査読有り
  17. N. Shioda, F. Han, S. Moriguchi, K. Fukunaga: Constitutively active calcineurin mediates delayed neuronal death through Fas-ligand expression via activation of NFAT and FKHR transcriptional activities in mouse brain ischemia. *J. Neurochem.* 102, 1506-1517 (2007) 査読有り
  18. N. Shioda, T. Ishigami, F. Han, S. Moriguchi, M. Shibuya, Y. Iwabuchi and K. Fukunaga: Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway by a vanadyl compound mediates its neuroprotective effect in mouse brain ischemia. *Neuroscience* 148, 221-229 (2007) 査読有り
- [学会発表] (計 9 件)
1. 塩田倫史、福永浩司: 脳虚血におけるバナジウム化合物の神経・血管保護効果. 日本薬学会 第 130 年会、平成 22 年 3 月 28 日~30 日、岡山
  2. 福永浩司、塩田倫史、山本由似、森口茂樹: 新規アルツハイマー治療薬の認知機能改善とうつ症状改善作用の神経機序. 日本薬学会 第 130 年会、平成 22 年 3 月 28 日~30 日、岡山
  3. 福永浩司、Lu Yingmei、韓 峰: ジストロフィン分解と eNOS アンカップリングは心肥大による心筋障害の原因である. 第 83 回日本薬理学会年会、平成 22 年 3 月 16 日~18 日、大阪
  4. 塩田倫史、山本由似、大和田祐二、福永浩司: ドパミン D2 受容体に対する脂肪酸結合蛋白質の機能的役割. 第 83 回日本薬理学会年会、平成 22 年 3 月 16 日~18 日、大阪
  5. 笠原二郎、大村幸司、福永浩司: マウス大脳皮質初代培養神経細胞におけるセロトニンによる CREB リン酸化反応は CaMKIV と MAPK(ERK) を介する. 第 83 回日本薬理学会年会、平成 22 年 3 月 16

- 日~18日、大阪
6. 森口茂樹、福永浩司：CaMキナーゼIIとプロテインキナーゼCの活性化を介したPAFによる海馬シナプス伝達の増強. 第83回日本薬理学会年会、平成22年3月16日~18日、大阪
  7. 森口茂樹、塩田倫史、喜多紗斗美、小室一成、岩本隆宏、福永浩司：Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>交換体の認知機能調節における役割. 平成21年度生理学研究所研究会 シナプス研究会 「シナプス機能と病態」、平成21年12月14~15日、愛知
  8. 塩田倫史、福永浩司：ラット4血管閉塞モデルにおけるバナジウム化合物VO(OPT)末梢投与による虚血耐性誘導. 第21回日本脳循環代謝学会総会、平成21年11月19日~20日、大阪
  9. 塩田倫史、山本由似、大和田祐二、福永浩司：脂肪酸結合蛋白質H-FABPによるドパミンD2受容体の機能調節. 第39回日本神経精神薬理学会、平成21年11月13日~15日、京都

[図書] (計2件)

1. K. Fukunaga and N. Shioda: Pathophysiological Relevance of Forkhead Transcription Factors in Brain Ischemia Forkhead Transcription Factor: Vital Elements in Biology and Medicine (ed. K. Maiese, Landes Bioscience) (2009)
2. K. Fukunaga, N. Shioda and E. Miyamoto: The Function of CaM Kinase II in Synaptic Plasticity and Spine Formation. Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology. Neural Signaling Mechanisms (ed. A. Lajtha. Vol. ed. K. Mikoshiba, Springer) 163-184 (2009)

[産業財産権]  
○出願状況 (計0件)

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

○取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：  
〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織
  - (1) 研究代表者  
福永 浩司 (FUKUNAGA KOHJI)  
東北大学大学院・薬学研究科・教授  
研究者番号：90136721
  - (2) 研究分担者  
岩淵 好治 (IWABUCHI YUSHIHARU)  
東北大学大学院・薬学研究科・教授  
研究者番号：20211766
  - (3) 研究分担者  
森岡 基浩 (MORIOKA MOTOHIRO)  
熊本大学・医学部付属病院・准教授  
研究者番号：20295140
  - (4) 研究分担者  
笠原 二郎 (KASAHARA JIRO)  
徳島大学大学院・ヘルスパイオサイエンス研究部・准教授  
研究者番号：10295131
  - (5) 研究分担者  
森口 茂樹 (MORIGUCHI SHIGEKI)  
東北大学大学院・薬学研究科・講師  
研究者番号：70374949
  - (6) 研究分担者  
塩田 倫史 (SHIODA NORIFUMI)  
東北大学大学院・薬学研究科・助手  
研究者番号：00374950
  - (7) 連携研究者  
( )

研究者番号：