

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：83902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09471

研究課題名(和文)性ステロイドprogesteroneに着目した画期的脳梗塞治療法の研究

研究課題名(英文)A study on novel therapeutic strategies for stroke using progesterone.

研究代表者

田中 基樹(Tanaka, Motoki)

愛知県医療療育総合センター発達障害研究所・障害モデル研究部・主任研究員

研究者番号：90584673

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)：脳梗塞は、日本人の死因の上位を占めると共に重篤な後遺症を生じさせる重大な疾患であるが、未だ多くの患者に適応可能な有効な治療法はない。本研究ではプロゲステロン受容体アゴニスト nestoroneに着目し、多くの患者を救える新規脳梗塞治療法の開発を目指した。中大脳動脈閉塞(MCAO)による脳梗塞モデル動物においてnestoroneの有効性を検証したところ、MCAO処置18時間後の投与であっても、nestoroneはMCAO後の運動感覚機能障害を大幅に改善させ、脳損傷領域も有意に減少させた。以上の結果はnestoroneが、脳梗塞に対して有望な新規治療薬となり得ることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

組織プラスミノゲン活性化因子(tPA)による血栓溶解療法は現在最も有効な脳梗塞治療法であるが、発症4時間半を経過した患者には適応できず、また脳出血発症などの重篤な副作用をもつ。一方nestoroneは、MCAO18時間後の投与であっても有意な脳保護効果を示し、発症後数時間が勝負と言われる現在の脳梗塞治療における限界を打破する可能性を有している。加えてnestoroneは、避妊薬としてアメリカ食品医薬品局から既に認可を受けており、重篤な副作用の懸念も少ないと考えられる。以上より、nestoroneは臨床的に極めて実用性の高い新規脳梗塞治療薬となり得る。

研究成果の概要(英文)：Stroke is a leading cause of death and disability in a large number of countries. Thrombolysis by tissue plasminogen activator is the most effective treatment currently available, while it has limitations such as a very narrow therapeutic time-window (4.5 h after symptom onset). The present study examined effects of the progesterone receptor agonist nestorone on permanent focal cerebral ischemia (pMCAO) in adult and old male rats. Nestorone was continuously administered by Alzet osmotic pumps, starting at 18 h after pMCAO. Nestorone-treated adult male rats showed marked improvements of functional and histological outcomes 30 days after pMCAO. The same administration way of nestorone provided comparable neuroprotective effects in old male rats. These results suggest that post-ischemic administration of nestorone exerts long-term neuroprotection with a wider therapeutic time-window against permanent focal cerebral ischemia in both adult and old male rats.

研究分野：神経薬理学

キーワード：脳梗塞 神経ステロイド 脳保護作用

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞は日本人の死因の第4位である脳血管疾患の約6割を占め、一命を取り留めたとしても多くの場合身体麻痺などの重篤な後遺症が残る重大な疾患である。組織プラスミノゲン活性化因子 (tPA) による血栓溶解療法は現在最も有効な脳梗塞治療法であるが、発症4時間半を経過した患者には適応できず、また脳出血発症などの重篤な副作用をもつため、未だ多くの患者を救えずにいる。さらに一度脳が虚血状態に陥ると例え血栓溶解が良好に起きて、発症後数日間にわたり遅発性の神経細胞死が起き、それが重篤な後遺症の原因となる。tPAを含め現行療法では遅発性神経細胞死は防げず、遅発性神経細胞死を防ぐ新規治療法の開発が必須である。またその新規治療法の条件としては、比較的副作用が少なく、脳梗塞発症4時間半以上経過後の処置でも治療効果を有することが求められる。

研究代表者は以前より、中大脳動脈閉塞 (MCAO) により脳梗塞を実験的に発症させたラットを用いて、新規脳梗塞治療法の開発を目指してきた。そして老齢のオス及びメスラットにおいて、性ステロイド progesterone (P4) が脳虚血による神経細胞死を防ぐことで脳梗塞サイズを顕著に減少させ、脳梗塞の後遺症である運動機能障害も大幅に改善することを報告した (Tanaka et al., *Exp Gerontol.* 2018)。注目すべきは、P4が脳梗塞発症16時間経過後の投与であっても顕著に神経細胞死を防いだことである。以上のデータは、新規脳梗塞治療薬としてP4が有望であることを示しているが、実際の脳梗塞患者に適応するにあたっては課題が残っている。P4は体内で androgen や estrogen に代謝され得る。そのため前立腺肥大症など他の疾患を併発している可能性のある実際の患者に対して、他のステロイドに代謝され得るP4の投与は困難となる場合がある。そこで研究代表者は、P4受容体の選択的アゴニストである nestorone が、上記P4の問題点を解決する治療薬になるのではないかと考えた。NestoroneはP4受容体に対して極めて高い活性を有する一方、生体内で他のステロイドに代謝されず、androgen や estrogen 受容体に対する活性を有しない (Kumar et al., *Steroids* 65: 629-636)。そのため nestorone は、他の疾患を併発している患者に対しても適応可能な新規脳梗塞治療薬となり得る可能性がある。

2. 研究の目的

P4受容体アゴニスト nestorone が、脳梗塞発症後長期経過しても脳保護作用を発揮するか否かを、脳梗塞モデル動物を用いて検証した。検証は、脳梗塞が主に高齢者の疾患であることから、若齢動物に加え、高齢動物においても実施した。また nestorone による脳保護作用の機序の解明も行った。

3. 研究の方法

本研究における動物実験の実施にあたっては、愛知県医療療育総合センター発達障害研究所動物実験委員会へ本研究に関わる動物実験計画書を提出し、その承認を受けた。また関係法令並びに「愛知県医療療育総合センター発達障害研究所における動物実験規程」に従って実験を行った。

実験には生後5~6ヶ月齢 (若齢) または16~18ヶ月齢 (高齢) のオスラットを使用した。脳梗塞モデルは、イソフルラン麻酔下において左中大脳動脈を電気メスで凝固切断後 (middle cerebral artery occlusion: MCAO)、総頸動脈をクリップで45分間閉塞することで作製した。Sham群では、中大脳動脈の凝固切断及び総頸動脈へのクリッピング以外は同様の外科処置を行った。薬剤投与のため、MCAO処置18時間後に10 µg/kg/dayの条件で nestorone 又は溶媒 (30% 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin) が投与されるよう調整された浸透圧ポンプをラットの皮下に埋め込んだ。ポンプはMCAO処置8日目に摘出した。

MCAO後の機能障害に対する nestorone の効果を調べるため、MCAO処置30日後に感覚機能を評価する adhesive removal 試験及び運動機能を評価するロータロッド試験を行った。また行動実験終了後、3種混合麻酔下で4%パラフォルムアルデヒドによる灌流固定を行い、脳を摘出した。摘出した脳は、パラフィン包埋後、5 µm厚で切り出し、形態学的評価のため、Cresyl Violet 染色又は免疫染色を行った。

4. 研究成果

(1) 若齢ラットにおける nestorone の脳保護作用

5~6ヶ月齢のオスラットにMCAO処置を行い、MCAO処置30日後の感覚機能及び運動機能を評価した。sham処置群と比較して、MCAO処置群の adhesive removal 試験及びロータロッド試験の成績は有意に低下していたが、nestorone はそれらの低下を有意に改善した (図1A、B)。また Cresyl Violet 染色により脳梗塞領域を評価したところ、nestorone は脳梗塞領域を有意に減少させた (図1C)。以上のデータは、MCAO処置18時間後からの投与でも、nestorone が有意な脳保護効果を発揮することを示しており、nestorone は tPA が適応できない脳梗塞患者にも投与可能な新規治療薬となり得る可能性がある。

(2) 高齢ラットにおける nestorone の脳保護作用

ステロイドホルモンによる脳内作用は加齢によって変化する可能性が報告されており (Cheng et al., *J Cereb Blood Flow Metab* 29: 486-494, Tanaka et al., *Transl Stroke Res* 10:67-77)、また脳梗塞が主に高齢者において発症する疾患であることから、若齢動物に加え、高齢動物においても nestorone による脳保護効果を検証する必要がある。そこで若齢オスラットと同様の投与プロトコルで、nestorone が高齢オスラット (16~18ヶ月齢) においても脳保護作用を発揮するか否かを検証した。その結果、高齢オスラットにおいても nestorone は、MCAO 処置によって低下した adhesive removal 試験及びロータロッド試験の成績を顕著に改善させ (図 2A、B)、また脳梗塞領域も有意に減少させた (図 2C)。以上の結果は、nestorone が脳虚血傷害に対して、加齢に依存せず頑強な脳保護作用を発揮することを示している。

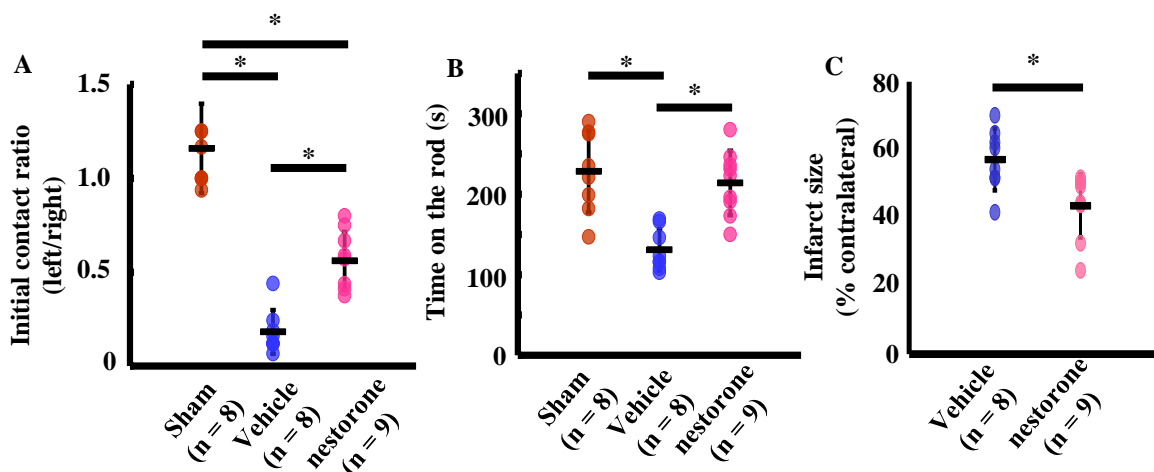


図 1 若齢オスラットにおける MCAO30 日後の行動学的及び形態学的評価

(A) Adhesive removal 試験の結果。縦軸は、左前脚 (正常側) 又は右前脚 (傷害側) に巻かれたテープを剥がそうとするまでの時間の比を示す。(B) ロータロッド試験の結果。縦軸は、回転するロッド上での滞在時間を示す。(C) 脳梗塞領域の大きさ。縦軸は、右半球 (正常側) に対する左半球 (傷害側) の損傷領域の割合を示す。*: $p < 0.05$ 。

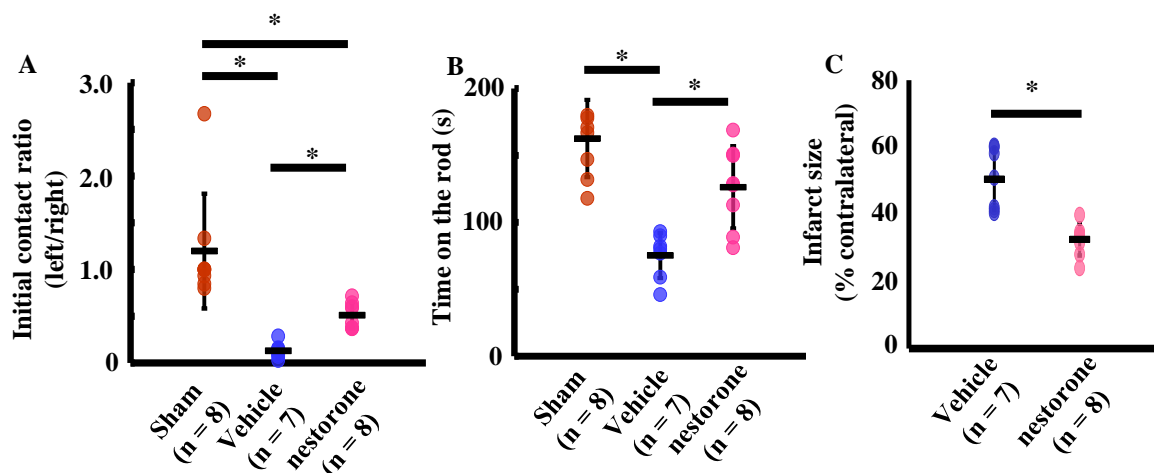


図 2 高齢オスラットにおける MCAO30 日後の行動学的及び形態学的評価

(A) Adhesive removal 試験の結果。縦軸は、左前脚 (正常側) 又は右前脚 (傷害側) に巻かれたテープを剥がそうとするまでの時間の比を示す。(B) ロータロッド試験の結果。縦軸は、回転するロッド上での滞在時間を示す。(C) 脳梗塞領域の大きさ。縦軸は、右半球 (正常側) に対する左半球 (傷害側) の損傷領域の割合を示す。*: $p < 0.05$ 。

(3) nestorone による神経再生作用の検証

先行研究に置いて nestorone は、細胞新生を促進させる作用を有していることが報告されている (Chen et al., *Menopause* 25:1138-1151)。そこで nestorone による脳梗塞治療効果の機序として、nestorone がニューロン新生を促進している可能性について調べた。MCAO 処置 7 日目及び 8 日目に、nestorone 投与群、未投与群、sham 群それぞれに新生細胞を標識する BrdU (50 mg/kg、1 日 2 回) を投与し、処置 30 日後に脳梗塞領域である大脳皮質及び線条体の新生ニューロンの数を調べた。その結果、nestorone 投与によって新生ニューロンの数は、未投与群と比較して増加する傾向はあったものの、両者に有意な差は観察されなかった (図 3)。以上より nestorone による脳梗塞治療効果は主に、神経細胞死の抑制や既存の神経回路の再編成によるものである可能性が示唆された。

(4) nestorone による抗神経炎症作用

P4 に脳虚血傷害の増悪に寄与する神経炎症を抑える働きが報告されていることから (Meyer et al., *Neuroscience* 308:51-63)、nestorone による脳保護効果に抗神経炎症作用が関与しているか否かを調べるため、神経炎症に寄与する活性化アストロサイトの増加を、そのマーカーである GFAP を免疫染色することによって調べた。MCAO 処置 30 日後の GFAP の発現は、正常脳半球側と比較して脳梗塞領域辺縁部位では有意に増加していた。一方 nestorone を投与された群では、MCAO 処置後の GFAP の増加は有意に抑制されていた (図 4)。すなわち作用機序のひとつとして、nestorone は活性化アストロサイトの増加を抑制することによって、脳虚血傷害を防いでいることが示唆された。

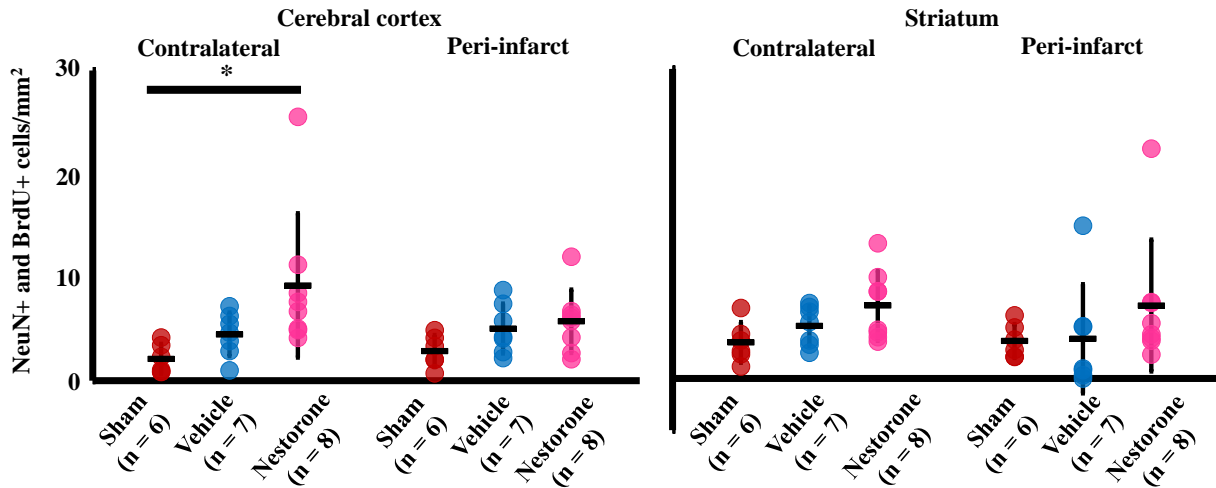


図 3 若齢オスラットにおける MCAO30 日後の新生ニューロンの数

大脳皮質 (左) 及び線条体 (右) における NeuN 及び BrdU が共に陽性である細胞の数。MCAO 後 7 日目または 8 日目に新生した細胞を BrdU によって標識し、MCAO30 日後に大脳皮質又は線条体で神経細胞のマーカーである NeuN を発現している BrdU 陽性細胞の数を計測した。

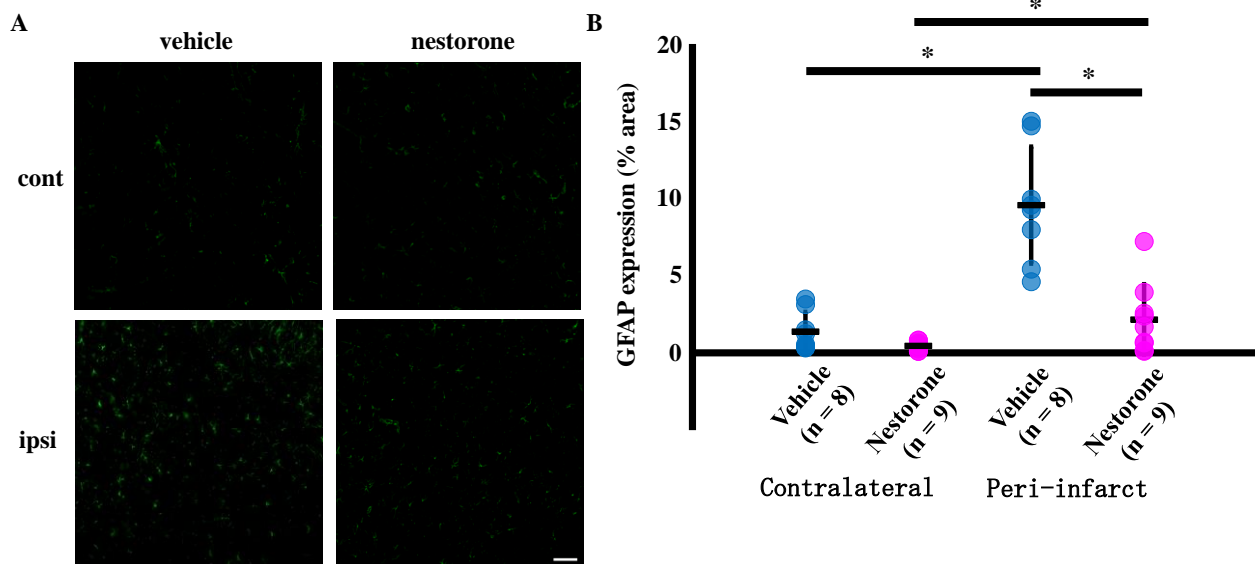


図 4 若齢オスラットにおける MCAO30 日後の GFAP 発現

(A) GFAP 染色画像の代表例。cont: 正常側大脳皮質における染色像。ipsi: 傷害側大脳皮質の脳梗塞辺縁部位における染色像。スケールバーは 50 μm (B) 脳梗塞辺縁部及びその対側での GFAP 発現。縦軸は、撮影領域中の GFAP 染色領域の割合を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 Tanaka M, Sokabe M, Asai M
2. 発表標題 The progesterone receptor agonist nestorone exerts long-term neuroprotection against permanent focal cerebral ischemia in male rats.
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tanaka M, Ogaeri T, Samsonov M, Sokabe M.
2. 発表標題 Solo activation of progesterone receptor is sufficient to exert long-term neuroprotection against transient focal cerebral ischemia in male rats.
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tanaka M, Sokabe M, Asai M
2. 発表標題 Long-term neuroprotection of the progesterone receptor agonist nestorone against permanent focal cerebral ischemia in adult and old male rats.
3. 学会等名 Neuro2022
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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