

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06609

研究課題名(和文) アストログリアのエンドセリン受容体を標的とした外傷性脳損傷(TBI)改善薬の開発

研究課題名(英文) Development of therapeutic drugs for traumatic brain injury (TBI) to target astroglial endothelin receptors

研究代表者

小山 豊 (Koyama, Yutaka)

神戸薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：00215435

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)：外傷性脳損傷(TBI)から脳を保護する薬物開発を目的に、マウス脳傷害モデルおよび培養アストログリアを用い、次の知見を得た。エンドセリン(ET)拮抗薬は、TBIによる脳浮腫を惹起する炎症性因子の発現を抑制した。ET拮抗薬は、TBIによる炎症性細胞の脳内浸潤を抑制した。ET刺激薬は、アストログリアでの炎症性因子の発現を抑制するタンパクの発現を増加させた。以上の結果は、ET受容体は、TBIによる神経障害を改善する薬物の新たな標的分子となり得ることを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

外傷性脳損傷は、交通事故や高所からの落下により頭部を殴打した際に生じる病態で、単に致命的なだけでなく存命した患者にも半身まひや記憶障害など大きな後遺症を残す。しかし現在、外傷性脳損傷に対する有効な薬物による治療方法は確立されていない。本研究は外傷性脳損傷治療法の開発を目指し、新たな薬物標的を探索することを目的として行われた。本研究で得られた結果は、既に他の疾患の治療薬としても用いられているエンドセリン(ET)受容体拮抗薬が外傷性脳損傷での神経障害を抑制し得ることを示すものであった。本研究結果をさらに発展させ、新たな外傷性脳損傷の治療薬が創生されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：For the purpose to generate novel neuroprotective drugs against traumatic brain injury (TBI), we made basic researches in animal models of TBI and the following findings were obtained. 1) Endothelin (ET) antagonists reduced expressions of inflammatory factors that induce brain edema by TBI. 2) ET antagonists reduced infiltration of inflammatory blood cells into the brain by TBI. 3) ET stimulants increased the expression of proteins that suppress expressions of inflammatory factors in astroglia. These results suggest that ET receptors could be a new target molecule for drugs that improve neurological disorders caused by TBI.

研究分野：薬理学

キーワード：endothelin astroglia TBI brain edema neuroinflammation

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

外傷的脳損傷(Traumatic Brain Injury: TBI)とは、交通事故や転倒など頭部に加わる物理的な衝撃が、脳組織を損傷する病態で、我が国での有病率は年齢を問わず 10 万人あたり 400 ~ 500 人と推定される。脳への衝撃が大きい場合、数時間から数日にかけて打撃部位の周辺に脳浮腫が発生する。脳浮腫に伴う頭蓋内圧の上昇は、神経機能を低下させ患者を死に至らしめる。そのため TBI の急性期では、脳浮腫を軽減するため利尿薬投与や開頭術などが行われている。しかし、これらの治療は対症的治療であり、薬物により脳浮腫の発生自体を抑制する治療は確立していない。また TBI は単に致命的なだけでなく、存命した患者にも後遺症として運動機能障害の他、記憶・認知や気分など高次脳機能の障害が高頻度に起きる。現在、TBI で低下した運動機能や高次脳機能の回復は、運動療法を主とした理学療法により行われているが、これまでの研究は、理学療法による脳機能回復のメカニズムとして、損傷脳での神経新生や神経突起伸展に基づく神経回路再生の関与を明らかにしている。そのためこれまでに、TBI 改善のため、神経新生や神経突起進展を促す神経栄養因子類を直接患者に投与する方法が検討された。しかし前臨床での有効性に関わらず、患者への投与の困難さや有害作用の発現により医薬品として実用化はされていない。また 2022 年には幹細胞由来の細胞製剤 SB623 が “先駆け審査指定制度” の対象医薬品として TBI 患者の脳機能改善への適応が認められた。しかし細胞製剤は治療コストが高く、また治療を実施できる施設も限定されている。そのため現在、より広範な医療現場での使用が可能な、新たな TBI 改善薬の開発が望まれている。

### 2. 研究の目的

本研究は、新たな TBI 治療薬を「アストログリアの機能を薬物で制御する」という新規な創薬戦略に基づき開発しようとするものである。アストログリアは、end-feet と呼ばれる構造により脳微小血管を取り巻き、これが血中成分の脳内流入を制限する血液脳関門(BBB)を構成する。一方でアストログリアは、脳損時に活性化アストログリアへと phenotype を変化させ、多種の生理活性物質を産生・放出する。それらのアストログリア由来因子には、サイトカインやケモカインな脳微小血管の透過性を亢進させ、血液成分や炎症性細胞の脳内浸潤を高める因子が含まれる。またアストログリアには脳浮腫の成因となる脳内水分量増加に関わるイオン輸送体も存在する。即ち「アストログリアの生理活性因子産生能を薬物でコントロールする」とは、TBI 急性期での脳浮腫および炎症性細胞の脳内浸潤を軽減させるため、薬物によりアストログリアの血管透過性亢進因子の産生抑制を導こうとするものである。これまでに我々は、培養アストログリアにおいて ET 受容体の刺激が、いくつかの脳浮腫惹起因子の産生を高めることを示している。本研究はこれらの知見を発展させ、TBI モデル動物を用い、ET 受容体拮抗薬を TBI 治療薬としての有効性の検証を目的として遂行された。

### 3. 研究の方法

ET<sub>B</sub> 受容体拮抗薬による脳浮腫惹起因子の産生抑制：

実験には外傷性脳損傷モデルとして頻用される Fluid percussion 傷害(FPI)を用い、ET 拮抗薬の有効性を検討した。マウス大脳に FPI を加え、サイトカインおよびケモカイン等の血管透過性調節因子および脳浮腫惹起に関わるイオン輸送体の発現変化を RT-PCR および ELISA により測定した。また同時に、同実験モデルで生じる血液脳関門の破綻が ET<sub>B</sub> 拮抗薬により抑制されるかを検討した。透過性の評価は、Evans blue の脳内漏出量の測定により行った。

ET<sub>B</sub> 受容体拮抗薬による白血球脳内浸潤の抑制：

脳損傷時に生じる BBB 破綻は炎症性細胞の脳内浸潤を許し、これが神経炎症を増悪させる。そこで FPI による白血球の脳内浸潤が ET<sub>B</sub> 拮抗薬により抑制されるかを検討した。FPI 後のマウス脳より凍結切片を作成し、白血球の脳内浸潤を抗 Ly6G 抗体および抗ミエロペルオキシダーゼ(MPO)抗体を用いた免疫組織化学により観察した。

ET<sub>B</sub> 受容体を介した RNA 結合タンパクの発現変化：

培養アストログリアを ET-1 処置後、mRNA およびタンパクを RT-PCR およびイムノブロットによりそれぞれ測定した。RNA 結合タンパクの炎症惹起因子 mRNA への結合は、RNA 免疫沈降後の RT-PCR により測定した。RNA 結合タンパクのノックダウンは、培養アストログリアへの siRNA のトランスフェクションで行った。マウス TBI モデルでの RNA 結合タンパクの発現は、傷害 2 日後に大脳を摘出し、mRNA、タンパクおよび脳内局在を、RT-PCR、イムノブロットおよび免疫組織染色でそれぞれ観察した。

### 4. 研究成果

FPI を受けたマウス大脳では、BBB 破綻および脳浮腫が生じた。ET<sub>B</sub> 拮抗薬 BQ788 投与は、FPI 処置 2 日後での BBB 破綻および脳浮腫の発生を減弱させた。血管透過性の亢進および白血球の遊走を惹き起こすケモカイン MCP-1/CCL2、MIP-2/CXCL2 および GRO- $\alpha$ /CXCL1 の発

現は、FPI により増加した。また炎症性サイトカインである IL-1 発現も FPI により増加した。FPI による MCP-1/CCL2、MIP-2/CXCL2、GRO- $\beta$ /CXCL1 および IL-1 の増加は、BQ788 投与により減弱した。ET-1 によるマウス培養アストログリアの処置は、MCP-1/CCL2 および GRO- $\beta$ /CXCL1 発現を増加させた。これらケモカインへの ET-1 の作用は、BQ788 により抑制された。一方、培養アストログリアでの MIP-2/CXCL2 および IL-1 発現は、ET-1 により大きく変化はしなかった。以上の結果は、TBI による脳内 MCP-1/CCL2 および GRO- $\beta$ /CXCL1 の増加は、MCP-1/CCL2 および GRO- $\beta$ /CXCL1 アストログリアの ETB 受容体を介して生じることを示唆する。

Na/K/Cl 共輸送体(NKCC1)は、アストログリアに多く発現し、脳傷害時の発現増加が脳浮腫発生の一因となる。ET<sub>B</sub> 受容体を介した脳浮腫惹起の機構を明らかにするため、培養アストログリアおよびマウス TBI モデルでの NKCC1 発現に対する ET-1 の作用を検討した。ET-1 は、培養アストログリアでの NKCC1 発現を増加させた。この ET-1 の作用は、BQ788 により減弱した。マウス大脳への FPI は、傷害 2 日後での NKCC1 発現を増加させたが、この増加は BQ788 により減弱した。この ET<sub>B</sub> 受容体刺激によるアストログリアでの NKCC1 発現増加の機序について低酸素誘導因子 $\alpha$ (HIF1 $\alpha$ )の関与を検討した。培養アストログリアで ET-1 は HIF1 $\alpha$ の発現を増加させた。また、マウス大脳への FPI による HIF1 $\alpha$ 発現増加は、BQ788 により減弱した。培養アストログリアでの NKCC1 発現に対する ET-1 の作用は、HIF 阻害薬 FM19G11 および siRNA による HIF1 $\alpha$ のノックダウンで減弱した。以上の結果は、アストログリアの ETB 受容体の刺激が HIF1 $\alpha$  活性化を介した NKCC1 発現増加により、TBI 時の脳浮腫を惹起していることを示す。

シクロオキシゲナーゼ-2(COX2)は、炎症惹起や白血球の脳内浸潤を促進する種々のプロスタノイドを産生する酵素である。培養アストログリアの ET-1 による処置は、COX2 の発現を増加させ、この作用は BQ788 で抑制された。マウス TBI モデルでは損傷後 1~5 日後に COX2 発現の増加が認められ、この増加は BQ788 投与で抑制された。これらの結果は、TBI 時におけるアストログリアの COX2 発現増加が ET<sub>B</sub> を介していることを示す。

ET<sub>B</sub> 受容体を介したアストログリアのケモカイン類および COX2 の発現増加について、TBI 時の神経炎症との関連を検討した。マウス大脳への FPI は、損傷部位へ浸潤する白血球(Ly6G および MPO 陽性細胞)数を増加させた。この TBI による白血球浸潤の増加は BQ788 により抑制された。この結果は、ET<sub>B</sub> 受容体を介した脳内ケモカインおよび COX2 の増加が、白血球の脳内浸潤に関わることを示す。

TBI 後の慢性的な神経炎症は、損傷を受けた神経系の再生を妨げる。最近の研究は、多くの炎症惹起因子の mRNA 発現を抑制的に調節する RNA 結合タンパクの存在を明らかにした。培養アストログリアにおいて ET-1 および ET<sub>B</sub> 受容体選択的的刺激薬 Ala-ET-1 は、RNA 結合タンパクのひとつである tristetraprolin(TTP)の発現を増加させた。一方、培養アストログリアでの他の RNA 結合タンパク(BRF1, BRF2, HuR, Zc3h12a, Rc3h1, Rc3h2)の発現は、ET-1 により大きく変化しなかった。マウス大脳への FPI は、傷害 2 日後の大脳で TTP の発現を増加させた。免疫組織化学的観察は、この TTP 発現が GFAP 陽性アストログリアで生じていることを示した。siRNA による培養アストロサイトの TTP のノックダウンは、細胞傷害時の MCP-1/CCL2、IL-6 および COX2 mRNA の発現を増強した。この結果は、ET によるアストログリアの TTP 発現増加は、炎症性因子の発現を抑制的に制御していることを示す。

以上、本研究の結果は、ET<sub>B</sub> 受容体の遮断が BBB の保護を介して TBI 急性期に生じる脳浮腫および炎症性細胞の脳内浸潤を抑止し得ることを示唆する。脳浮腫および神経炎症は TBI の神経損傷を増悪する要因であり、ET<sub>B</sub> 受容体拮抗薬の TBI 治療薬としての有効性が期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Izumi Yasuhiko, Tatsumoto Ai, Horiuchi Naoko, Arifuku Monami, Uegomori Momoko, Kume Toshiaki, Koyama Yutaka	4. 巻 149
2. 論文標題 TPNA10168, an Nrf-2 activator, attenuates inflammatory responses independently of Nrf2 in microglial BV-2 cells: Involvement of the extracellular-signal-regulated kinase pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 1~10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphs.2022.02.004	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 Michinaga Shotaro, Hishinuma Shigeru, Koyama Yutaka	4. 巻 12
2. 論文標題 Roles of Astrocytic Endothelin ETB Receptor in Traumatic Brain Injury	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 719~719
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells12050719	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 Michinaga Shotaro, Koyama Yutaka	4. 巻 22
2. 論文標題 Pathophysiological Responses and Roles of Astrocytes in Traumatic Brain Injury	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6418~6418
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22126418	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 Michinaga Shotaro, Hishinuma Shigeru, Koyama Yutaka	4. 巻 126
2. 論文標題 Roles of astrocytic sonic hedgehog production and its signal for regulation of the blood-brain barrier permeability	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Vitamins and Hormones	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/bs.vh.2024.04.006	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 Izumi Yasuhiko, Kataoka Harue, Takada-Takatori Yuki, Koyama Yutaka, Irie Kazuhiro, Akaike Akinori, Kume Toshiaki	4. 巻 46
2. 論文標題 Isolation and Purification of Harpagogenin as an Nrf2/ARE Activator from the Tubers of Chinese Artichoke ( <i>Stachys sieboldii</i> )	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1576 ~ 1582
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b23-00383	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 -

[学会発表] 計8件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Shotaro Michinaga, Hiroyuki Mizuguchi, Yasuhiro Ogawa, Shigeru Hishinuma, Yutaka Koyama
2. 発表標題 BQ788, a selective ETB receptor antagonist alleviates inflammatory reactions after traumatic brain injury in mice
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 泉 安彦、小林史佳、八巻耕也、久米利明、小山 豊
2. 発表標題 ミクログリアにおけるNrf2活性化薬TPNA10168による抗炎症性作用の機序
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 道永 昌太郎
2. 発表標題 アストロサイトの機能分子を標的とした脳損傷に対する創薬研究 (2023年日本薬学会奨励賞受賞講演)
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shotaro Michinaga, Hiroyuki Mizuguchi, Shigeru Hishinuma Yutaka Koyama
2. 発表標題 BQ788, an endothelin ETB receptor antagonist alleviates blood-brain barrier disruption and brain edema after traumatic brain injury
3. 学会等名 The Seventeenth International Conference on Endothelin (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 道永 昌太郎、水口 博之、菱沼 滋、小山 豊
2. 発表標題 アストロサイトの機能分子を標的とした頭部外傷に対する新規治療薬の開発
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 寺田夏実、中村はるか、伊藤恭介、泉 安彦、久米利明、小山 豊
2. 発表標題 Nrf-2活性化薬TPNA10168によるマウス培養アストロサイトでのグルタチオン生合成系分子の発現増加
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村はるか、寺田夏実、伊藤恭介、泉 安彦、久米利明、小山 豊
2. 発表標題 新規Nrf-2活性化薬TPNA10168によるマウス培養アストロサイトでのグルタチオン生合成系の亢進
3. 学会等名 第71回 日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 泉 安彦、武田紀彦、八巻耕也、久米利明、上田昌史、小山 豊
2. 発表標題 抗酸化ストレス応答転写因子Nrf2の活性化物質探索と作用解析
3. 学会等名 日本薬学会 第144年会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Shotaro Michinaga, Yutaka Koyama	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 594
3. 書名 Cellular, Molecular, Physiological, and Behavioral Aspects of Traumatic Brain Injury (Rajendram et al. ed) 1st Edition, Chapter 18	

〔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	泉 安彦  (Izumi Yasuhiko)  (60456837)	神戸薬科大学・薬学部・講師   (34512)	
研究分担者	道永 昌太郎  (Michinaga Shotaro)  (60624054)	明治薬科大学・薬学部・講師   (32684)	

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