

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 27 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591594

研究課題名（和文） プロスタグランジン D2 制御による虚血性脳損傷治療法の開発

研究課題名（英文） Development of the new treatment of ischemic brain injury by regulating prostaglandin D2 synthesis

研究代表者

間瀬 光人（MASE MITSUHIITO）

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：60238920

研究成果の概要（和文）：

霊長類虚血性脳損傷モデルを用い、プロスタグランジン D2 合成阻害剤の安全性と治療効果について検討した。その結果、副作用はなく、薬剤の安全性が確認された。再灌流後亜急性期（day 3）における脳浮腫軽減が薬剤投与群で見られた。また薬剤投与群で梗塞体積が 6689mm³（ミリ立法メートル）でも生存した動物を 1 匹認めた（通常梗塞体積が 5000mm³ 以上では動物は死亡する）。以上の結果より薬剤の治療効果の可能性が示唆されたが、梗塞体積の減少、耐虚血体積の増加、高次脳機能の改善などの点については、両群間に統計学的有意差を認めるまでには至らなかった。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study is to clarify the efficacy of prostaglandin D2 synthase (PGDS) inhibitor on cerebral ischemia. We developed cerebral ischemia and reperfusion injury model using Cynomolgus monkeys. Ischemia was produced by a placement of a micro-catheter in the M1 portion of middle cerebral artery (MCA) for 3 hours, and reperfusion was made by withdrawal of the catheter. In this model, constant cerebral infarction in the MCA area was found. Usually, the animal died by cerebral herniation when infarct volume was more than 5000 mm³. In the treatment group, PGDS inhibitor (HQL79) was administer by oral one day before the ischemic insult. For one month monitoring, there was no side effect of this drug on the systemic condition and blood examinations of the animals. Brain edema after reperfusion (day 3) was tended to be reduced in the treatment group. One animal with 6689m³ of infarction volume survived. These results suggest that (PGDS) inhibitor may have a possibility to reduce ischemic brain injury. Further study will be needed to confirm this possibility.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2012年度	200,000	60,000	260,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学，脳神経外科学

キーワード：脳梗塞，プロスタグランジン D2 合成酵素阻害剤，霊長類モデル，高次脳機能

1. 研究開始当初の背景

現在，脳梗塞の急性期治療は血流再開療法と脳保護療法に大きく分けられる．血流再開療法は t-PA 静注による血栓溶解療法が導入され解決されたかに見えたが，その適応症例は全脳梗塞の数%に過ぎず，依然脳梗塞治療の中心は虚血周囲組織（ペナンプラ）を少しでも多く生存させるための血流維持および脳保護療法である．その際問題となるのが脳虚血後に二次的に引き起こされる炎症性反応をはじめとする種々の組織障害カスケードであり，その制御は脳梗塞後遺症の重症度や社会復帰を含めた予後を左右する．しかしながら虚血後二次性細胞障害を抑制し，ヒトで有効性が認められた薬剤はほとんどない．PGD2はアレルギーや炎症反応時に活発に産生される脂質メディエーターである．PGD 合成酵素は，造血器型(H-PGDS)とリポカリン型 (L-PGDS) の 2 種類が同定され，アレルギーや炎症反応時に産生される PGD2 は，肥満細胞や Th2 細胞に発現する H-PGDS によって触媒され，2 種類の PGD 受容体 (DP1 と DP2) を介して局所への炎症細胞の遊走、平滑筋収縮や血管透過性昂進など様々な作用を示す．一方、中枢神経系では、くも膜やオリゴデンドログリアに発現する L-PGDS によって産生された PGD2 が DP1 受容体を介して睡眠や体温の調節に関わることが明らかにされている。

申請者らは中枢における PGD2 の機能を調べて行く過程で、外傷性脳損傷部、遺伝性や自己免疫性の脱髄周囲 (J. Neurosci. 22:4885, 2002) や、多発性硬化症患者の脱髄周囲やアルツハイマー型痴呆症患者の老人斑周囲 (J Neuropathol Exp Neurol. 66:469, 2007) などで、H-PGDS と L-PGDS および DP1 受容体の mRNA の発現が亢進することを発見した。さらにマウスを用いて外傷性

脳損傷モデル(stab wound)実験を行ったところ、損傷後の脳内で正常時の数百～千倍の過剰な PGD2 が一過的に産生され、損傷領域は傷害後 2 日をピークとして拡大することが判明した。そこで、造血器型 PGD 合成酵素 (H-PGDS) の大量発現トランスジェニック (TG)マウスおよび遺伝子欠損 (KO) マウスを作製して、外傷性脳損傷モデル実験に用いたところ、ヒト H-PGDS 大量発現 TG マウスでは野生型マウスに比べて損傷領域が拡大し、逆に、H-PGDS KO マウスでは損傷領域が縮小した。さらに、H-PGDS 阻害薬 (HQL-79) や DP 受容体拮抗薬の投与は、野生型マウスの損傷領域の拡大を抑制した。これらの結果は、損傷後に H-PGDS の触媒反応によって過剰に産生される PGD2 が DP 受容体を介して、損傷領域を拡大させていることを示すとともに、PGD2 の産生抑制により組織保護効果が認められたと考えられる。虚血性脳損傷においても局所で PGD2 が過剰に産生されて、二次的な組織損傷の拡大を亢進させていることが明らかになっており (Neurosci 145:520, 2007), PGD2 合成阻害剤の投与は神経保護的に作用する可能性が高いと考えられる。

ヒトへの応用を考えた場合、霊長類を用いた臨床に近い脳梗塞モデルと評価系が是非とも必要である。我々は臨床で使用されている脳血管内手術の技術を用い極めて低侵襲な再現性のある中大脳動脈閉塞再灌流モデルを開発し、その評価系 (MRI による脳損傷範囲の定量的経時的評価、空間記憶機能検査を含む高次脳機能評価) を既に確立した。

さらに申請者らは PGD 合成酵素蛋白質の 3 次元構造座標に基づいて阻害薬の分子設計も行い、既に経口投与で有効な選択的かつ強力な阻害薬を開発済みであり、その安全性もげっ歯類とイヌを用いた長期毒性試験で確

認済みである。

PGD2 そのものは脳内に大量に存在するPGで種々の病態に関与が示唆されてきたが、最近まで特異的な合成酵素阻害剤や受容体阻害剤がなかったために脳損傷に対する治療としては、それ以上研究が進まなかった。申請者らはこれまで10年以上にわたりPGD2に関する研究を継続し、H-PGDSとL-PGDSの遺伝子クローニング、組換え型蛋白質のX線結晶構造解析、3次元構造座標に基づく阻害薬の分子設計、遺伝子操作マウスの作製と機能解析を行ってきた。そして経口投与で有効なH-PGDSとL-PGDSの阻害剤(HQL79とAT56)を開発するに至った。我々の最終的な目標はこれらの阻害薬を既存の治療法と併用あるいは代替できる新しい組織損傷の拡大防止薬として脳梗塞治療に応用することである。

2. 研究の目的

本研究では組織損傷の拡大に関与するPGD2の産生を阻害する医薬組成物の有効性と安全性を霊長類の虚血性脳組織損傷モデルを用いて評価することである。

3. 研究の方法

カニクイザルを用い全身麻酔・調節呼吸下に、脳血管内手術用マイクロカテーテルを中大脳動脈M1-2部に留置して血流遮断することにより脳虚血を作成し(3時間)、カテーテルを引き抜くことにより再灌流(血流再開)した(中大脳動脈閉塞再灌流モデル)。動物を治療群(PGD2合成阻害剤投与:HQL-79)とコントロール群(プラセボ投与)群にブラインドに2群に分けた(各群n=3)。薬剤投与は脳虚血作成前日から毎日経口で行った。PGD2合成阻害剤(HQL-79)の虚血性脳損傷軽減効果について、MRIを用いた脳損傷範囲(梗塞巣, 脳浮腫, 脳出血)の定量的同定を行った。また行動解析としては運動機能検査であるアップルテスト(左右どちらかのポケットに入ったリンゴをすばやく取り出す)を行い、左右運動機能を観察した。高次脳機能解析と

しては空間記憶課題である食物回収試験(全部で9つの穴にそれぞれリンゴを入れ、不透明な蓋をする。ふたを開けてリンゴを取り出させるが、一度開けた蓋を再度開けることなく、できる限り多くのリンゴを取る: J Comp Psychol, 120:449-55, 2006)を行い、空間記憶を観察した。

4. 研究成果

MRI上虚血(脳梗塞)の広がりにばらつきがあったが、再現性のあるモデルを作成することができた。本モデルでは梗塞体積によって予後が大きく変わることが明らかとなっており。すなわちMRIで急性期虚血体積が5000mm³(ミリ立法メートル)を上回った場合は、通常脳ヘルニアを来して通常死亡する。キーオープンして薬剤投与群とコントロール群を比較した。観察した1ヶ月間については副作用を疑わせるような異常所見はなく、薬剤の安全性は確認された。MRI上、再灌流後亜急性期(day 3)における脳浮腫軽減が薬剤投与群の一部のケースで見られた。また6689mm³の梗塞体積があっても生存した動物を1匹認めたが、この動物は薬剤投与群であった。以上の結果より薬剤の治療効果の可能性が示唆されたが、梗塞体積の減少、耐虚血体積の増加、高次脳機能の改善などの点については、両群間に統計学的有意差を認めるまでには至らなかった。

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0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

間瀬 光人 (MASE MITSUHIITO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号: 60238920

(2)研究分担者

有竹 浩介 (ARITAKE KOSUKE)

(財)大阪バイオサイエンス研究所・分子
行動生物学部門・研究員

研究者番号：70390804

(3)連携研究者

山田 和雄 (YAMADA KAZUO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：90150341

(4)連携研究者

裏出 良博 (URADE YOSHIHIRO)

(財)大阪バイオサイエンス研究所・分子
行動生物学部門・研究部長

研究者番号：10201360