

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590117

研究課題名(和文)新規脳保護薬の探索とその保護メカニズム

研究課題名(英文)An exploratory research of new cerebroprotective agents

研究代表者

石毛 久美子(Ishige, Kumiko)

日本大学・薬学部・教授

研究者番号：40212873

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：我が国で患者数が150万人以上とされる脳血管疾患は、麻痺や認知障害などの重篤な後遺症を伴うことも多く要介護状態に陥る原因の第1位で、治療の際は後遺症の軽減も重要となる。本疾患の6割以上を占める虚血性疾患(脳梗塞等)では、治療に不可欠な血流再開時にも再灌流障害が誘発されこれが後遺症にも関与する。これに対し、エダラボンによる保護療法が行われるが、無効例や副作用例もあり新たな脳保護薬が望まれている。そこで、本研究では新規脳保護薬の開発を目指した。最大の成果は、新たに合成した化合物中にエダラボンよりも強い保護物質を複数見出し脳保護薬またはそのリード化合物として有用であることを明かにしたことである。

研究成果の概要(英文)：It is estimated that there are 1,500,000 patients with cerebrovascular disease (CVD) and that cerebral ischemia (stroke) is responsible for more than 60% of CVD in Japan. Recent data also shows that the mortality rate due to CVD is decreasing, however number of patients do not decrease, and therapeutic options is still limited. Reactive oxygen species and other free radicals generated during cerebral ischemia/reperfusion are critical mediators of neuronal cell damage. Edaravone, a radical scavenger, has been shown to be effective for stroke patients and is clinically used in Japan. However, adoption of edaravone is limited because of side effects, such as renal toxicity. Aim to develop of new therapeutic agents for ischemia/reperfusion injury, new cerebroprotective agents were explored in newly synthetic GR103691 derivatives. The most important results in this study is finding of some useful compounds for the injury and these compounds were more effective than edaravone.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：脳虚血 再灌流障害 GR103691

## 1. 研究開始当初の背景

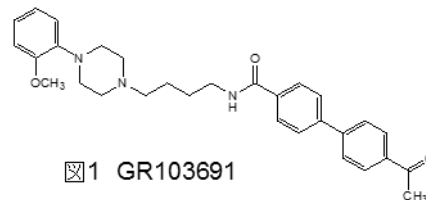
脳梗塞や頭蓋内出血を含む脳血管疾患は、以前、我が国における死亡原因の第1位であったが、急性期の治療法の進歩などにより、死亡率は徐々に低下し、悪性新生物、心臓疾患について第3位となっていた。しかし、患者数が減少したわけではなく、入院、通院中の患者をあわせると150万人以上になると推定され、さらに増加しつつあると考えられていた。また、麻痺、言語障害、認知機能障害などの重篤な後遺症に苦しむ患者も多く、寝たきりを含めて要介護状態に陥る原因疾患の第1位で、全体の3割以上を占めていた。超高齢化社会を迎える我が国においては、脳血管疾患の発症率は、さらに増加すること、およびそれに伴って、後遺症に苦しむ患者数も増加することが予想された。したがって、脳血管障害治療においては、救命率のさらなる上昇とともに、命を救われた患者の後遺症をいかに軽減するかが重要なポイントになると考えられた。

脳血管疾患は、近年、脳梗塞の割合が増加し、全体の6割以上を占めている。脳梗塞のような虚血性疾患の治療において、血流の再開は不可欠であるが、この血流再開により、活性酸素種 (ROS) が急激に増加し、これにより障害が助長されること、すなわち、再灌流障害を誘発することが明らかにされ、このことが、少なからず、後遺症にも関与すると考えられていた。我が国では、脳梗塞の急性期治療としてラジカルスカベンジャーのエダラボン投与による脳神経保護療法が行われており、これが後遺症の軽減にも寄与しているものと考えられる。エダラボンは、現在、脳神経保護療法に用いられる唯一の薬物で、いくつかの実験系において、実際にROSを消去することも明らかにされているが、副作用も多く、そのために使用できない患者もいる。また、使用しても無効であった症例も報告されている。したがって、後遺症に苦しむ患者を1人でも少なくするために、新たな脳保護薬の開発が必要となっている。

## 2. 研究の目的

本申請課題開始時点までに、申請者は、両総頸動脈結紮後再灌流した前脳虚血マウスを脳梗塞の *in vivo* モデルとして、脳内の障害について検討し、行動薬理的には虚血を負荷していないマウスと同様に回復するにもかかわらず、海馬、特に CA1 領域において、強い障害が部位特異的に認められること、および、その障害誘発に小胞体ストレスが関与していることを明らかにした。また、Apolipoprotein E (ApoE) を欠損させ脂質代謝異常をきたした ApoE 欠損マウスは、そのコントロールマウスより、前脳虚血障害に

脆弱であること、およびその脆弱性にも小胞体ストレスが密接に関連する可能性を示してきた。一方、虚血再灌流障害の *in vitro* モデルとして、マウス海馬神経細胞由来の HT22 細胞において、低酸素後、再酸素化することにより細胞死を誘発した、再酸素化初期に細胞死に先立って細胞内 ROS が上昇すること、およびミトコンドリアの膜電位が低下することを見出した。次に、この HT22 細胞における低酸素再酸素化誘発細胞死に対する保護因子の探索を開始し、申請者が、以前に、グルタミン酸による酸化的ストレス誘発細胞死を抑制することを明らかにした薬物であるアポモルヒネが細胞死を抑制することを見出した。アポモルヒネは、ROS の上昇およびミトコンドリアの膜電位低下も抑制した。また、ドパミン D3 受容体のアンタゴニストとして市販されている GR103691 (構造式は図1) が、HT22 細胞において、受容体への作用とは無関係に低酸素再酸素化細胞死を抑制することを明らかにした。GR103691 は、前脳虚血マウスにおいても細胞死保護作用を示すことが明らかになり、GR103691 が新たな脳虚血再灌流障害の保護薬となる可能性が推察された。しかしながら、GR103691 の細胞死保護メカニズムは不明であった。また、構造類似体等の関連化合物の中により強い保護作用を持つ化合物が存在する可能性も考えられ、検討課題も多く残されている状況であった。



そこで、本申請課題においては、すでに細胞死保護作用を見出した GR103691 を出発化合物として構造が類似した化合物を合成し、脳虚血再灌流障害の *in vitro* モデルおよび *in vivo* モデルにおいて、より有効な治療薬候補物質を探索することを第一の目的とした。また、見いだされた化合物について細胞死保護メカニズムを検討することも目的とした。

## 3. 研究の方法

### 使用細胞

マウス海馬神経細胞由来の HT22 細胞を用いた。HT22 細胞は、10%ウシ胎児血清を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 中、CO<sub>2</sub> インキュベータ内で培養した。

低酸素再酸素化 (H/R) および細胞死の評価  
低酸素負荷には脱酸素剤であるアネロパックケンキ®を用い、24 時間、低酸素を負荷した。その後、通常酸素状態に戻すことで再酸素化とした。

細胞死は、再酸素化 24 時間後、メディアウム中に漏出した LDH 活性を調べ、その程度を評価した。LDH 活性測定には、市販のキットを用い、キットの説明書に従って実施した。通常酸素状態下 (Normoxia) で、同じ時間培養した細胞をコントロールとした。なお、24 時間、低酸素処理した HT22 細胞とコントロール細胞を比較すると、低酸素処理により、細胞密度は低下傾向が認められるが、LDH 活性の上昇は認められない。すなわち、24 時間の低酸素処理によっては、細胞死には至らないことを確認している。

#### 細胞内 ROS の測定

所定の処置後の細胞に H2DCFDA (DCF) および Propidium iodide (PI) を処置し、フローサイトメトリー法により、両者の蛍光強度を評価した。

#### 各種タンパク質の発現

各処置後の細胞から細胞抽出液を調製し、それをサンプルとして Western blot を行い、目的タンパク質を検出した。

#### GR103691 関連化合物

GR103691 関連化合物は、本学有機化学研究室より合成・供給された。化合物は、本申請課題が採択された際に、申請者から有機化学研究室内の宮入教授に経過を説明し、構造活性相関等を考慮して合成する化合物をデザインしていただいた。なお、合成された化合物についてはその後の SciFinder での検索により、一部が物質として新規であることが明らかになっている。

#### 統計学的処理法

グラフの値は、すべて、平均値±標準誤差で示した。有意差検定は one-way ANOVA で行い、post hoc に Turkey's test を用いた。

### 4 . 研究成果

#### H/R 誘発細胞死および GR103691 とエダラボンによる細胞死抑制

低酸素 24 時間処置に引き続いて、再酸素化を 24 時間行った HT22 細胞のメディアウム中の LDH 活性は、これまでの結果に一致して、顕著な上昇が認められた。低酸素負荷直前に、現在、臨床適用されているエダラボンまたは GR103691 を添加すると、それぞれ、LDH 活性の上昇を濃度依存的に抑制し、ともに 30μM でほぼ完全に抑制した (図 1)。ま

た、GR103691 は、0.1μM で、すでに、有意な抑制作用が認められており、エダラボンより低濃度から、徐々に細胞死を抑制すると考えられた。なお、両薬物は、通常酸素状態下で培養した細胞には影響を及ぼさなかった。

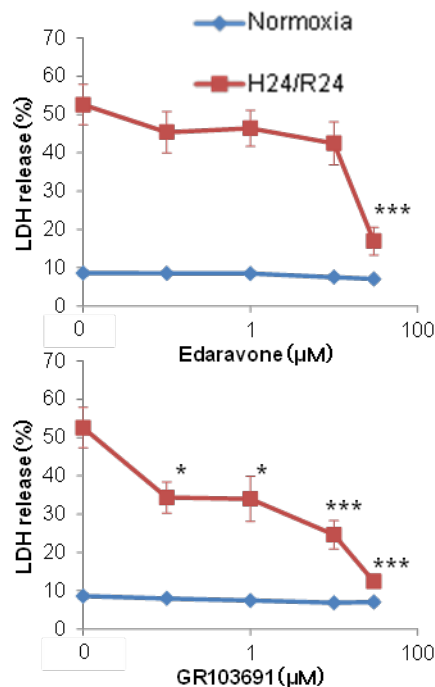


図2 HT22細胞におけるエダラボンおよび GR103691の低酸素再酸素化細胞死抑制作用: 低酸素負荷(H)直前にEDAおよびGRをそれぞれ添加し、24時間後に再酸素化(R)し、その24時間にLDH assayを行った。グラフの値は、通常酸素状態下(Normoxia)で培養し Tween20を処置した細胞のLDH遊離量を100%とし、平均値±標準誤差で示した。n=3~6, \*p<0.05, \*\*\*p<0.001 vs. 0 μM.

#### H/R 誘発細胞死に対する GR103691 関連化合物の保護作用

次に、合成された GR103691 関連化合物の保護作用を検討した。合成された GR103691 関連化合物のうち、溶解度等の観点から、数種の化合物を除外し、36 個の化合物 (構造式は省略) を用いた。まず、36 種すべての薬物について 1~100 μM の濃度範囲で低酸素負荷直前に添加して保護作用の濃度反応曲線を描き、50% 阻害濃度 (IC50) を推定し、その濃度から 4 つグループ (IC50 が :10 μM 未満、:10~30 μM、:30 μM~100 μM、:100 μM 以上) に大別した。には、16 種の化合物が該当し、それらのすべてが、10 μM で H/R による LDH 遊離量の増加を強く抑制した。このように最大の保護効果は、エダラボンより、低濃度で認められる化合物群である。しかし、これらのうち、一部の化合物は、100μM に

なると細胞死を誘発する傾向が認められるようになっており、これらは、保護薬としては難点となるかもしれない。 には、6種の化合物が該当し、10  $\mu\text{M}$  で H/R による LDH 遊離量の増加をある程度抑制し、100  $\mu\text{M}$  で強い抑制作用を示した。 には7種の化合物が該当し、10  $\mu\text{M}$  では H/R による LDH 遊離量の増加をほとんど抑制しないが、100  $\mu\text{M}$  では明らかな抑制作用を示す化合物である。 に該当する7種は、100  $\mu\text{M}$  でも H/R による LDH 活性の上昇をほとんど抑制しなかった化合物であり、細胞死抑制効果はないと考えられた。

に該当する2種の化合物については、低酸素負荷直前ではなく、再酸素直後に添加しても保護作用が認められることが確認されたことから、治療薬になる可能性が高まったと考えられた。

#### 構造が類似する GR103691 関連化合物の保護作用

合成された GR103691 関連化合物の中には構造が類似する化合物があったため、それらの保護作用の強度(濃度)を比較検討した。以下にその代表例として、右側の側鎖のベンゼン環の数が異なる化合物の LDH アッセイの結果を示す(図3)。

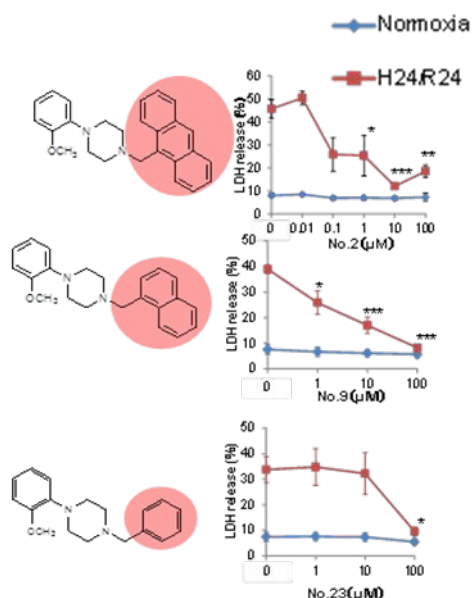


図3 側鎖のベンゼン環が異なる化合物の保護作用の比較:側鎖のベンゼン環の数に注目し、保護作用を比較した。グラフの各値は、NormoxiaにTween20を処置した群のLDH遊離量を100%とし、平均値±標準誤差で示した。n=3~6, \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 vs. 0  $\mu\text{M}$

図3から明らかなように、これらの3化合物を比較すると、ベンゼン環の数が多くなると保護作用が強くなる(低濃度から保護作用

を示す)傾向を示している。また、データには示さないが、最も作用の強い化合物の右の側鎖である Anthracene と側鎖を除いた構造を持つ化合物には保護作用が認められなかった。以上より、これらの保護作用には、ベンゼン環の側鎖が必要なことが明らかとなった。また、保護作用を持つ3種の化合物の Log. P 値の違いから、保護作用の強さには、少なくとも一部、細胞内への移行しやすさが関与していることが推察された。

#### 再酸素化後の細胞内 ROS の上昇と GR103691 による抑制

Flow cytometry 法により、DCF による細胞内活性酸素種 (ROS) 評価系を確立後、細胞内 ROS 上昇に及ぼす GR103691 の影響を EDA と比較検討した。その結果、低酸素24時間後、再酸素化3~4.5時間の細胞において、DCF の蛍光強度の上昇が認められた。この時、PI の蛍光強度に変化は認められなかったことから、細胞死に先立って ROS が上昇することが明らかとなった。GR 103691 およびエダラポンは、この上昇を顕著に抑制した。また、申請者のこれまでの検討から、HT22 細胞においては H/R 誘発細胞死とメカニズムに共通点が多いと考えられるグルタミン酸誘発細胞死においても、5mM) 曝露により、曝露6時間後に PI 蛍光強度には変化が認められないが、DCF 蛍光強度が上昇することが明らかとなった。H/R に比較し、グルタミン酸曝露の実験系は、低酸素処置が不要なため、短時間で検討できるため、検討の対象となる多くの薬物の ROS の上昇に及ぼす影響は、まず、グルタミン酸曝露細胞において観察するほうが効率的であると考え、グルタミン酸誘発細胞死を抑制する GR103691 (10  $\mu\text{M}$ ) およびエダラポン (30 $\mu\text{M}$ ) の影響を調べたところ、グルタミン酸6時間後における DCF の蛍光強度上昇も両薬物によってともに抑制されることが明らかとなった。

#### 細胞死誘発に關与する細胞内情報伝達系の変化

細胞死に關与する細胞内情報伝達系を詳細に調べる目的で本心聖火台においては、Apoptosis Signal-regulating Kinase (ASK)1 や Nfr2 とそれらの関連因子の動態を中心に検討した。これら因子の Western blot 法による検出の至適条件を確立し、H/R の影響を調べたが、現在まで、顕著な影響は認められていない。今後、時間依存性など詳細な検討を追加し、結論を導きたいと考えている。

#### まとめ

本研究課題の最も大きな成果は、

GR103691 を出発物質として合成した化合物中に新規化合物が含まれていたこと、さらにそれらの中にエダラボンよりも強い神経細胞死保護物質を複数見だし、脳保護薬またはそのリード化合物として有用であることを明かにしたことである。一方で、詳細なメカニズムの検討や副作用の予見など、今後さらなる検討を重ねていかなければならないことは言うまでもない。本検討結果が新規治療薬の開発に貢献できるように今後も検討を続けていきたいと考えている。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計9件)

Imai T, Kosuge Y, Endo-Umeda K, Miyagishi H, Ishige K, Makishima M, Ito Y. : Protective effect of S-allyl-L-cysteine against endoplasmic reticulum stress-induced neuronal death is mediated by inhibition of calpain. *Amino Acids*, 46, 385-395 (2014) 査読有

Ishige K, Osada N, Kosuge Y, Ito Y. : Involvement of endoplasmic reticulum stress in neurodegeneration after transient global ischemia-reperfusion. *Nihon Yakurigaku Zasshi*, 142, 9-12 (2013) 査読無

Osada N, Kosuge Y, Ishige K, Ito Y. : Mithramycin, an agent for developing new therapeutic drugs. *J Pharmacol Sci.*, 122, 251-256 (2013) 査読有

Miyagishi H, Ishige K, Kusama-Eguchi K, Ito Y. et al. : Prostaglandin E2-induced cell death is mediated by activation of EP2 receptors in motor neuron-like NSC-34 cells. *J Pharmacol Sci.*, 121, 347-350 (2013) 査読有

Miyagishi H, Kosuge Y, Ishige K, Ito Y. : Expression of microsomal prostaglandin E synthase-1 in the spinal cord in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Pharmacol Sci.*, 118, 225-236 (2012) 査読有

Osada N, Kosuge Y, Oguchi S, Miyagishi H, Ishige K, Ito Y. : Protective action of mithramycin against neurodegeneration and impairment of synaptic plasticity in the hippocampal CA1 area after transient global ischemia. *Neurochem Int.*, 60, 47-54 (2012) 査読有

Shimba S, Ishige K, et al. : Deficient of a clock gene, brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1), induces dyslipidemia and ectopic fat formation.

*PLoS One*, 6, e25231 (2011) 査読有

Kasai A, Ishige K, et al. : Apelin deficiency accelerates the progression of amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* 6, e23968 (2011) 査読有

Kosuge Y, Taniguchi Y, Imai T, Ishige K, Ito Y. : Neuroprotective effect of mithramycin against endoplasmic reticulum stress-induced neurotoxicity in organotypic hippocampal slice cultures. *Neuropharmacology* 61, 252-261 (2011) 査読有

[学会発表](計12件)

石毛久美子、他4名：HT22細胞におけるGR103691およびその関連化合物の低酸素再酸素化誘発細胞死抑制効果、第23回日本臨床精神神経薬理学会・第43回日本新制精神薬理学会合同大会(2013年10月24日~25日・沖縄)

野口真依子、石毛久美子、他5名：GR関連化合物の低酸素再酸素化誘発細胞死抑制効果、日本薬学会第133年会(2013年3月28日・横浜)

石毛久美子、他3名：The involvement of endoplasmic reticulum stress in neurodegeneration after transient global ischemia-reperfusion、第86回日本薬理学会年会(2013年3月21日・福岡)

小菅康弘、石毛久美子、他3名：運動ニューロン様株化細胞NSC-34におけるprostaglandin E2誘発細胞死にはEP2受容体の活性化が関与する、第86回日本薬理学会年会(2013年3月21日・福岡)

長田暢弘、石毛久美子、他3名：脳虚血・再灌流後の海馬CA1領域の神経細胞死及び長期増強現象低下に対するMithramycinの保護効果、第85回日本薬理学会年会(2012年3月14日・京都)

大石汐理、石毛久美子、他2名：HT22細胞におけるBmal1の誘導に及ぼすホルスコリンおよびアミロイドβタンパク質の影響、第125回日本薬理学会関東部会(2011年10月15日・船橋)

池口麻衣子、石毛久美子、他2名：老齢マウスの脳内メラトニンについて、第125回日本薬理学会関東部会(2011年10月15日・船橋)

小菅康弘、石毛久美子、他3名：高グルコース刺激がヒト神経芽腫細胞の神経突起の伸展に及ぼす影響、第55回日本薬学会関東支部大会(2011年10月8日・船橋)

小菅康弘、石毛久美子、他1名：Therapeutic potential of Mithramycin, one of the chemotherapy drug, in brain

ischemia、The 54th Annual Meeting of Japanese Society for Neurochemistry (2011年9月26日・金沢)

石毛久美子、他2名：GR103691の抗酸化物質としての可能性、第31回日本歯科薬物療法学会(2011年6月25日・千葉)

小菅康弘、石毛久美子、他4名：抗腫瘍性抗生物質 Mithramycin の神経保護効果について、第31回日本歯科薬物療法学会(2011年6月25日・千葉)

長田暢弘、石毛久美子、他4名：マウス脳虚血・再灌流モデルにおける Mithramycin の海馬神経細胞保護効果、第124回日本薬理学会関東部会(2011年6月4日・東京)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：アポトーシス抑制剤

発明者：石毛久美子、伊藤芳久、宮入伸一、齋藤弘明、小菅康弘

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2012-278397

出願年月日：2012年12月20日

国内外の別：国内

○取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

石毛 久美子 (ISHIGE, Kumiko)

日本大学・薬学部・教授

研究者番号：40212873

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし