

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890225

研究課題名(和文) レドックス制御に基づいた脳循環調節機構の解明とその治療応用

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of cerebral blood flow based on redox regulation

研究代表者

倉内 祐樹 (Kurauchi, Yuki)

熊本大学・大学院先端機構・助教

研究者番号：70631638

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、脳循環調節機構をレドックス制御という観点から解明し脳循環障害を改善する候補薬物を探索する事を目的とし、以下の事を明らかにした。1) 脳循環障害時に認められる皮質各延性抑制(Cortical spreading depression; CSD)を改善する薬物の探索を行い、L-シトルリンがNOシグナルを介してCSDを改善する事を見出した。2) N-methyl-D-aspartate (NMDA) による局所脳血流量の異常な増大や神経傷害にMEK/ERKシグナルの活性化や calcineurin/NFATシグナルの活性化が関与する事を明らかにし、創薬ターゲットとしての可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to elucidate the mechanism of cerebral blood flow (CBF) based on redox regulation and search for the candidate medicine which improves CBF. In this study, the following was clarified.1) L-Citrulline improved the decrease in CBF during cortical spreading depression (CSD) via activation of nitric oxide (NO) signaling pathway.2) Activation of both MEK/ERK signaling pathway and calcineurin/NFAT signaling pathway contributes to the unusual increase in CBF and neuronal cell death induced by N-methyl-D-aspartate (NMDA).

研究分野：薬理学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：レドックス 脳循環

## 1. 研究開始当初の背景

脳循環の異常は、非常に致死率の高い脳梗塞や脳出血の発症をはじめ、生活の質を著しく低下させる片頭痛、更には神経変性疾患に至るまで非常に多くの疾患の発症に關与する。加えて、糖尿病や高血圧といったリスクファクター保持者も増加し続けており、超高齢化社会を迎えた現代社会において脳循環の異常によってもたらされる疾患の罹患者数は増加し続けると予想されるが、有効な予防法あるいは治療法は確立されていない。

脳循環障害の病態は非常に複雑であるが、非常に興味深い事に、多くの脳循環障害時には共通して皮質拡延性抑制 (cortical spreading depression; CSD) という脳微小循環変化のプロセスが出現する事が報告されている。さらに、CSD の過程ではレドックスシグナル関連分子である一酸化窒素 (nitric oxide; NO) が過剰に産生される事、CSD 誘発時にはグリア細胞が活性化し、脳組織の炎症応答が亢進する事なども報告されているが、脳循環障害発症の詳細な機序やレドックス応答の關与は明らかではない。

## 2. 研究の目的

本研究では、脳循環障害時に共通して認められる脳微小循環変化のプロセスである CSD に関わる分子基盤について、レドックスシグナル関連分子の制御を中心に解析し、さらに CSD のみならず、局所脳血流量の増大に伴う神経回路傷害発症機序についても解析し、脳循環障害の有効な予防および治療戦略を構築することを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究は、レーザードップラー血流計を用い、成体ラットの脳血流量を測定する *in vivo* 系により遂行した。

### (1) KCl による皮質各延性抑制の誘導

麻酔下の成体ラットを脳定位固定装置に固定し、片側頭蓋骨の 2 カ所に穴をあけた。片方の穴から大脳皮質表面に塩化カリウム (KCl) を処置することで CSD を誘発し、脳血流量の変化は、もう一方の穴に設置したレーザードップラープローブを用いて 1 時間測定した。評価薬物等は脳局所に投与あるいは、大腿静脈から全身性に投与し、同時に大腿静脈から全身血圧と心拍数を測定した。

### (2) NMDA による局所脳血流量の増大

麻酔下の成体ラットを脳定位固定装置に固定し、片側頭蓋骨の 1 カ所 (大脳皮質一次視覚野領域) に穴をあけた。さらに、Bregma より後方に 7.0 mm、側方に 3.0 mm、深さ 2.0 mm の位置に針を刺し、N-methyl-D-aspartate (NMDA) を 0.1  $\mu$ l/min の速度で 5 分間微量注入すると同時に、レーザードップラープローブを用いて 30 分間の脳血流量変化を測定した。また、評価薬物等は NMDA 投与の 1 時

間前に側脳室内に投与あるいは、腹腔内へ投与した。

一部の試験では、薬物投与後にラット全脳を摘出して凍結冠状切片を作製し、免疫組織化学により神経細胞およびミクログリアを含むグリア細胞を同定した。

## 4. 研究成果

### (1) CSD による脳血流量減少に対する L-シトルリンの影響

L-シトルリンはスイカ等の食品中に非常に多く含まれるアミノ酸である。L-シトルリンは NO の産生を亢進することが知られているため、CSD に伴う脳血流量の減少を L-シトルリンが改善するか検討した。

Vehicle 処置群のラットでは、KCl の処置により一過性の脳血流量増大と、それに続く持続的な脳血流量の減少が起こり、CSD の誘発が認められた。一方、L-シトルリン (0.3、1、3、10 mg/kg) を大腿静脈より投与した群では、KCl による一過性の脳血流量増大に影響することなく、持続的な脳血流量減少を有意に抑制した。また、L-シトルリンはラットの全身血圧および心拍数等にも影響しなかった。さらに、L-シトルリンの効果は、NO 合成酵素阻害薬である L-NAME (30 mg/kg) あるいは、シクロオキシゲナーゼ阻害薬である Indomethacin (5 mg/kg) の前処置により有意に抑制された。

以上の結果から、L-シトルリンは NO やプロスタグランジンの産生を介して、CSD で認められる持続的な脳血流量の減少を抑制し、脳血流量の恒常性を維持することが示唆された。

### (2) CSD 伝播速度に対する NO の影響

CSD は局所神経活動および脳血流量の変化が脳半球全体に伝播する、脳微小循環変化のプロセスである。L-シトルリンが CSD に伴う脳血流量の減少を有意に抑制したこと、その効果に NO 産生亢進が關与することを踏まえ、NO 放出試薬である NOR3 が CSD の伝播速度を抑制するか検討した。

Vehicle 処置群のラットでは、CSD の伝播速度は  $1.31 \pm 0.08$  mm/min であった。一方、NOR3 (0.3 および 1.0  $\mu$ g/kg/min) を処置した群の CSD 伝播速度はそれぞれ  $0.98 \pm 0.07$  および  $0.99 \pm 0.08$  mm/min であり、NOR3 が KCl による CSD の伝播速度を有意に低下させたが、全身血圧や心拍数には影響を与えなかった。さらに、可溶性グアニル酸シクラーゼ (soluble guanylyl cyclase; sGC) 阻害薬である ODQ (2 mg/kg) を前処置すると、NOR3 による CSD 伝播速度の低下が認められなかったことから、NO/cyclic GMP シグナルの活性化が CSD 伝播速度の低下に關与することが示唆された。

### (3) NMDA 誘発生の局所脳血流量増大による視神経回路傷害機序の解析

脳血流量の調節や神経細胞の生存に関して、NMDA 型グルタミン酸受容体が重要な役割を担っている。NMDA 受容体の活性化により血管拡張や脳血流量が増大することや、神経細胞死が誘導されることは知られているが、NMDA による脳血流量増大と神経傷害の因果関係については明らかではない。そこで本研究では、NMDA をラット大脳皮質一次視覚野に微量注入した際の脳血流量増大と視神経回路傷害の詳細な機序について解析した。

NMDA (20, 100, 200 nmol) は投与量依存的に大脳皮質一次視覚野の局所脳血流量を増大させ、さらに投与 1 週間後の神経傷害およびミクログリアの活性化レベルを亢進させた。さらに、大脳皮質一次視覚野へ神経軸索を伸ばす細胞体が存在する領域である外側膝状体領域においてもミクログリアの活性化が認められた。さらに詳細な解析の結果、大脳皮質一次視覚野の神経傷害およびミクログリアの活性化は NMDA (100 nmol) 投与 1 日後から観察され始め、7 日後まで傷害が拡大し続けた。外側膝状体においては、NMDA 投与 3 日後からミクログリアの活性化が認められ、その活性化レベルは 7 日後まで増大し続けた。

さらに、NMDA 受容体遮断薬である MK-801 (1 mg/kg, i.p.) を NMDA 投与の 1 時間前に処置することで、NMDA による局所脳血流量の増大が有意に抑制され、同時に、大脳皮質一次視覚野領域の神経傷害およびミクログリアの活性化が抑制された。また、外側膝状体におけるミクログリアの活性化も抑制された。

以上の結果から、NMDA による局所脳血流量増大が大脳皮質一次視覚野領域の神経傷害およびミクログリアの活性化を誘導し、この変化が視神経回路に沿って外側膝状体に伝播する機序が存在することを明らかにした。

### (4) NMDA 誘発生の局所脳血流量増大機序の解析

NMDA 受容体の活性化により局所脳血流量が増大する機序を明らかにする目的で、諸種シグナル伝達系の阻害薬を用いて検討した。全ての阻害薬は、NMDA 投与の 1 時間前に腹腔内あるいは側脳室内に投与した。

NMDA 受容体遮断薬である MK-801 (1 mg/kg) の腹腔内投与および、D-AP5 (5, 20 nmol) の側脳室内投与が NMDA による大脳皮質一次視覚野領域の局所脳血流量増大を有意に抑制した。さらに、MEK1 阻害薬である PD98059 (5 nmol) が NMDA による局所脳血流量増大を有意に抑制した一方で、p38 MAPK 阻害薬である SB203580 (5 nmol) あるいは JNK 阻害薬である SP600125 (5 nmol) は NMDA による局所脳血流量の増大を抑制しなかった。また、免疫抑制剤でありカルシニューリンを阻害することが知られている FK506 (5 nmol) あるいはシクロスポリン A (5 nmol) も NMDA による局

所脳血流量の増大を有意に抑制した。

これらの結果から、MEK/ERK シグナルの活性化およびカルシニューリン/NFAT シグナルの活性化が、大脳皮質一次視覚野領域の局所脳血流量増大に関与することが示唆された。

以上、1) KCI により誘発した CSD による脳血流量減少モデルと、2) NMDA により誘発した脳血流量増大モデルの 2 種類の動物モデルを作製して解析を行った本研究は、脳循環障害発症機序の解明のみならず、その予防および治療薬開発に資する有用な知見であると考えられる。

### 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 9 件)

1. Matsushita H, Hijioka M, Ishibashi H, Anan J, Kurauchi Y, Hisatsune A, Seki T, Shudo K, Katsuki H., Suppression of CXCL2 upregulation underlies the therapeutic effect of the retinoid Am80 on intracerebral hemorrhage in mice., *J Neurosci Res.*, in press, DOI:10.1002/jnr.23379, 査読有
2. Ichikawa A, Nakahara T, Kurauchi Y, Mori A, Sakamoto K, Ishii K., Rapamycin prevents N-methyl-D-aspartate-induced retinal damage through an ERK-dependent mechanism in rats., *J Neurosci Res.*, in press, DOI:10.1002/jnr.23358, 査読有
3. Aoki M, Kurauchi Y, Mori A, Nakahara T, Sakamoto K, Ishii K., Comparison of the effects of single doses of elcatonin and pregabalin on oxaliplatin-induced cold and mechanical allodynia in rats., *Biol Pharm Bull.*, vol.37,2014, pp.322-326, [https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/37/2/37\\_b13-00735/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/37/2/37_b13-00735/_pdf), 査読有
4. Morita A, Nakahara T, Abe N, Kurauchi Y, Mori A, Sakamoto K, Nagamitsu T, Ishii K., Effects of pre- and post-natal treatment with KRN633, an inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase, on retinal vascular development and patterning in mice., *Exp Eye Res.*, vol.120,2014, pp.127-137, DOI:10.1016/j.exer.2014.01.009, 査読有
5. Sakamoto K, Suzuki Y, Kurauchi Y, Mori A, Nakahara T, Ishii K., Hydrogen sulfide attenuates NMDA-induced

- neuronal injury via its anti-oxidative activity in the rat retina., *Exp Eye Res.*, vol.120, 2014, pp90-96, DOI:10.1016/j.exer.2014.01.008, 査読有
6. Nakahara T, Mori A, Kurauchi Y, Sakamoto K, Ishii K., Neurovascular interactions in the retina: physiological and pathological roles., *J Pharmacol Sci.*, vol.123, 2014, pp.79-84, [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jphs/123/2/123\\_13R03CP/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jphs/123/2/123_13R03CP/_pdf), 査読有
  7. Naruoka T, Nakahara T, Tsuda Y, Kurauchi Y, Mori A, Sakamoto K, Nishihira J, Ishii K., ISO-1, a macrophage migration inhibitory factor antagonist, prevents N-methyl-D-aspartate-induced retinal damage., *Eur J Pharmacol.*, vol.718, 2014, pp.123-144, DOI:10.1016/j.ejphar.2013.08.041, 査読有
  8. Tanaka K, Ishitsuka Y, Kurauchi Y, Yamaguchi K, Kadowaki D, Irikura M, Katsuki H, Irie T., Comparative effects of respiratory stimulants on hypoxic neuronal cell injury in SH-SY5Y cells and in hippocampal slice cultures from rat pups., *Prdiatr Int.*, vol.55, 2013, pp.320-327, DOI:10.1111/ped.12079, 査読有
  9. Kurauchi Y, Hisatsune A, Isohama Y, Sawa T, Akaike A, Katsuki H., *Neuroscience*, vol.231, 2013, pp.206-215, DOI:10.1016/j.neuroscience.2012.11.044, 査読有
- 〔学会発表〕(計 28 件)
1. 坂本謙司、ラット NMDA 誘発網膜傷害には High-Mobility Group Box-1 が関与する、第 87 回日本薬理学会年会、2014 年 3 月 19 日-21 日、仙台、仙台国際センター、東北大学百周年記念館川内萩ホール
  2. 延永瑞希、高脂肪食は視床下部オレキシンニューロンにおける病理学的変化を誘導する、第 87 回日本薬理学会年会、2014 年 3 月 19 日-21 日、仙台、仙台国際センター、東北大学百周年記念館川内萩ホール
  3. 松下英明、脳内出血モデルマウスにおける内因性レチノイドの役割、第 87 回日本薬理学会年会、2014 年 3 月 19 日-21 日、仙台、仙台国際センター、東北大学百周年記念館川内萩ホール
  4. 山下博之、学生と多医療職種の協働による地域医療を考えるワークショップの成果、日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 27 日-30 日、熊本
  5. 倉内祐樹、神経活動依存的なタンパク質 S-グアニル化修飾系の亢進によるドパミンニューロンの保護効果、2013 年 12 月 7 日-8 日、長崎、長崎国際大学
  6. 上松哲大、マウス炎症生ドパミンニューロン変性モデルにおけるフェルラ酸の神経保護効果の解析、第 66 回日本薬理学会西南部会、2013 年 11 月 16 日、福岡
  7. 山下博之、大学院生及び大学生との合同研修会の実施効果とその方向性について～第 1 回天草医療インターンシップ研修会を経て～、熊本県薬剤師会学術集会、2013 年 10 月 27 日、熊本
  8. 岩本 浩、大学院生及び大学生との合同研修会の実施効果とその方向性について～第 1 回天草医療インターンシップ研修会を経て～、熊本県薬剤師会学術集会、2013 年 10 月 27 日、熊本
  9. 香月博志、レチノイン酸受容体刺激による神経型 NO 合成酵素発現亢進の機序、日本レチノイド研究会第 24 回学術集会、2013 年 8 月 31 日、東京
  10. 香月博志、中脳ドパミン保護における NO を介するレチノイドシグナル、第 17 回活性アミンに関するワークショップ、2013 年 8 月 24 日、福井
  11. 香月博志、SH-SY5Y 細胞の神経突起伸長に関するレチノイン酸受容体刺激性 nNOS 発現亢進の機序解析、第 13 回 NO 学会学術集会、2013 年 6 月 28 日、沖縄
  12. 高橋周平、ヒト神経芽腫細胞 SH-SY5Y 細胞の突起伸長におけるシアル酸の関与、第 8 回トランスポーター研究会年会、2013 年 6 月 15 日-16 日、熊本
  13. 高岡侑一郎、GABA によるミクログリア活性調節に関する研究、第 8 回トランスポーター研究会年会、2013 年 6 月 15 日-16 日、熊本
  14. 坂本謙司、網膜色素変性症モデルマウスで観察される錐体細胞機能障害に対する apocynin と deferiprone の保護効果、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 27 日-30 日、横浜
  15. 李代晃一、一酸化窒素は前兆を伴う片頭痛モデルラットの皮質拡張性抑制の伝播を抑制する、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 27 日-30 日、横浜
  16. 青木学一、エルカトニンのオキサリプラチン誘発末梢神経障害改善効果; プレガバリンとの比較、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 27 日-30 日、横浜
  17. 東 健太郎、プロブコールは糖尿病ラットにおける白内障の進行を抑制する、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 27 日-30 日、横浜
  18. 森田 茜、VEGF 阻害中止後に観察され

- る異常な血管ネットワーク形成: 新生仔マウス網膜における検討、第 86 回日本薬理学会年会、2013 年 3 月 21 日-23 日、福岡
19. 坂本謙司、ラット網膜におけるカプサイシンの NMDA 誘発神経細胞死に対する保護効果; CGRP, 内因性オピオイドおよびサブスタンス P の関与、第 86 回日本薬理学会年会、2013 年 3 月 21 日-23 日、福岡
  20. 青木学一、エルカトニンは TRPA1 および TRPM8 に関連した細胞内シグナル伝達を抑制することによりオキサリプラチン及びパクリタキセル誘発神経傷害を改善する、第 86 回日本薬理学会年会、2013 年 3 月 21 日-23 日、福岡
  21. 倉内祐樹、L-Citrulline は前兆を伴う片頭痛モデルラットの脳血流量減少を改善する、第 86 回日本薬理学会年会、2013 年 3 月 21 日-23 日、福岡
  22. 森 麻美、ラット網膜血管緊張性調節における 3 アドレナリン受容体の役割、第 86 回日本薬理学会年会、2013 年 3 月 21 日-23 日、福岡
  23. 藤林達也、SH-SY5Y 細胞におけるレチノイド誘導性の nNOS 発現上昇と神経突起伸長のメカニズム、第 86 回日本薬理学会年会、2013 年 3 月 21 日-23 日、福岡
  24. 森 麻美、PDE4 阻害薬はラット網膜血流量を増大させる、第 127 回日本薬理学会関東部会、2012 年 10 月 20 日、東京
  25. 香月博志、レチノイン酸受容体刺激による NO/cGMP シグナルを介したチュブリン重合安定化とその神経突起伸長および神経保護への関与、日本レチノイド研究会第 23 回学術集会、2012 年 10 月 19 日、鳥取(米子)
  26. 森田 茜、新生仔期マウスを用いた網膜血管再形成過程の解析、第 56 回日本薬理学会関東支部大会、2012 年 10 月 13 日、東京
  27. 白井遥祐、Tunicamycin 誘発視細胞障害に対する deferiprone の保護効果、次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2012、2012 年 9 月 21 日、神戸
  28. 加藤夢来、Pde6a に変異を持つ網膜色素変性症モデルマウスで観察される錐体細胞機能障害に対する deferiprone の保護効果、次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2012、2012 年 9 月 21 日、神戸

〔図書〕(計 1 件)

香月博志、倉内祐樹、羊土社、実験医学、2012、184-190

〔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

倉内 祐樹 (KURAUCHI, Yuki)  
熊本大学・大学院先導機構・助教  
研究者番号: 70631638

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: