

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462347

研究課題名(和文)脳虚血におけるトランスポーター由来脳環境を活用した効率的脳保護法の探求

研究課題名(英文) Search of the effective cerebroprotection method in cerebral ischaemia which utilized brain environment derived from a transporter

研究代表者

室園 美智博 (MUROZONO, MICHIRO)

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70276947

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)：我々は、脳内トランスポーターのひとつであるP-glycoprotein (P-gp) は薬剤の脳内浸透を調節するだけでなく、その存在自体が脳虚血のダメージに影響することを突き止めた。さらに我々の研究において、脳虚血にてP-gpの存在がサイトカインやアポトーシス関連物質に対して影響を及ぼしていることを確認している。またP-gpの作用を阻害する物質と脳保護剤の併用投与が脳保護作用を強化する傾向も認めている。本プロジェクトでは、脳虚血におけるP-gpの作用を背景として、脳保護剤の作用を発揮させるためのP-gp阻害剤の活用法を探った。

研究成果の概要(英文)：We discovered that P-glycoprotein (P-gp) which is one of the intracerebral transporters not only regulates the intracerebral penetrance of the drug, but also influences damage of cerebral ischemia. Furthermore, we confirmed that presence of P-gp has an influence for cytokine and an apoptotic material related for cerebral ischemia. We also showed the tendency that the combination with P-gp inhibitor and cerebroprotection agent strengthens cerebroprotection effects. In this project, we investigated utilization of the P-gp inhibitor to show the effects of the cerebroprotection agent in consideration of effects of P-gp in cerebral ischemia.

研究分野：麻酔学

キーワード：脳虚血 P-glycoprotein

### 1. 研究開始当初の背景

これまで我々はサイクロスポリン A (CsA)をはじめとして薬剤による脳保護作用を検討する研究を積み重ねてきた。CsA は脳内 P-glycoprotein (P-gp) により脳内への浸透が妨げられている。そこで P-gp を発現する multidrug resistance 1a (mdr1a) 遺伝子が欠失しているノックアウトマウスを使い、CsA の脳内浸透阻害をなくして脳虚血実験を行なったところ、CsA は濃度依存性に脳保護作用と神経毒作用の両面を有することが確認された {Murozono et al, Eur J Pharmacol. 2004 498(1-3)}。また脳内の物質輸送を担う P-glycoprotein (P-gp) は、血液脳関門 (BBB) の一部とされているが、我々は mdr1a ノックアウトマウスと正常マウスでの虚血実験を行い比較したところ、P-gp は薬剤の脳内浸透を調節するだけでなく、その存在自体が脳虚血のダメージに影響することを突き止めた { Murozono et al, Neurochem Res. 2009 34(9)}。さらに P-gp などの脳内輸送担体はアポトーシス関連物質やサイトカインなどとも密接に相互作用を及ぼしており、P-gp 自体の脳組織内の局在的な特徴や働きから神経障害の大きさに影響していることが示唆されている {Fernandez et al. J. Pharm. Pharm. Sci. 2004, 7(3)}。この P-gp の作用に関連して我々も調査した結果、脳虚血下でも IL-6 を中心としたサイトカインや、Bcl-2 などのアポトーシス関連物質への P-gp の影響が確認されている (第 56 回日本麻酔科学会にて発表)。更に CsA が脳血管内皮細胞内の P-gp により脳内への浸透が妨げられている状況と P-gp による虚血傷害助長作用を考慮して、Ondansetron と CsA と併用療法を行なった (Ondansetron と CsA は両方とも P-gp に負荷をかける)。結果、脳虚血において脳のダメージを著明に減少させることができた。以上のように我々は脳保護剤の効果や P-gp を代表とした脳組織を取り巻く環境など、脳虚血においてそれぞれのファクターがいかに作用するのかを調査しその条件を脳保護戦略にいかに関与するかを探り続けている。

### 2. 研究の目的

(1) 本プロジェクトでは、脳内トランスポーターである P-gp の脳虚血における作用をこれまでに得られた結果を背景として、更に詳細に追究する。具体的には P-gp の局在に関する経時的变化を調査した。

(2) P-gp に対する負荷をかけることで脳保護剤の効果を上げる方法を具体的な薬剤を使用して効果を探る。

### 3. 研究の方法

(1) **mdr1a ノックアウトマウスを活用した P-gp の局在**

P-gp が欠失したマウス (mdr1a ノックアウトマウス) と正常マウスにシリコンコーティングした 6-0 モノフィラメントを外頸動脈から挿入し、中大脳動脈起始部に留置、30 分虚血後モノフィラメントを抜去し再灌流する。虚血後再灌流 3 時間、12 時間、24 時間で経心臓的に脳をパラフォルムアルデヒド固定する。固定脳を摘出し冠状方向に切片を作成、P-gp 抗体による免疫組織染色を行い mdr1a ノックアウトマウスと正常マウスで比較検討した。

### (2) マウスの一過性局所脳虚血モデルにおける Cyclosporin A と Elacridar 併用投与実験

ICR マウスに 6-0 モノフィラメントを外頸動脈から挿入し、中大脳動脈起始部に留置、30 分間虚血後モノフィラメントを抜去し再灌流する。再灌流直後に生食を投与、Cyclosporin A を投与、Cyclosporin A + Elacridar を投与した。再灌流 48 時間後、経心臓的に脳をパラフォルムアルデヒド固定する。固定脳を摘出し冠状方向に切片を作成、NeuN 抗体により免疫組織染色を施し、虚血範囲を測定し各投与群間で比較した。

### (3) 統計

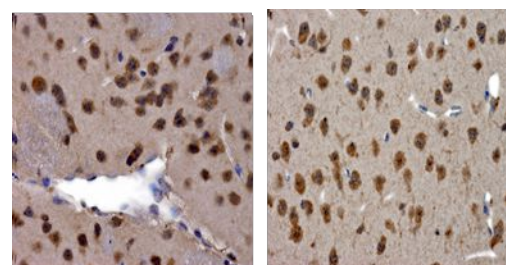
多群間での比較では Kruskal-Wallis 検定を採用、2 群間では Mann-Whitney U 検定を採用した。P<0.05 にて有意差と判定した。

### 4. 研究成果

#### (1) mdr1a ノックアウトマウスを活用した P-gp の局在

以前にウエスタン・ブロッティングによる脳内 P-gp の測定したところ、虚血後再灌流 3 時間以後から 48 時間以内に P-gp の存在が確認されていた。従って今回 虚血再灌流後 3 時間~24 時間で脳組織を染色したが、ノックアウトマウスと正常マウスでの明瞭な差を見出すことができなかった (図 1、2)。今後は染色方法の改善を検討する予定である。

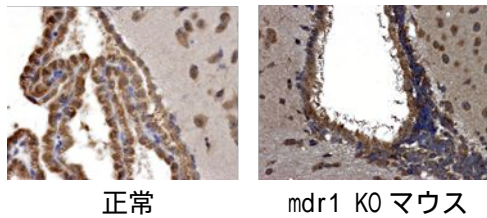
図 1 線条体組織の P-gp 染色 (再灌流 24 時間)



正常

mdr1 KO マウス

図2 脳室上皮の P-gp 染色  
(再灌流 2 4 時間)



(2) マウスの一過性局所脳虚血モデルにおける Cyclosporin A と Elacridar 併用投与実験

i) 薬剤投与経路の検討

一過性脳虚血後に経静脈投与での Elacridar を施行したところ、投与後に循環抑制が原因と思われる脳血流の著しい低下が認められた。また虚血再灌流後のマウスの全身状態が不良であることが目立ち、再灌流 4 8 時間後の死亡率が 80% 以上のため、経静脈的投与は中止となった。そこで薬剤は腹腔内投与に変更して続けた。

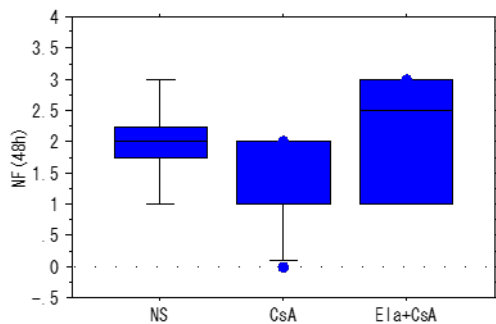
ii) 一過性局所脳虚血マウスにおける Cyclosporin A + Elacridar の腹腔内投与の効果

- 生食投与群 (n=6)、
- Cyclosporin A (10mg/kg) 投与群 (n=6)
- Cyclosporin A (10mg/kg) + Elacridar (10mg/kg) 併用投与群 (n=12)

(結果)

再灌流後 4 8 時間での神経学的所見に群間に有意な差を認めなかった (図 3)。

図 3 神経学的所見 (再灌流 48 時間)



注) 神経学的所見

Grade 0: 異常なし

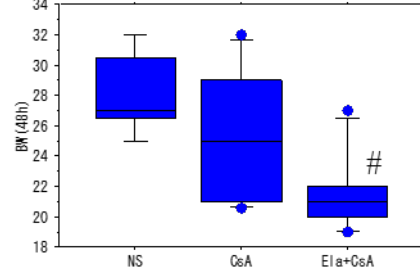
Grade 1: 尾を引っ張ると両前足がまっすぐ伸びない

Grade 2: 右か左に回転して歩く

Grade 3: 歩けない

再灌流後 4 8 時間での体重は Cyclosporin A + Elacridar 併用投与群は有意に生食投与群より少なかった (図 4)。

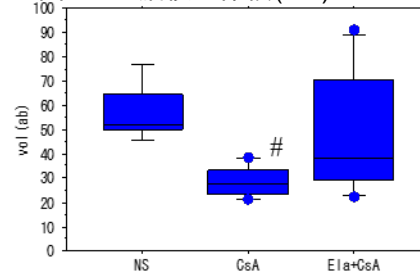
図 4 体重 (再灌流後 4 8 時間)



#: VS NS group (P < 0.05)

虚血による梗塞体積に関しては、生食投与群と Cyclosporin A 投与群に有意差を認めたが、Cyclosporin A + Elacridar 併用投与群は脳梗塞の軽減効果は認めなかった。

図 5 脳梗塞体積 (mm<sup>3</sup>)



#: VS NS group (P < 0.05)

まとめ

Mdr1a ノックアウトマウスと正常マウスでの脳内 P-gp の局在の違いは、まだ不十分な結果であったが、少なくとも血液脳関門以外に P-gp が存在する可能性がある。その点を明確にすることで、薬剤を効果的に投与する経路の選択や虚血における P-gp の影響の解明に繋がるであろう。

今回の Cyclosporin A + Elacridar 併用投与実験では、Elacridar の全身への影響が脳保護を妨げた可能性がある。特に Elacridar を溶解するための DMSO が有害と推察する。今後はすでに臨床で使用されている P-gp 阻害薬に変更するか、Elacridar の溶解方法の改善が必要である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Murozono et al, Co-administration of Cyclosporin A and Ondansetron decreases transient local cerebral ischemic injury in the mouse 2014, 9/27-30 Brian Edema XVI

〔図書〕(計 1 件)

室園 美智博 他、克誠堂出版、神経麻

酔、  
2016、70  
〔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

室園 美智博 (MUROZONO Michihiro)  
東京医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：70276947

##### (2)研究分担者

佐藤 永一 (SATO Eiichi)  
東京医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：60408101

武田 明子 (TAKEDA Akiko)  
東京医科大学・医学部・助教  
研究者番号：70421021