

平成12年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

### 第2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

# 目 次

文献No	課題番号			
20000937A	21008	血管壁細胞の抗血栓性機能の制御機構の解明と新規抗血栓薬の開発	加藤 久雄	1
938A	21019	組織内脂肪蓄積の予防及びGLUT4の発現増加を目指したインスリン抵抗性治療法の研究	江崎 治	14
939A	21045	慢性呼吸器疾患の発症機構の解明と医療への応用	斎藤 博久	18
940A	21052	閉経後骨粗鬆症の発症機構の解明とその予防と治療薬に関する研究	宮浦 千里	25
942A	21067	細菌感染に関与する病原遺伝子の発現機構の解明とその制御法の開発	渡辺 治雄	33
943A	21073	脳循環障害による神経細胞死の発症機序の解析と治療法の開発	内村 英幸	38
944A	21079	疾患モデルマウスを用いたβ-ガラクトシドシスの病態解析と治療への応用	松田潤一郎	46
945A	21081	精神疾患の分子メカニズムの解明と新しい診断・治療法の開発への応用	西川 徹	53
946A	21086	新しい生体防御調節物質の機能と作用の解析	鈴木 和男	60
948A	21089	感染症が誘発する自己免疫疾患病態の解明とその医療への応用に関する研究	大川原明子	68
949A	21092	生体膜脂質を介する細胞機能調節機構の解明とその医療への応用	西島 正弘	80
950A	21096	免疫・内分泌系による神経系の障害機構の解明とその制御	田平 武	88
951A	21102	移植免疫寛容とマイクロキメリズムに関する基礎的研究	木村 廣光	92
952A	21104	G蛋白質共役型受容体の個体レベルでのゲノム機能評価	辻本 豪三	98
953A	21107	難治性腎疾患の病態解明と医療への応用に関する研究	藤本純一郎	111
954A	21110	食細胞による感染防御機構の解明と医療への応用	綱脇 祥子	118
955A	21121	抗酸化機能調節に及ぼす運動と栄養の影響に関する研究	樋口 満	126
956A	21130	神経変性疾患における神経細胞死の分子機構の解析	桃井 隆	134
957A	21142	C型肝炎ウイルスに対するインターフェロン(IFN)の治療効果を増強する新薬の開発研究	小長谷昌功	144
958A	21150	グリア細胞の機能調節による神経疾患治療法の開発	高坂 新一	149
959A	21166	新規破骨細胞形成抑制因子(OCIF)とそのリガンドである破骨細胞分化因子(ODF)の生理的役割の解明と医療への応用	高橋 直之	160
960A	21177	コレステロール代謝・動脈硬化関連遺伝子の発現調節因子の検索	松本 明世	167
961A	21179	血圧調節物質・動脈硬化起因物質などに関する分子生物学的、生化学的研究	南野 直人	178
964A	21215	アトピー性皮膚炎自然発症(NC)マウスを用いた皮膚掻痒症の発症機序の解明と新規治療薬の創製	廣田 直美	183
965A	21224	ヒト血液細胞情報伝達の解明とオリゴヌクレオチドを用いた治療法の開発	湯尾 明	193
966A	21225	癌化とウイルス感染を制御する細胞内情報伝達分子を標的とする薬剤の探索	松田 道行	200

20000969A	21228	細胞内シグナル伝達の解明による創薬シーズの探索	上原 至雅	……	204
968A	21234	スフィンゴ脂質の情報伝達の研究と抗血栓症薬開発	望月 直樹	……	208
969A	21279	中枢神経系におけるATP受容体の機能の解析と医療への応用	井上 和秀	……	213
941A	22055	宿主の防御機能動態と感染機構の解明と医療への応用	高津 聖志	……	221
949A	22088	ビタミンE欠乏性脊髄小脳失調症の病態解明と治療法の確立に関する研究	水澤 英洋	……	228
962A	22183	炎症・アレルギー性疾患の発症機構の解明と医療への応用	清水 孝雄	……	233
963A	22194	コレステロール代謝を標的とした抗動脈硬化薬開発のための基盤研究	新井 洋由	……	237

## 脳循環障害による神経細胞死の発症機序の解析と治療法の開発

所属 国立肥前療養所 臨床研究部  
主任研究者 内村英幸

### 分担研究者

- (1) 国立肥前療養所臨床研究部 八尾博史
- (2) 東京理科大学薬学部 田沼靖一
- (3) 日清キョーリン製薬創薬研究所 菅井利寿
- (4) 九州大学医学研究院病態機能内科 井林 雪郎、北園 孝成
- (5) 三菱東京製薬 梅津浩平、江口淳一

要旨 ニコチナマイドは、神経様に分化した B50 細胞のアポトーシスを抑制し、中大脳動脈閉塞モデルにおいても脳梗塞縮小効果があった。プロピオン酸による細胞内酸性化による脳底動脈拡張反応は、その大部分が ATP 感受性カリウムチャンネルの活性化によって起こっていることが明らかになった。ゲニステインの長期投与によって高血圧に伴う血管壁厚は有意に改善し、シグナル伝達治療として期待される。

### 1. 研究目的

1995年に発症3時間以内の組織プラスミノゲンアクチベータが有効な脳血管障害治療薬であることが示され、脳血流の早期回復が脳梗塞の治療に有効であることが証明された。さらにごく最近、血管内血栓溶解療法も中大脳動脈閉塞の治療に有効であることが示された。現実的には整備すべき多くの課題が残されているとはいえ、血栓溶解療法は治療法として確立した観がある。次の段階として、脳血流自体の改善には依存しない治療法である脳保護薬の開発が期待されている。

アポトーシスは、細胞の形態学的変化（核の濃縮、クロマチンの分節、アポトーシス小体の形成）と生化学的特徴（DNA断片化=ladder）によって定義されている。最近、脳虚血によって起こる神経細胞死にアポトーシスの機序の関与が示唆されている。昨年度までの検討により我々も、高血圧自然発症ラット中大脳動脈閉塞モデルにおいて虚血後3時間の時点で虚血中心部およびペナンプラ領域においてDNA大断片化（50、20 kbp）がみとめられ、その後6時間の時点でペナンプラ領域のみにDNA ladderが生じることを確認している。以上より、少なくとも生化学的なアポトーシスの進行が治療可能性の高い虚血辺縁部（ペナンプラ）でみとめられ、脳虚血病態の進展過程におけるアポトーシスの抑制による治療の可能性が示唆された。本研究では、cAMPにより中枢神経様細胞に分化した後にアポトーシスを起こす B50 培養細胞株を用いて、ニコチナマイド及びその誘導体のアポトーシス抑制効果について検討した。さらに *in vivo* においてもラット中大脳動脈閉塞局所脳虚血モデルを用いて、脳虚血におけるアポトーシス抑制の手段としてニコチナマイドに注目して実験を行った。

虚血に伴って起こる低酸素血症と高炭酸ガス血症は、ともに強い脳血管拡張反応を引き起こす。これらの拡張機序としては、ATP 感受性カリウムチャンネルや一酸化窒素（NO）の関与が明らかになってきている。一方、脳組織が虚血にさらされると著明な細胞内の酸性化が起こることが知られており、細胞内酸性化も脳血管の反応性を制御すること考えられているが、その詳細な機序は明らかになっていない。本研究では、細胞外の pH を変えずに細胞内を酸性化させるために弱酸と強塩基の塩であるプロピオン酸ナトリウムを用いて、細胞内酸性化による脳底動脈の反応性について検討した。

脳血管障害の最大の危険因子は高血圧である。高血圧患者の脳血管には、壁の肥厚やリモデリングといった形態変化が起こり、血管拡張障害と相俟って著明な血管抵抗の上昇を引き起こしている。高血圧に伴う脳血管抵抗の上昇は、脳血管障害の発症に重要な役割を担っていると推測されている。高血圧に伴って起こる脳血管形態変化には、レニン/アンジオテンシン系や種々のサイトカイン、成長因子などの関与

が推測されている。これらの諸因子による細胞反応のシグナル伝達機構に、チロシンキナーゼ (PTK) が共通の因子として機能していることが知られており、PTKを阻害することで、これらの諸因子の作用を同時にかつ効率よく阻害することは、高血圧に伴う脳血管の形態変化を改善する新しい治療につながる可能性がある。昨年度の研究では、本治療が脳血管反応性を著明に改善することを明らかにした。今年度は、PTK阻害剤で長期治療を行うことによって、脳血管形態異常が改善しうるかについて検討した。

## 2. 研究方法

### (1) 虚血性神経細胞死におけるアポトーシス

血栓性中大脳動脈閉塞は、これまでの本事業における検討において、我々が確立した局所脳虚血モデルを用いて行った。手術用顕微鏡下に、遠位部中大脳動脈を露出した。波長568nm、20mWのクリプトンレーザー (Innova 301, Coherent 社) を遠位部中大脳動脈に照射した。レーザービームは焦点距離30cmのシリンドリカルレンズ (CKX300, Newport 社) を用いて遠位部中大脳動脈本幹に収束させた。照射開始と同時に光感受性色素ローズベンガル (0.9%食塩水中に15mg/mL, 和光純薬工業) 20mg/kgを90秒で静注し、4分間照射を続けた。

中大脳動脈閉塞後、経時的に脳を凍結し、実体顕微鏡下に凍結連続切片から梗塞中心部 (A、B)、ペナンプラ領域 (C)、正常対照部位 (D) を正確に切り出し-80℃に保存した。各部位からDNAをイソアミノアルコール/クロロホルム抽出法により調製し、DNAの大断片化をパルスフィールド電気泳動法、ヌクレオソーム単位での断片化を1.8%アガロース電気泳動法により解析した。泳動後、DNAをエチジウムプロミドで染色したUVイルミネーター下でポラロイドカメラにより写真記録した。

雄性高血圧自然発症ラット (5-7カ月齢、320-420g、27匹) を用いて、血栓性中大脳動脈閉塞を上記方法により行った。脳血流は、bregmaの後方1mm、正中より4.0mmの部位においてレーザードブラ法を用いて測定した。中大脳動脈閉塞前に生食もしくはニコチナマイド (125mg/kgもしくは250mg/kg) を30分かけて静注した。血栓性中大脳動脈閉塞から3日後に断頭し、2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 染色により脳梗塞容積を算出した。

ラット神経芽細胞種由来のB50培養細胞株はRPMI-1640 10%牛胎児血清 (FCS) により継代培養した。B50細胞はRPMI-1640 1% FCS中で1mMジブチルcAMPで処理すると、1~2日目にかけて中枢神経様に分化した後に、3~4日目にアポトーシスを自然に起こす。この神経分化-アポトーシス系を用いて、ニコチンアミドあるいはその類似物質ニコチン酸、6-アミノニコチンアミドのアポトーシスに及ぼす効果を調べた。アポトーシスの検出はDNAのヌクレオソームでの断片化を1.8%アガロースゲル電気泳動法によって解析した。

### (2) 高血圧による脳血管の病態

頭蓋法を用いてラット脳底動脈のin vivoにおける拡張反応を観察した。正常血圧の雄性Sprague-Dawley rat (7~8か月齢) を用い、アモバルビタールにて麻酔し仰臥位で固定後、ツボクラリンにて非動化し人工呼吸器を用いて呼吸管理した。腹側より頭蓋骨・硬膜・軟膜を除去し、脳底動脈直上に開放頭蓋窓を作製した。頭蓋窓を人工髄液で灌流し、外膜側より刺激物質を投与した際の脳底動脈内径の変化を測定した。

プロピオン酸ナトリウム ( $10^{-6}$  -  $10^{-3}$  mol/L) は人工髄液に溶解して投与した。プロピオン酸非存在下の人工髄液のpH、PCO<sub>2</sub>、PO<sub>2</sub>は、それぞれ $7.426 \pm 0.002$ 、 $34.9 \pm 1.1$ 、 $119 \pm 3$ であった。ATP感受性カリウムチャンネル、カルシウム作動性カリウムチャンネル、NO合成酵素の阻害は、それぞれの選択的阻害剤であるglibenclamide ( $10^{-6}$  mol/L)、iberiotoxin ( $10^{-8}$  mol/L)、Ng-nitro-L-arginine (L-NNA;  $10^{-5}$  mol/L) を用い、外膜側より投与した。また、シクロオキシゲナーゼの阻害は、indomethacin (10 mg/kg) を静脈内投与することによって行った。

牛大動脈から単離培養した内皮細胞を用いて、プロピオン酸ナトリウムによる細胞内pHの変化を測定した。2~3代継代した内皮細胞をトリプシン (2 mg/ml) 処理によって採集し、20 mmol/L HEPES 緩衝液にサスペンドし ( $4 \times 10^6$  cell/ml)、蛍光性pH指示薬である0.6 mmol/L 2',7'-bis(carboxyethyl) carboxyfluorescein (BCECF) を加えて室温で20分間インキュベートした。細胞を洗浄後、 $1 \times 10^6$  cell/mlの濃度で20 mmol/L HEPES 緩衝液にサスペンドし、励起波長500 nm、蛍光波長530 nmで刺激時のpH変

化を観察した。pHのキャリブレーションは、nigerisin/K法を用いた。

実験には、高血圧自然発症ラット（SHR；雄性、4カ月齢）ならびに正常血圧のWKYラット（雄性、4カ月齢）を用いた。PTKの阻害は、その選択的阻害剤であるゲニステインを用いて行った。ゲニステインは自然界に存在するイソフラボノイドであり、大豆をはじめとした豆類に多く含まれている。日本人のゲニステイン摂取量（体重kgあたり1mg）から換算して、固形飼料CE-2（日本クレア株式会社）にゲニステインを1mg/1000gの割合で混合し2カ月間ラットに投与した。対照群ではゲニステインを含有しないCE-2を投与した。PTKの阻害は、VEGF投与に伴う血圧低下作用の減弱によって確認した。

ラットを2カ月間治療した後に、頭窓法を用いて脳底動脈形態を検討した。ラットをアモバルビタール（50mg/kg, i.p.）で麻酔し仰臥位で固定後、塩化ツポクラリン（2mg/kg, i.v.）で非動化し人工呼吸器を用いて呼吸管理した。腹側より頭蓋骨・硬膜・軟膜を除去し、脳底動脈直上に開放頭蓋窓を作製した。頭蓋窓を人工髄液で灌流し、外膜側より100mmol/L EDTAで最大拡張させた際の、脳底動脈外径・内径及び壁厚を計測した。

ラットを麻酔後、開胸し左心室から大動脈へ金属カテーテルを挿入して、ヘパリン加生理食塩水を灌流した。断頭後に脳を摘出し顕微鏡下に脳底動脈を取り出し硬膜や軟膜をすばやく取り除いて液体窒素で凍結させた。得られた凍結脳底動脈にloading buffer 50mlを加えてホモジナイズし、サンプル8mlをSDS-PAGEにて泳動後PVD膜にトランスファーし抗リン酸化チロシンマウス血清（Cell Signaling Technology, MA, USA）を一次抗体、抗マウスIgG抗体を二次抗体として、Western blottingを行った。

### 3. 研究成果

#### (1) 虚血性神経細胞死におけるアポトーシス

閉塞後1~3時間にかけて虚血領域でDNAの大断片化が観察された。その後6時間後のペナンブラ領域にはDNAのヌクレオソーム単位での断片化が認められた。しかし、虚血中心部では虚血6時間後もDNAのヌクレオソーム単位での小断片化はほとんど見られなかった。しかし、虚血中心部の組織片は、DNA抽出の際にホモジナイズしやすいことから、組織としてはネクローシスによる崩壊が進んでいるものと推察される。ペナンブラ領域でみられるDNAのヌクレオソーム単位での断片化がDNase  $\gamma$ の活性発現によるものであるか否かについてその遺伝子発現をRT-PCR法で解析したり、DNase  $\gamma$ モノクローナル抗体を用いて検討する必要がある。今回の結果は、虚血によるペナンブラ領域の神経細胞死はDNAの大断片化からヌクレオソーム単位への小断片化が起こるアポトーシスによることを示唆している。

脳梗塞容積は、対照群（生食投与群） $84.2 \pm 3.6 \text{ mm}^3$ に対し、ニコチナマイド投与群（125 mg/kgもしくは250 mg/kg）ではそれぞれ $52.0 \pm 6.2 \text{ mm}^3$ 、 $53.6 \pm 7.4 \text{ mm}^3$ で、ニコチナマイド投与により有意に縮小した（Fig. 1）。中大脳動脈閉塞前の脳血流はニコチナマイド投与による変化はなかった。血管閉塞後には対照群、ニコチナマイド投与群（125 mg/kgもしくは250 mg/kg）でそれぞれ $29 \pm 2\%$ 、 $32 \pm 4\%$ 、 $38 \pm 2\%$ であり、ニコチナマイド高用量群（250 mg/kg）において有意に脳血流は保たれていた（Fig. 2）。

ジブチルcAMPにより中枢神経様に分化誘導後1日目にニコチンアミドを添加した後、アポトーシスの惹起を経時的に観察した。その結果、ニコチンアミドは神経様に分化したB50細胞のアポトーシスを抑制した。しかし、ニコチン酸にはそのような効果は認められなかった。一方、6-アミノニコチンアミドはわずかではあるがアポトーシスを促進する効果がみられた。これらの結果から、ニコチンアミドが脳虚血による神経細胞死を阻止する可能性が示唆された。

#### (2) 高血圧による脳血管の病態

プロピオン酸ナトリウム（ $10^{-6}$  -  $10^{-3}$  mol/L）は、濃度依存的に脳底動脈を拡張させた。 $10^{-3}$  mol/Lプロピオン酸による脳底動脈拡張率は、 $38.5 \pm 6.5 \%$ であった（Fig. 3）。 $10^{-6}$  mol/L glibenclamideを前投与すると、プロピオン酸による拡張反応は約50%抑制された（Fig. 4）。ニトロプルシッドも同様に脳底動脈拡張反応を引き起こしたが、この拡張反応は $10^{-6}$  mol/L glibenclamideによって影響をうけなかった（Fig. 5-7）。

カルシウム作動性カリウムチャンネルの阻害剤であるiberiotoxin（ $10^{-8}$  mol/L）、シクロオキシゲナーゼの阻害剤であるindomethacin（10 mg/kg）、NO合成酵素の阻害剤であるNg-nitro-L-arginine（L-NNA;  $10^{-5}$  mol/L）

は、全てプロピオン酸による脳底動脈拡張反応に有意な影響を及ぼさなかった（図3～5）。

定常状態における細胞内pHは、 $7.24 \pm 0.03$  ( $n=10$ )であった。 $10^{-3}$  mol/L プロピオン酸を加えると細胞内は急激に酸性化され、 $7.02 \pm 0.02$  まで下降した。一方、定常状態での緩衝液のpHは $7.426 \pm 0.002$ であった。 $10^{-2}$  mol/L プロピオン酸存在下での緩衝液のpHは $7.424 \pm 0.002$ であり、プロピオン酸投与によって細胞外のpHは有意な変化を認めなかった。以上のことより、プロピオン酸が細胞内のみを選択的に酸性化したことを確認した。

ゲニステインを含まない飼料（対照群）と含む飼料（治療群）で2カ月間飼育したラットの血圧値（平均血圧）は、それぞれ $190 \pm 6$  mmHgと $192 \pm 3$  mmHgであり、両群間に有意な差を認めなかった。血液ガス分析、ヘマトクリット、血糖などの生理学的諸変量にもすべて両群間に有意な差はなかった。

EDTAを用いて脳底動脈を最大拡張させた際の脳底動脈径は、外径・内径ともにSHRではWKYラットに比し有意に縮小していた（外径；WKYラット  $468 \pm 10$   $\mu$ m、SHR  $398 \pm 12$   $\mu$ m、内径；WKYラット  $436 \pm 8$   $\mu$ m、SHR  $345 \pm 11$   $\mu$ m）。また、壁厚はSHRが著明に肥厚していた（WKYラット  $16 \pm 2$   $\mu$ m、SHR  $27 \pm 3$   $\mu$ m）。ゲニステイン治療を行ったSHRでは対照のSHRに比して、外径・内径の値はばらつきが大きく有意な改善効果をうるにいたらなかったが、壁厚は $17 \pm 2$   $\mu$ mと、治療によって有意に改善していた。

脳底動脈サンプルを用いてリン酸化チロシンに対するWestern blottingを行ったところ、少なくとも5種類の蛋白質が同定された。これらの中で最も変化の大きい125 kDの蛋白質に着目してその量を検討したところ、SHRではWKYラットに比してリン酸化チロシン量の有意な増加を認めた（WKYラット  $510 \pm 205$  Arb.Unit、SHR  $650 \pm 80$  Arb.Unit）。ゲニステイン治療によってこのリン酸化蛋白質の量は、減少する傾向にあった。

#### 4. 考察

中大脳動脈閉塞局所脳虚血で起こる細胞死のうちペナンプラ領域では、DNAの切断は大断片化からヌクレオソーム単位へと進行していることが示唆される。一方、梗塞中心部で起こる神経細胞死は、細胞の崩壊は進んでいるものの、DNAは大断片化からスメア一状に分解していることから、おそらくネクローシス様の神経細胞死が起こっているものと考えられる。これらの結果は、ペナンプラ領域の神経細胞死は人為的に制御できることを示しており、何らかの薬物治療によって回復可能であることを意味する。NAD<sup>+</sup>—ポリ（ADP—リボース）代謝は、DNA損傷に対するDNA修復や細胞レベルでの修復（アポトーシス）に重要な役割を果たしている。しかし、その詳細なメカニズムは未だに解明されていない。本研究において、NAD<sup>+</sup>の前駆体でもあり、ポリ（ADP—リボース）の合成酵素、ポリ（ADP—リボース）ポリメラーゼ（PARP）の阻害剤であるニコチンアミドにアポトーシスの抑制能があることが判明した。しかし、NAD<sup>+</sup>の前駆体およびPARPの阻害剤となり得ない6-アミノニコチンアミドには抑制能は認められずむしろアポトーシスを推進する傾向がみられた。その差異のメカニズムを詳細に解析することによって、脳虚血による神経細胞死をin vivoで阻止することができる新しい脳保護薬の可能性が期待される。

ニコチナマイド（125 mg/kgもしくは250 mg/kg）は、中大脳動脈閉塞モデルにおいて脳梗塞縮小効果があった（それぞれ-38%と-36%）。ニコチナマイドには高用量で脳血流増加作用があったが、脳血流に影響を及ぼさない低用量でも十分な脳梗塞縮小作用がみられた。今回の結果は、昨年度までの本研究事業において報告したin vitroの成績に一致するものである。すなわちラット胎児中枢神経細胞由来のB50培養細胞株は1 mM ジブチリルcAMPで処理すると、中枢神経細胞に分化した後に、4日目から自然にアポトーシスを起こす。この神経分化・アポトーシス系を用いて、ポリ（ADP-リボース）ポリメラーゼの阻害薬のひとつである3-アミノベンツアミドとNAD<sup>+</sup>の前駆体であるニコチナマイドのアポトーシスに及ぼす効果について調べた結果、3-アミノベンツアミドとニコチナマイドは神経様に分化したB50細胞のアポトーシスを抑制した。

今回の結果と昨年までのin vitroでの成績から、虚血性神経細胞死の過程にアポトーシスが関与し、ニコチナマイドの保護効果の機序としてアポトーシスの抑制が考えられる。NAD<sup>+</sup>の前駆体であるニコチナマイドは、脳虚血後に起こるポリ（ADP-リボース）ポリメラーゼ活性化の抑制やNAD<sup>+</sup>の減少を防ぐことにより抗虚血作用を示すと考えられるが、その機序の詳細につき今後解明していく必要がある。また、

血管閉塞から一定の時間の後に治療開始しても有効であるか否かの検討も、脳梗塞の治療応用を目指す上で重要であろう。

虚血状態は組織の酸素分圧の低下や炭酸ガス分圧の上昇とともに著明な酸性化を引き起こす。今回、プロピオン酸を用いて細胞内を酸性化したところ、著明な脳底動脈拡張反応が起こることを見出した。プロピオン酸の投与によって細胞外のpHのみならず、PCO<sub>2</sub>やPO<sub>2</sub>も影響を受けておらず、細胞内のプロトンの上昇が脳血管拡張反応を引き起こす媒介因子となりうることを示唆するものと考えられる。

低酸素並びに高炭酸ガスは、ともに著明な脳血管拡張反応を引き起こす。しかしながら、その拡張反応を媒介する因子は、低酸素による場合には主としてATP感受性カリウムチャンネルであり、一方、高炭酸ガスの場合には主としてNOである。今回の検討で、細胞内酸性化による脳底動脈拡張反応は主としてATP感受性カリウムチャンネルの活性化によって起こることが明らかになった。NOをはじめとして、プロスタノイドやカルシウム作動性カリウムチャンネルは関与しないと考えられた。パッチクランプ法を用いた検討で、ATP感受性カリウムチャンネルがプロトンそのものによって活性化されるとの報告もあり、*in vivo*においても、細胞内の酸性化はATP感受性カリウムチャンネルの活性化を介して著明な脳底動脈拡張反応を引き起こすことが明らかになった。

高血圧に伴い脳血管には肥厚やリモデリングが起こり、それに伴う内腔の狭小化は高血圧に伴う脳血管抵抗の上昇に寄与するとともに脳血管障害の発症に関与していると考えられている。最近、SHRを用いてACE阻害剤とヒドララジンの治療効果を比較検討し、同程度の降圧効果が得られたが、リモデリングの改善はACE阻害剤による治療に強く認められたことが報告された。すなわち、高血圧に伴う脳血管のリモデリングに、血圧そのものに加えてレニン・アンジオテンシン系が重要な役割を担うことが推測される。さらに、種々のサイトカインや増殖因子も脳血管における動脈硬化の進展に大いに関与することが示唆されている。

本研究では、ゲニステイン治療によって、血圧値そのものは変化しなかったが、脳血管壁の肥厚が著明に改善することを見出した。すなわち、ゲニステイン治療によって、高血圧による動脈硬化進展に関与する諸因子のシグナル伝達を抑制することで、血管の形態異常の改善を得ることが可能であることを示唆するものと思われる。

昨年度の本事業における検討で、ゲニステイン治療が脳血管反応性を改善しうることを報告したが、本年度の研究は高血圧に伴う血管機能障害のみならず、形態変化にも本治療が有用であることを指示すると考えられる。

前述のごとく、ゲニステインは自然界に存在するイソフラボノイドであり、PTK阻害作用以外にもエストロゲン様作用を有しており、今回投与したゲニステインがPTK阻害を介して治療効果を引き起こしたことを確認する必要がある。本研究では、二つの実験によってゲニステインの阻害効果を検証した。まず、VEGFによる降圧効果を検討したところ、ゲニステイン治療によってVEGFによる降圧は有意に抑制された。また、Western blotting法によって、脳底動脈における125 kD蛋白質のリン酸化が治療群によって低下する傾向にあることを認めた。これらの結果がゲニステインのPTK阻害以外の作用を否定するものではない。また、125 kD蛋白質の同定や形態変化への関与の検証もこれからの課題であると考えられる。

## 5. まとめ

脳虚血後のペナンプラ領域ではアポトーシスが継続的に進行していることが明らかとなった。この知見は虚血性脳損傷に対してアポトーシスに陥る時間を先送りにする治療薬やアポトーシスの惹起を抑制する治療薬など新しい視点から治療薬及び治療法を開発することの重要性を指摘している。今後、さらに神経細胞死のアポトーシスの分子メカニズムをカスパーゼやBcl-2ファミリーの観点から詳細に解析していく必要がある。虚血性神経細胞死の治療法として、ニコチナミドや類似作用物質によるアポトーシスに対する治療可能性が示唆された。血管内血栓溶解療法による塞栓除去による血行再開までの間に、脳損傷の大きな要因となるアポトーシスの誘発をできるだけ阻止することは臨床重要である。本研究で明らかにされたニコチンアミドの効果は興味深い。また、6-アミノニコチンアミドには有効性がないという結果もニコチンアミドをリード化合物としてさらに効果的なアポトーシス阻害剤を開発する上で重要な知見であ



る。今後、ニコチンアミドによるアポトーシス抑制効果の分子メカニズムを詳細に解明することが新たな脳梗塞治療薬の開発のために重要である。

顕窓法を用いて、細胞内酸性化による脳底動脈拡張反応の発生機序について検討した。細胞内酸性化による脳底動脈拡張反応は、主としてATP感受性カリウムチャンネルの活性化によって起こることが明らかになった。ATP感受性カリウムチャンネルは虚血時の血流維持に重要な役割を担うことが推測された。PTKの長期阻害によって、高血圧に伴う脳血管の形態異常を改善しうることが明らかになった。PTK阻害剤であるゲニステインは、自然界に存在するイソフラボノイドであり、大豆を初めとした食物に大量に含まれている。日本人における前立腺癌の発生率が欧米に比して低いことが、ゲニステイン摂取量の違いによる可能性が示唆されており、PTK阻害はシグナル伝達治療という新たな治療法につながる可能性を示唆している。注意すべきことは、高血圧に伴う脳血管抵抗の上昇は、血圧の急激な上昇に伴う過度な脳血流の上昇を防ぐ合目的的反応であることも指摘されており、臨床の場においては本治療と降圧薬を併用することが必須となろう。

## 6. 研究発表

- 1) Fukuda K, Yao H, Ibayashi S, Nakahara T, Uchimura H, Fujishima M: Ovariectomy exacerbates and estrogen replacement attenuates photothrombotic focal ischemic injury in rats. *Stroke* 31:155-160,2000
- 2) 福田賢治, 八尾博史, 井林雪郎, 中原辰雄, 内村英幸, 藤島正敏: 実験的脳梗塞におけるエストロゲンの保護作用. *Brain Hypoxia* 14:85-93,2000
- 3) 八尾博史, 井林雪郎, 定永史子, 福田賢治, 高田潤二, 大星博明, 北園孝成, 内村英幸, 藤島正敏: Photothrombosisによるラット中大脳動脈閉塞モデルにおけるYAGレーザーによる再灌流システム. *脳と神経* 53:253-257,2001
- 4) Yao H, Tanuma S, Fukuda K, Shiokawa D, Sadanaga-Akiyoshi F, Ibayashi S, Uchimura H, Fujishima M: DNA damage in ischemic core and penumbra in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 31:2866,2000
- 5) Ibayashi S, Nagao T, Kitazono T, Ooboshi H, Kitayama J, Sadoshima S, Fujishima M: Calcium antagonist isradipine reduces metabolic alterations in acute cerebral ischemia in spontaneously hypertensive rats. *Neurochem. Res.* 25: 349-355, 2000.
- 6) Ibayashi S, Takano K, Ooboshi H, Kitazono T, Sadoshima S, Fujishima M: Effect of selective brain hypothermia on regional cerebral blood flow and tissue metabolism using brain thermoregulator in spontaneously hypertensive rats. *Neurochem. Res.* 25: 369-375, 2000.
- 7) Kitayama J, Kitazono T, Ibayashi S, Wakisaka M, Watanabe Y, Kamouchi M, Nagao T, Fujishima M: Role of phosphatidylinositol 3-kinase in acetylcholine-induced dilatation of rat basilar artery. *Stroke* 31: 2487-2493, 2000.
- 8) Ooboshi H, Ibayashi S, Takano k, Sadoshima S, Kondo A, Uchimura H, Fujishima M: Hypothermia inhibits ischemia-induced efflux of amino acids and neuronal damage in the hippocampus of aged rats. *Brain Res.* 884: 23-30, 2000.
- 9) Ooboshi H, Ibayashi S, Takada J, Yao H, Kitazono T, Fujishima M: Adenovirus-mediated gene transfer to ischemic brain; ischemic flow threshold for transgene expression. *Stroke* In press
- 10) Takada J, Ibayashi S, Nagao T, Ooboshi H, Kitazono T, Fujishima M: Bradykinin mediates the acute effect of an angiotensin converting enzyme inhibitor on cerebral autoregulation in rats. *Stroke* In press
- 11) Eguchi J, Inomata Y, Saito KI: The anxiolytic-like effect of MCI-225, a selective NA reuptake inhibitor with 5-HT3 receptor antagonism. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 68: 1-7, 2001.

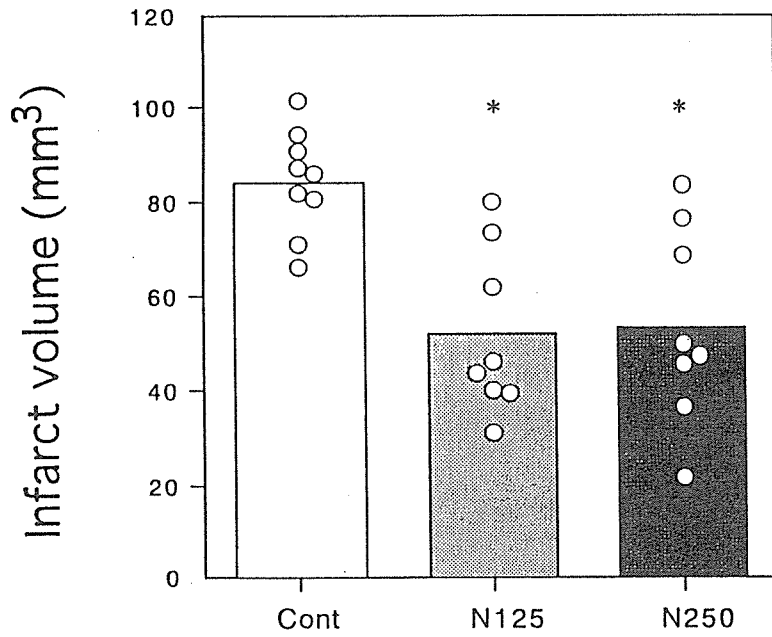


Figure 1. Infarct volumes in control (Cont), nicotinamide 125 mg/kg (N 125), and 250 mg/kg (N 250) groups.

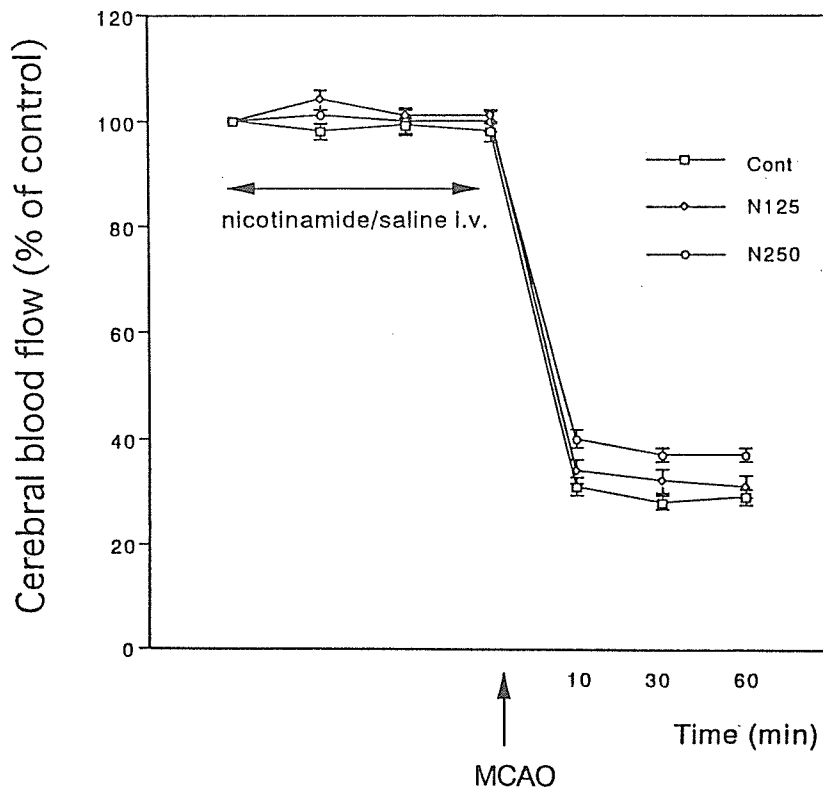


Figure 2. Changes in cerebral blood flow in control (Cont), nicotinamide 125 mg/kg (N 125), and 250 mg/kg (N 250) groups. Values are mean  $\pm$  SEM (n=13-14/group).

Fig. 3

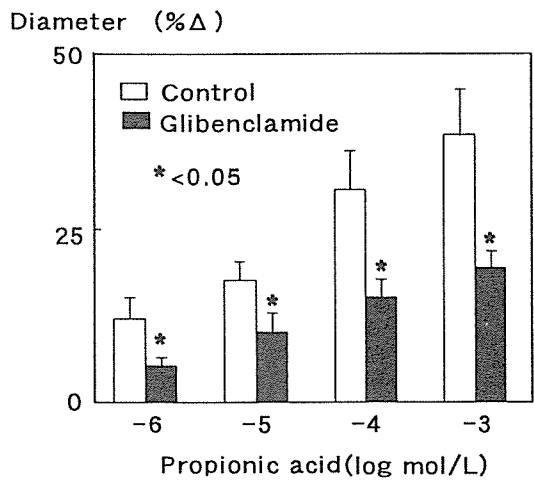


Fig. 4

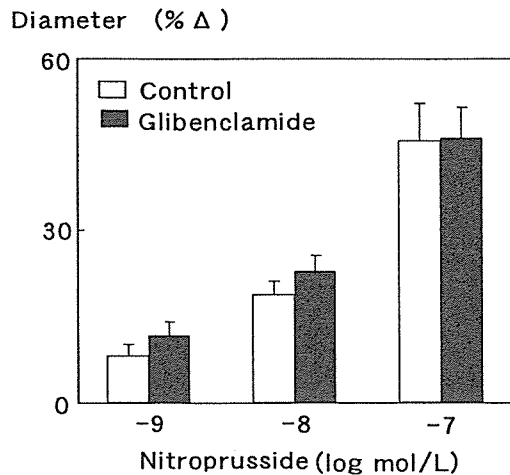


Fig. 5

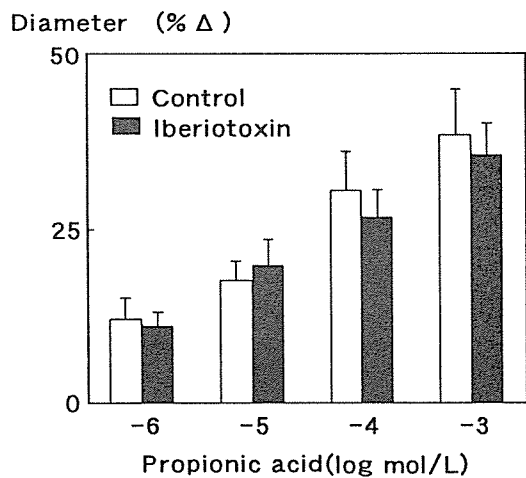


Fig. 6

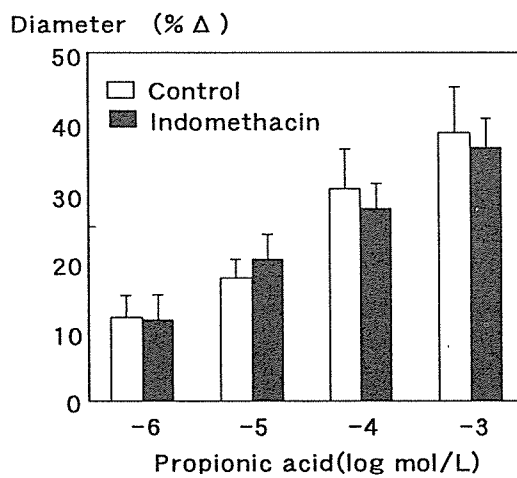
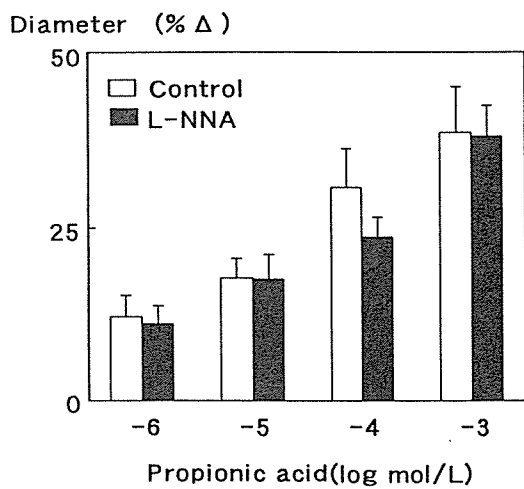


Fig. 7



---

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

第2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社