

200/0654

厚生科学研究費補助金
脳科学研究事業

静脈内投与用脳卒中・脊髄損傷治療薬の開発に関する研究

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 阪中 雅広

平成14（2002）年 3月

目 次

I. 総括研究報告

静脈内投与用脳卒中・脊髄損傷治療薬に関する個体レベルの研究 ----- 1

阪中雅広

II. 分担研究報告

脳卒中・脊髄損傷治療薬による Bcl-x_L ならびに VEGF 発現促進作用の解析 ----- 4

大西丘倫

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 7

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 8

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

総括研究報告書

静脈内投与用脳卒中・脊髄損傷治療薬に関する個体レベルの研究

主任研究者 阪中雅広 愛媛大学医学部解剖学第二講座教授

研究要旨

我々はこれまでラットの脳梗塞・脊髄損傷モデルを用いてジンセノサイド Rb1（コード名：S2819）の効果を解析してきたが、今後 S2819 の作用機構などを遺伝子改変動物を用いて解析するためには、まず前提としてマウスにおける個体レベルの効果判定が不可欠となる。そこで平成 13 年度は、マウスの中大脳動脈本幹永久閉塞モデルに対する S2819 単回静脈内投与の効果をまず判定した。次に、S2819 の静脈内投与が *in vitro* の実験結果と同様に、神経組織における Bcl-x_L 発現を *in vivo* でも誘導するかどうかを脊髄損傷ラットを用いて検討した。その結果、マウス中大脳動脈本幹永久閉塞モデルの脳梗塞体積は、S2819 の単回静脈内投与によりコントロールの 3 分の 1 程度に縮小した。また、S2819 の静脈内投与により中枢神経組織（脊髄組織）の Bcl-x_L 発現が *in vivo* で上昇し、神経麻痺が顕著に改善することが判明した。以上のことより、S2819 は静脈内投与用脳卒中・脊髄損傷治療薬の候補物質として有望な化合物であることが明らかとなった。

分担研究者氏名 大西丘倫
所属機関 愛媛大学医学部
職名 教授

る。

B. 研究方法

A. 研究目的

我々はこれまでジンセノサイド Rb1（コード名：S2819）の静脈内投与が、ラットの中大脳動脈皮質枝永久閉塞モデル（皮質梗塞モデル）及び脊髄損傷モデルに対して優れた治療効果を示すこと、ならびに S2819 が *in vitro* で Bcl-x_L 及び血管内皮増殖因子（VEGF）発現を誘導し、抗アポトーシス作用又は血管再生作用を示すことを見出してきた（国際特許出願公開番号：WO00/37481、WO00/48608、WO01/15717；出願人：科学技術振興事業団）。

これらの研究成果を踏まえて、平成 13 年度は（1）マウスの中大脳動脈本幹永久閉塞モデル（すなわち皮質線条体梗塞モデル）に対する S2819 単回静脈内投与の効果判定、（2）マウスにおける脊髄損傷モデルと静脈内持続投与技術の確立、（3）S2819 静脈内投与による Bcl-x_L 発現誘導を研究目的とした。これらの研究を将来的には、遺伝子改変マウスを用いた *in vivo* の作用機構解析に結びつけたいと考えてい

吸入麻酔下でマウスの中大脳動脈本幹永久閉塞モデルを通常のスレッドを用いて作成したのち、同モデルに S2819（12 μ g 又は 60 μ g）を単回静脈内投与して、その効果を TTC 染色により判定した。マウスの脊髄損傷モデルについては、吸入麻酔下で下位胸髄に 10g の圧力を 5 分間負荷することにより作成を試みた。さらに、S2819 の静脈内投与が *in vivo* で中枢神経組織の Bcl-x_L 発現を誘導することを、脊髄損傷ラットを用いてしらべた。脊髄損傷ラットは吸入麻酔下で下位胸髄に 20g の重錘を 20 分間負荷することにより作成した。なお、Bcl-x_L 発現を解析するために、RT-PCR 及びウエスタンブロット法を用いた。

（倫理面への配慮）

本研究は、愛媛大学医学部動物実験指針に基づいて実施されたものである。

C. 研究成果

中大脳動脈本幹永久閉塞後、生理食塩水を静脈内投与したマウス（コントロール）では、TTC で染色されない脳梗塞病変が

安定的に出現した。一方、マウス中大脳動脈本幹永久閉塞モデルの脳梗塞体積は、S2819の単回静脈内投与によりコントロールの3分の1程度に縮小した。

マウスの脊髄損傷モデルを作成することはほぼ可能となったが、ラットの脊髄損傷モデルよりも病変に個体差がみられるので、今後薬効評価系として利用するには今少し同モデルを改善する余地があることが判明した。一方、マウスに対する薬物静脈内持続投与技術の確立については順調に研究が進行した。

S2819の静脈内投与により中枢神経組織のBcl-x_L発現がin vivoで上昇することが脊髄損傷ラットを用いた研究で判明した。さらに、S2819を静脈内投与した脊髄損傷ラットでは、Bcl-x_L発現誘導に伴い、対麻痺の改善もみられた。

D. 考察

以上の研究結果より、S2819は脳卒中急性期にはBcl-x_L発現誘導を介して神経細胞を保護し、その後VEGF発現誘導を介して血管再生を引き起こし、脳血流を長期にわたり改善するものと考えられる。なお、我々の最近の研究によりS2819のBcl-x_L発現誘導作用は、エリスロポエチン、インターロイキン3及びプロサポシンの作用と類似することが判明した(研究発表論文参照)。

しかし、マウスの脊髄損傷モデルについては個体差が大きいため、現時点では病態解析のために利用できても薬効評価系としては利用しにくいことが判明した。おそらく、胸髄への圧負荷の程度と時間が不十分であったため個体差が生じたと思われるので、今後、圧負荷の手技を改善することが肝要と考えられる。

本研究は、静脈内投与可能な優れた脳梗塞・脊髄損傷治療薬の候補物質とその作用を世界に先がけて見出したものであるため、学術的にも国際的にも評価に耐え得るものと考えられる。また、本研究成果は、将来脳卒中・脊髄損傷の治療に結びつくことが期待されることから、社会的意義の大きいものと思われる。

今後、安定したマウス脊髄損傷モデル、遺伝子改変マウスを用いてS2819静脈内投与の効果解析するとともに、S2819の

in vivoでの血管再生作用の検討及びS2819の効率的精製法の確立を急ぐ予定である。さらに、マウスに対する薬物静脈内持続投与技術が確立されれば、今後種々の遺伝子改変マウスを用いた薬効解析に道が開かれるものと期待される。

E. 結論

ジンセノサイドRb1(コード名:S2819)の静脈内投与は、Bcl-x_L発現を介して、脳卒中急性期において強力に神経細胞を保護する。さらにS2819は、そのVEGF発現を誘導して、脳卒中病変において破綻した血管網を再生せしめ、脳血流を修復することにより、脳卒中患者の長期予後を改善すると考えられる。なお、脊髄損傷においては、S2819の静脈内投与はBcl-x_L発現誘導を介して、オリゴデンドロサイト及び神経細胞のアポトーシスを抑止することにより治療効果を発揮すると推測される。従って、S2819は静脈内投与用脳卒中・脊髄損傷治療薬の候補物質として有望な化合物であることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

①Morita F, Wen T-C, Tanaka J, Hata R, Desaki J, Sato K, Nakata K, Ma Y-J, Sakanaka M, Protective effect of a prosaposin-derived, 18-mer peptide on slowly progressive neuronal degeneration after brief ischemia. *J Cereb. Blood Flow Metab.*, 21: 1295-1302, 2001.

②Wen T-C, Sadamoto Y, Tanaka J, Zhu P-X, Nakata K, Ma Y-J, Hata R, Sakanaka M, Erythropoietin protects neurons against chemical hypoxia and cerebral ischemic injury by up-regulating Bcl-x_L expression. *J. Neurosci Res*, 67: 795-803, 2002.

③Sugishita H, Kuwabara Y, Toku K, Doi L, Yang L, Mitoma J, Furuya S,

Hirabayashi Y, Maeda N, Sakanaka M, Tanaka J. L-Serine regulates the activities of microglial cells that express very low level of 3-phosphoglycerate dehydrogenase, an enzyme for L-Serine biosynthesis. **J. Neurosci. Res.**, 64: 392-401, 2001.

④Zhang B, Yang L, Konishi Y, Maeda N, Sakanaka M, Tanaka J. Suppressive effects of phosphodiesterase type IV inhibitors on rat cultured microglial cells: comparison with other types of cAMP-elevating agents. **Neuropharmacology**, 42: 262-269, 2002.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

分担研究報告書

脳卒中・脊髄損傷治療薬による Bcl-x_L ならびに VEGF 発現促進作用の解析

分担研究者 大西丘倫 愛媛大学医学部脳神経外科学講座教授

研究要旨

プロモーターアッセイにより、ジンセノサイド Rb1（コード名：S2819）からなる脳卒中・脊髄損傷治療薬が転写因子 STAT5 及び HIF-1 (hypoxia inducible factor-1) の活性化を介して Bcl-x_L 及び VEGF 発現を促進することが判明した。従って、S2819 の抗アポトーシス作用ならびに血管再生作用の分子機構が転写因子レベルで明らかとなった。本研究により、次年度以降の遺伝子改変マウスを用いる研究の足掛かりが得られた。

A. 研究目的

これまでジンセノサイド Rb1（コード名：S2819）は、in vitro で Bcl-x_L 発現及び血管内皮増殖因子(VEGF)発現を誘導し、抗アポトーシス作用又は血管再生作用を示すことが示唆されている（国際特許出願公開番号：WO00/37481, WO00/48608, WO01/15717；出願人：科学技術振興事業団）。

これらの研究成果を踏まえて、平成13年度は S2819 がいかなる転写因子の活性化を介して Bcl-x_L 発現及び VEGF 発現を誘導するのかを検討した。

B. 研究方法

本研究では各種予備実験を経たのち、転写因子 STAT5 及び HIF-1 に的を擽って本格的実験を実施した。このため、遺伝子導入が比較的容易なアストロサイトを用いて以下の実験を実施した。始めに、Bcl-x プロモーター/ルシフェラーゼプラスミドを作成した。すなわち C57BL/6 マウスの尾組織より抽出したDNAを鋳型として、下記 Primer LF1, Primer LR1 および pyrobest DNA polymerase (Takara)を用いて30サイクルの PCR 反応を行った。反応溶液を QiaExII Gel extraction kit (Qiagen)にて精製後、制限酵素 XhoI および HindIII で消化、2%アガロースゲルにて電気泳動し、600bp の DNA 断片を切り出した。得られたゲルスライスから、QiaExII Gel extraction kit を用いて DNA

断片を抽出し、pGL-2Basic vector (Promega)に挿入した(Bcl-x promoter L)（下図参照）。

同様にマウス DNA を鋳型として、Primer RF1 と Primer RR1 を用いて15サイクルの PCR 反応を行った。反応溶液を1000倍希釈し（溶液 A）、それを鋳型として Primer RF2 と Primer RR2 で30サイクルの PCR 反応を行い、SacI と BamHI で消化し、pGL-2Basic vector の SacI/BgIII 部位に挿入した (Bcl-x promoter R)（下図参照）。

また溶液 A を鋳型とし、Primer RF1 と Primer Mut-R, Primer Mut-F と Primer RR1 を用いてそれぞれ30サイクルの PCR 反応を行った。2%アガロースゲルにて電気泳動し、それぞれ312bp と309bp の DNA 断片を切り出し、QiaExII Gel extraction kit を用いて DNA 断片を抽出した。抽出した DNA 断片を重量比にて1：1で混合後、それを鋳型として Primer RF2 と Primer RR2 で30サイクルの PCR 反応を行い、SacI と BamHI で消化し、pGL-2Basic vector の SacI/BgIII 部位に挿入した (Bcl-x promoter R(変異))（下図参照）。

用いたプライマー(primer)

Primer LF1 5' -
ATACTTCCCAGCCGCAAACGC-3'

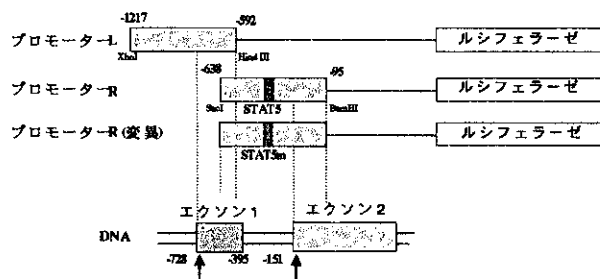
Primer LR1 5' -
CAGAAGGCGACAGAGGAATTGC-3'

Primer RF1 5' -
GGGGTGGGGGAAATTACAC-3'

Primer RR1 5' -
GGGCTCAACCAGTCCATTGTC-3'

Primer RF2 5' -
 CCACGAGCTCGATCTGGTTCGATGGAG
 GAAC-3'
 Primer RR2 5' -
 AAACACCTGCTCACTTACTGGGTC-
 3'
 Primer Mut-F 5' -
 AGGCATTGAGGATAAAAAGGG-3'
 Primer Mut-R 5' -
 CCCTTTTATCCTCAATGCCT-3'

Bcl-xプロモーター/ルシフェラーゼプラスミドの概略



アストロサイトの初代培養は以下の要領で実施した。生直後の Wistar ラットよりアストロサイトを単離し、培養用フラスコで培養し、2週間後に 12 well plate に植え替えた。なお、アストロサイトは既発表論文(Fujita, H. et al., *Glia*, 18, 269-281, 1996; Tanaka, J. et al., *Glia*, 20, 23-37, 1997; Tanaka, J. et al., *Glia*, 24, 198-215, 1998)に記載された方法に準じて生直後ラット脳より分離した。

遺伝子導入とルシフェラーゼアッセイは以下の要領で実施した。リポフェクタミン (Lipofectamine) (Invitrogen)を用いて、10% FCS (牛胎仔血清) 存在下にて5時間のトランスフェクションを行った。その後培地を新しいものに置き換えて37℃で一晩培養し、翌朝100 fg/mlのS2819を加え37℃で24時間培養した。細胞表面をPBSで2回洗浄後、細胞をLuciferase Cell Culture Lysis Reagent (Promega) 100 μlで溶解した。溶液中のルシフェラーゼ量は Luciferase Assay System (Promega)およびルミネッセンサーJNR (ATTO)を用いて測定した。

次にジンセノサイド Rb1 が転写因子 HIF-1 の活性化を介して、VEGF 発現誘導をもたらすかどうかをしらべた。このため、まず pGL-3 プロモーターベクター (Promega)のマルチプルクローニングサイ

ト上の BclII 部位に「TACGTG」の6回繰り返し配列、すなわち(TACGTG)₆を挿入した。ちなみに、「TACGTG」は、転写因子 HIF-1 と結合する DNA 上の HRE (hypoxia-response element)の共通塩基配列(consensus sequence)である。本研究では(TACGTG)₆を挿入した pGL-3 プロモーターベクターを HRE-ルシフェラーゼプラスミドと呼ぶこととする。なお、対照としては、pGL-3 プロモーターベクター (プラスミド)を用いた。

アストロサイトの初代培養は以下の要領で実施した。生直後の Wistar ラットより公知の方法でアストロサイトを単離し、培養用フラスコで培養し、2週間後に 12 well plate に植え替えた。なお、アストロサイトは既発表論文(Fujita, H. et al., *Glia*, 18, 269-281, 1996; Tanaka, J. et al., *Glia*, 20, 23-37, 1997; Tanaka, J. et al., *Glia*, 24, 198-215, 1998)に記載された方法に準じて生直後ラットの脳より分離した。また、胎生17日のWistarラット大脳皮質より神経細胞を単離し、ポリ-L-リジンをコートした12Well plate 上で培養した。培養5日目の神経細胞を遺伝子導入に使用した。

遺伝子導入とルシフェラーゼアッセイは以下の要領で実施した。1穴あたり1 μgのプラスミド DNA (すなわち HRE ルシフェラーゼプラスミド又は pGL-3 プロモーターベクター)と5 μlの Lipofectamine (Invitrogen)を用いて、10%FCS 存在下にて5時間のトランスフェクション (遺伝子導入)を行った。その後培地を新しいものに置き換えて37℃で一晩培養し、翌朝0又は100 fg/mlのS2819を加え37℃で24時間培養した。細胞表面を PBS (phosphate-buffered saline)で2回洗浄後、細胞を Luciferase Cell Culture Lysis Reagent (Promega) 100 μlで溶解した。溶液中のルシフェラーゼ量は Luciferase Assay System (Promega)およびルミネッセンサーJNR (ATTO)を用いて測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は、愛媛大学医学部動物実験指針に基づいて実施されたものである。

C. 研究成果

Bcl-x プロモーター-Lをトランスフェク

ションしたアストロサイトに S2819 を投与しても、コントロール (S2819 非投与例) と比べてルシフェラーゼ活性に変化は認められなかった。一方、Bcl-x プロモーター R をトランスフェクションしたアストロサイトに S2819 を投与すると、コントロール (S2819 非投与例) と比べて有意にルシフェラーゼ活性が上昇した。図に示すごとく Bcl-x プロモーター R に STAT5 結合配列類似の配列が存在するが、Bcl-x プロモーター L にはそのような配列は存在しない。従って、S2819 は、Bcl-x 遺伝子のエクソン 2 (Exon 2) の上流に存在する転写因子 STAT5 の活性化を介して、レポーター遺伝子であるルシフェラーゼ活性を上昇せしめると考えられた。一方、変異型 (ミュレーションを有する) STAT5 すなわち STAT5m を含む Bcl-x プロモーター R (変異) (図参照) をアストロサイトにトランスフェクションしたのちに S2819 を投与しても、コントロール (S2819 非投与例) と比べてルシフェラーゼ活性に変化はみられなかった。

HIF-1 のプロモーターアッセイにおいても S2819 100 fg/ml 添加例では、非添加例に比べてルシフェラーゼの量が有意に増加した。

D. 考察

以上のことより、S2819 は Bcl-x 遺伝子のエクソン 2 (Exon 2) の上流に結合部位が存在する転写因子 STAT5 の活性化を介して、レポーター遺伝子であるルシフェラーゼの産生をアップレギュレーションせしめると言える。本実験では、Bcl-x_L を、測定が容易なレポーター遺伝子 (ルシフェラーゼ) に置き換えた形でプロモーターアッセイを実施したが、実際の細胞においては、S2819 は転写因子 STAT5 の活性化を介して、Bcl-x_L 遺伝子の発現を促進することが本実験で明らかとなった。おそらく、S2819 は JAK2 の酵素活性をも上昇せしめて、STAT5 をリン酸化し、リン酸化 STAT5 のホモダイマー形成ならびに核内移行を促進するものと考えられる。その結果、STAT5 が転写因子として機能すると考えられる。

さらに、S2819 は神経細胞やアストロサイトの転写因子 HIF-1 を活性化し、HIF-1 と DNA 上の HRE (hypoxia-response

element) との結合を惹起することにより、VEGF 発現を誘導すると考えられた。

E. 結論

ジンセノサイド Rb1 (コード名: S2819) は、転写因子 STAT5 の活性化により Bcl-x_L 発現を誘導し、もって脳卒中急性期において強力に神経細胞を保護する。さらに S2819 は、その後転写因子 HIF-1 の活性化により VEGF 発現を誘導し、脳血管を再生せしめると言える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Morita F, Wen T-C, Tanaka J, Hata R, Desaki J, Sato K, Nakata K, Ma Y-J, <u>Sakanaka M.</u>	Protective effect of a prosaposin-derived, 18-mer peptide on slowly progressive neuronal degeneration after brief ischemia.	J. Cereb. Blood Flow Metab.	21	1295-1302	2001
Wen T-C, Sadamoto Y, Tanaka J, Zhu P-X, Nakata K, Ma Y-J, Hata R, <u>Sakanaka M.</u>	Erythropoietin protects neurons against chemical hypoxia and cerebral ischemic injury by up-regulating Bcl-x _L expression.	J. Neurosci. Res.	67	795-803	2002
Sugishita H, Kuwabara Y, Toku K, Doi L, Yang L, Mitoma J, Furuya S, Hirabayashi Y, Maeda N, <u>Sakanaka M.</u> Tanaka J.	L-Serine regulates the activities of microglial cells that express very low level of 3-phosphoglycerate dehydrogenase, an enzyme for L-Serine biosynthesis.	J. Neurosci. Res.	64	392-401	2001
Zhang B, Yang L, Konishi Y, Maeda N, <u>Sakanaka M.</u> Tanaka J.	Suppressive effects of phosphodiesterase type IV inhibitors on rat cultured microglial cells: comparison with other types of cAMP-elevating agents.	Neuropharmacology	42	262-269	2002

20010654

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。