HOKKAIDO UNIVERSITY

| | |
|---|---|
| Title | 血液脳脊髄関門の機能保護を介した中枢神経保護薬の開発［論文内容及び審査の要旨］ |
| Author(s) | 鈴木, 裕貴 |
| Description | 配架番号：2539 |
| Degree Grantor | 北海道大学 |
| Degree Name | 博士(医学) |
| Dissertation Number | 甲第14074号 |
| Issue Date | 2020-03-25 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/78023 |
| Rights(URL) | https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/ |
| Type | doctoral thesis |
| File Information | Yuki_Suzuki_abstract.pdf, 論文内容の要旨 |

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

# 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏名　鈴　木　裕　貴

## 学 位 論 文 題 名

血液脳脊髄関門の機能保護を介した中枢神経保護薬の開発
(Development of novel neuroprotection drugs for CNS trauma by targeting preservation of blood-brain spinal cord barrier function)

【背景と目的】

脳・脊髄損傷などの外傷性中枢神経損傷では一次損傷に引き続き二次損傷が起こり、高度機能障害が生じるが、中枢神経の再生能力は低く、近年の医療の発展にも関わらず、未だ有効な治療方法はなく、新規治療方法の開発が求められている。血液脳脊髄関門（Blood-Brain Spinal Cord Barrier : BBSCB）の破綻は二次損傷を拡大させ、細胞障害性物質および炎症細胞が損傷周囲組織へ浸潤する。BSCBB の破綻を防げれば、二次損傷を軽減できることがわかっていたが、その具体的方法は未だ確立されておらず、血管内皮細胞保護薬に関する研究もほとんどなかった。

以上より、我々は BBSCB に着目し、その主要構成細胞である脳脊髄血管内皮細胞の保護薬は、BBSCB の破綻を防ぎ、外傷性中枢神経損傷後の二次損傷を防ぐと仮説を立て、一連の研究を行った。本研究の目的は、1）脳脊髄血管内皮細胞保護効果を持つ薬剤探索のための high-throughput screening assay (HTSA)を確立すること、2）新規 HTSA を用いた in vitro スクリーニングにより候補化合物を同定すること、さらに 3）候補化合物の効果を in vivo により検証することである。

【方法】

1）HTSA 確立の条件検討をするため、まずヒト脳血管内皮細胞株（hCMEC/D3）を 96 well plate で培養し、過酸化水素（$H_2O_2$）を細胞障害性負荷として添加した。$H_2O_2$ の濃度が、細胞活性、細胞毒性、細胞死に与える影響を、各々PrestoBlue、LDH assay、Propidium Iodide（PI）染色によって評価し、HTSA に最適な負荷条件を確定した（各 N=3/群）。さらに、スクリーニング薬剤の溶解に使用する Dimethyl sulfoxide （DMSO）の細胞活性に影響を検証した（N=9/群）。

2）HTSA の妥当性、信頼性を評価するため、自動分注装置を使用して最適な負荷条件を再現し、HTSA の評価基準である、Z'-factor, signal/background ratio（S/B ratio）, coefficient of variation（CV）を算出した（N=4×3sets/群）。

3）新規 HTSA を用いて、本学が保有する既存薬 1,600 種のスクリーニングを実施した。2SD 以上の細胞活性を示した薬剤には再現性試験を 3 回行い、少なくとも 1 回以上再現性があったものをヒット薬剤とした。ヒット薬剤のうち早期臨床応用可能な薬剤を選定し、候補薬剤として更なる試験を進めた。

4）候補薬剤の濃度依存性を、候補薬剤を $H_2O_2$ 負荷と同時に投与して、検討した（N=4/群）。また、異なる細胞傷害性負荷として無酸素・無糖（oxygen-glucose deprivation; OGD）条件下での薬剤の血管内皮細胞保護効果を評価した（N=5/群）。

5）候補薬剤の in vitro BBSCB 機能保護効果を検討するため、ラット脳初代培養細胞による in vitro BBSCB 共培養モデルを作製し、OGD 負荷条件下に、経上皮電気抵抗（Trans-endothelial electrical resistance: TEER）と sodium fluorescein（Na-F）透過性を測定した。また、Western blotting 法で Tight-junction（TJ）protein の発現を検討した。

6）中枢神経損傷後の BBSCB 機能保護効果を検討するため、成体雄性 C57BL/6 マウスの、左大脳皮質損傷（外傷性脳損傷モデル）、または第 4 頚椎高位の脊髄後索損傷（脊髄損傷モデル）を wire-knife を使用して作成した。候補薬剤または生理食塩水を損傷作成前日と損傷直後に投与し、損傷部周囲の IgG 漏出範囲を組織学的に定量した（N=6/群）。

7）中枢神経損傷後の神経保護効果を検討するため、成体雄性 C57BL/6 マウスに前述と同様の脊髄損

傷モデルを作成し、候補薬剤または生理食塩水を 1 週間投与した。8 週後に損傷範囲と神経細胞死の範囲を組織学的に定量し、DigiGait 歩行解析システムを使用した歩行解析を行った（N=12/群）。
8）新規 HTSA を用い、本学が保有する北大オリジナル化合物 2,385 種のスクリーニングを行った。既存薬の場合と同様に、2SD 以上の細胞活性を示したヒット候補化合物は再現性試験を 3 回行い、少なくとも 1 回以上再現性があったものをヒット化合物とした。

【結果】
1）$H_2O_2$ 濃度 500 μM 以上、負荷時間 6 時間で、脳血管内皮細胞死を観察した。一方、細胞活性は 350 μM から低下を開始し、細動毒性は、400 μM から上昇を示し、PrestoBlue を使用した細胞活性が、一番早期に細胞の変化を検知することが判明した。
2）自動分注装置を用いた HTSA で、$H_2O_2$ 濃度 450 μM において、Z'-factor 0.75、S/B ratio 2.9、CV 4% と HTSA の妥当性､信頼性の基準（Z'-factor ≥ 0.5, S/B ratio ≥ 2, CV ≤ 0.1）を最も高い水準でクリアした。
3）1,600 の既存薬剤をスクニーニングした結果、ヒット薬剤は 44 種（2.8%）、さらに再現性試験によって、37 種（2.3%）となった。ヒット薬剤のうち、安全かつ安定した国内承認薬剤である Berberine は早期臨床応用に有利と考え、優先的に更なる試験に進めた。
4）Berberine は $H_2O_2$ 負荷との同時投与において、濃度依存的に脳血管内皮細胞保護効果を有した。さらに OGD 条件下でも保護効果を示した。
5）Berberine は in vivo BBSCB モデルで、OGD 負荷条件下の TEER を有意に増加させ、Na-F 透過性を有意に低下させた。さらに ZO-1, VE-cadherin, occludin, claudin-5 の発現を有意に上昇させた。このことは、Berberine は in vivo BBSCB の機能保護効果があることを示している。
6）Berberine 投与群と Control 群を比べ、外傷性脳損傷モデル、脊髄損傷モデルともに損傷の大きさには差はなかったものの、Berberine 投与群で損傷部周囲の IgG 漏出範囲が有意に小さかった。このことは、Berberine は中枢神経損傷モデルにおいて、BBSCB の機能保護効果があったことを示している。
7）Berberine 投与群と Control 群を比べ、頚髄損傷部の大きさには差はなかったものの、損傷範囲と神経細胞死の範囲は Berberine 投与群で有意に小さかった。また、歩行解析では、両群間で粗大運動に関するパラメーターには差を認めなかったが、協調運動に関するパラメーターで Berberine 投与群が有意に改善を認めた。
8）北大オリジナルの 2,385 化合物をスクリーニングした結果、ヒット化合物は 59 種（2.5%）あったが、再現性試験を経て 45 種（1.9%）に絞り込まれた。また、これらの化合物のうち、化合物 A の類縁体の一群が 7 剤あった。

【考察】
本研究では、まず脳血管内皮細胞保護効果を持つ薬剤を探索するための HTSA を確立した。一般的に HTSA の開発には、高い効率、再現性、信頼度、感度が必要であり、特に細胞を用いた場合は、再現性が低いため確立は困難とされているが、徹底的な単純化と条件検討を行い、専門機器の使用、さらに創薬センターなどの専門家と連携することで、本 HTSA の開発に成功した。また、本 HTSA は、1）ヒト細胞株の使用、2）多くの中枢神経疾患で共通する酸化ストレスの使用、3）血管内皮細胞の使用の 3 点により、中枢神経外傷だけでなく、その他の中枢神経疾患でも、BBSCB 保護効果を有する薬剤を探索できる可能性がある。
本研究で同定された候補薬剤は、既存薬であるため安全性が担保されており早期臨床応用が可能である。また、候補化合物は、臨床応用に向けた安全性、濃度設定など最適化が必要であるが、新規薬剤発見や既存薬以上の効果を示す可能性があり、血管内皮細胞保護などの新規効能の発見に繋がる。

【結論】
我々は、脳脊髄血管内皮細胞保護効果を持つ化合物探索のための HTSA を確立した。新規 HTSA を用いたスクリーニングにより､Berberine と化合物 A を含む､37 薬剤と 45 化合物がヒットした｡Berberine は in vitro, in vivo で BBSCB 保護効果を示し、in vivo で神経保護効果も示した。我々が開発した HTSA は BBSCB 保護を介した新規中枢神経保護薬の探索に有用であり、また Berberine は新規中枢神経保護治療薬となる可能性が示唆された。