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_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

（様式 16）

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称　　博士（医　学）　　氏名　　鈴　木　裕　貴

	主査	教授	田　中　真　樹
審査担当者	副査	教授	生　駒　一　憲
	副査	教授	神　谷　温　之
	副査	教授	森　本　裕　二

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)

脳・脊髄などの中枢神経に受傷すると、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。しかし、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。

申請者は、血液脳脊髄関門（Blood-brain spinal cord barrier: BBSCB）の破綻を防ぐことで、二次損傷が軽減できることに着眼した。BBSCB 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軽減するとの仮説を立て、一連の研究を行った。本研究では、脳脊髄血管内皮細胞保護効果を持つ薬剤を効率よく探索するための high-throughput screening assay （HTSA）を確立した。そして、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した。さらに候補化合物 Berberine が in vitro BBSCB 破綻モデルおよび脳外傷、脊髄損傷の両モデルにおいて BBSCB 保護効果を、さらに脊髄損傷モデルにおいて神経保護効果を有することを示した。これらの結果から、新規開発した HTSA が 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、Berberine が中枢神経外傷に対する新規神経保護治療薬となる可能性があると結論づけた。

審査にあたり，まず副査の生駒一憲教授からは、血管内皮細胞以外にBBSCBを構成する細胞の種類にはどのようなものがあるか、そして本研究で血管内皮細胞を標的とした理由について質問があった。申請者はBBSCBが周皮細胞やアストロサイトが血管内皮細胞を取り巻く形で構成されていると回答した。また、血管内皮細胞はその主たる構成細胞でありかつtight-junctionタンパク質を発現しているため、本研究では血管内皮細胞を標的としたと回答した。さらにBerberineの濃度依存性試験結果とin vivo 濃度設定方法に関して質問があった。申請者は、過去の報告でのin vivo汎用濃度を参考にしつつ、濃度依存性試験で最適濃度を検証・設定し、さらに同試験で高濃

度では細胞毒性を有することも確認したと回答した。

副査の神谷温之教授からはBBSCB保護による疾患治療効果の程度、細胞株種の選択理由、損傷の周囲部を定量評価した理由について質問があった。申請者は、近年、BBSCBの破綻が種々の中枢神経疾患の主たる原因または増悪に関与していることが報告されていることに言及した上で、BBSCB破綻の関与の程度により、各疾患の治療効果が異なる可能性があること、そして少なくとも本研究の外傷性中枢神経損傷では受傷後の二次損傷による病態増悪は予防しうることを回答した。また、本研究でhCMEC/D3細胞株を選択した理由は、1）ヒト由来であるため、2）初代培養細胞のもつ表現型を保持しているため、3）最も汎用されている細胞株であるためと説明した。さらに、一次損傷ではダメージを受けなかった損傷周囲部が二次損傷で影響をうけるため、損傷周囲部の定量を行ったと回答した。

副査の森本裕二教授からは、中枢神経損傷の病態の中でもBBSCBに注目した理由と、BBSCBの中での最も重要なターゲットに関する質問があった。申請者は過去の研究ではBBSCBの薬剤透過性に関する研究はあるものの、BBSCBを治療対象とする研究は少なかったこと、さらにdrug deliveryの観点から、本研究で同定された薬剤は、血中にさえ存在すれば直接血管内皮細胞に作用し、BBSCBを通過させなくともよいという利点を説明した。また、BBSCBの輸送経路には経細胞経路と傍細胞経路がありどちらも重要なターゲットであるが、後者を制御するtight-junctionタンパク質の発現は血管内皮細胞がストレスを受けることで低下することが分かっているため、両者に関わる血管内皮細胞自体の保護に注目したと回答した。

最後に主査の田中真樹教授から、生理的な反応としてのBBSCB破綻を抑制してしまう可能性について質問があった。申請者はその潜在的可能性があるが、BBSCB破綻が過剰に起こっていることが病態や症状の増悪を現にもたらし、また現在の医療では二次損傷を過剰に抑制するまでの効果が得られる治療方法がないと回答した。また、スクリーニング時の細胞活性が、既存薬に比べて化合物で低い傾向があることに関して質問があり、申請者は化合物が既存薬と比べて細胞毒性が高いものがより多く含まれていることがその原因であると回答した。また、既存の脳保護薬とのin vivo実験の比較や、Sham群との歩行解析比較により、本研究で同定された薬剤の効果をさらに検証できる可能性があるとのコメントがあった。

この論文は，脳脊髄血管内皮細胞保護効果を持つ薬剤探索のための新規HTSAを確立し、脳脊髄血管内皮細胞の保護薬が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ことを示した点において高く評価され，今後のBBSCB保護を介した新規中枢神経保護薬の開発が期待される。

審査員一同は，これらの成果を高く評価し，大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ，申請者が博士（医学）の学位を受けるのに充分な資格を有するものと判定した。