

# 博士論文要旨

## 脳梗塞及び脳出血病態の解明と Neurovascular unit を標的とした新規治療薬の探索に関する研究 今井 貴彦

脳梗塞や脳出血を代表とする脳卒中は、高い死亡率と片麻痺や高次機能障害などの後遺症を引き起こす重篤な疾患であり、日本人の死因の第4位及び寝たきり原因の第1位を占める。現在の脳卒中治療は、降圧薬による血圧管理や抗凝固薬による血栓予防などの対症療法に頼る場合が多く、脳保護薬としてはフリーラジカル捕捉薬のエダラボンのみが利用されている。しかし、エダラボンは腎障害や感染症などの副作用が懸念されており、新規治療薬の開発が望まれている。

上記の脳卒中病態の発症や悪化においては酸化ストレスが密接に関与するため、本研究では、*in vitro* 及び *in vivo* において各種脳卒中病態モデルを作製し、フリーラジカル捕捉薬や Nrf2 活性化薬による保護作用を検討した。さらに、酸化ストレスの原因となる ROS の供給源として、鉄の細胞内蓄積に着目し、鉄を含む血液成分による BBB 構成細胞（血管内皮細胞及びペリサイト）や神経細胞への細胞毒性の評価やそれらに対する鉄キレート剤の作用について検討を行った。

### 1. マウス脳梗塞及び脳出血病態モデルに対するフリーラジカル捕捉薬の作用

フリーラジカル捕捉薬 NSP-116 は、*in vitro* H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 誘発性ヒト神経芽細胞腫障害モデルにおいて細胞保護作用を示した。また、NSP-116 の経口投与は、中大脳動脈閉塞術 (MCAO) を用いたマウス脳梗塞モデル及びコラゲナーゼ注入によるマウス脳出血モデルに対して、梗塞巣や出血領域の拡大と神経症状の悪化を抑制した。NSP-116 は、脳梗塞及び脳出血病態に対して脳保護作用を示すことを明らかにした。

### 2. マウス出血性脳障害モデルに対する Nrf2 活性化薬の作用

ワルファリン投与により易出血状態を誘導したマウスに MCAO を施して作製した出血性梗塞モデルに対する Nrf2 活性化薬 BARD の保護作用を検討した。再灌流時の BARD 静脈内投与は、出血

性梗塞病態下での出血量増加や神経症状の悪化、並びに BBB 透過性亢進を抑制した。BARD 投与は梗塞巣周辺領域に存在する血管内皮細胞及びペリサイトに Nrf2 を高発現させた。加えて、自己血注入によりマウス脳出血モデルを作製し、新規 Nrf2 活性化薬 RS9 の保護作用を検討した。RS9 の頻回投与により脳出血後の脳浮腫や神経症状の悪化を抑制した。Nrf2 の活性化は脳虚血再灌流に伴う出血リスクの低減や出血後の二次的な神経症状の悪化を抑制することが示唆された。

### 3. 脳出血病態における細胞内二価鉄蓄積の関与と鉄キレート剤の作用

血腫から放出される Hb やその代謝産物（鉄、ヘミン）が BBB 及び神経細胞に及ぼす影響、並びに鉄キレート剤による保護作用を検討した。Hb や代謝産物の処置により、ヒト脳毛細血管内皮細胞及びペリサイトにおいて細胞内二価鉄蓄積や ROS 産生亢進、細胞障害が生じた。ヘミンの脳実質内投与は BBB 透過性亢進や神経症状の悪化を招いたが、二価鉄キレート剤ピピリジルの投与により悪化は抑制された。また、三価鉄キレート剤デフェラシロクスは、ヘミンによる細胞障害や脳出血後の神経症状の悪化を抑制した。脳出血後の BBB 及び神経細胞における鉄蓄積亢進を鉄キレート剤により制御することは、脳出血後の二次性脳障害に対して有効な治療法となる可能性が考えられる。

以上より、フリーラジカル捕捉薬や Nrf2 活性化薬により酸化ストレスを減弱させることは、細胞障害やその後の BBB 透過性亢進、神経症状の悪化を抑制することを明らかにした。加えて、細胞内二価鉄蓄積が、酸化ストレスを助長することが明らかになり、鉄キレート剤の適応は脳卒中病態における新規治療戦略の一つとなることが示唆された。

#### 【略語】

BARD	: bardoxolone methyl
BBB	: blood-brain barrier
Hb	: hemoglobin
MCAO	: middle cerebral artery occlusion
Nrf2	: NF-E2-related factor 2
ROS	: reactive oxygen species

## 論文審査結果の要旨

氏名（本籍）	今井 貴彦 ( 群馬県 )
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	甲 第 180 号
学位授与年月日	令和2年3月10日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項該当者
学位論文の題名	脳梗塞及び脳出血病態の解明と Neurovascular unit を標的とした新規治療薬の探索に関する研究
論文審査委員	(主査) 保住 功
	(副査) 檜井 栄一
	(副査) 神谷 哲朗

本論文は、脳梗塞及び脳出血における新規治療薬の探索を目的として、血液脳関門や神経細胞障害の詳細な障害メカニズムの解明と、各種薬剤の脳保護作用を検討した。

マウス脳梗塞及び脳出血モデルにおけるフリーラジカル捕捉薬 NSP-116 の投与は、梗塞巣や血腫の拡大を抑制し、神経症状の悪化を緩和した。また、Nrf2 活性化薬 BARD や RS9 の投与は、Nrf2 経路の活性化により、出血性脳卒中モデルにおける血液脳関門の透過性亢進や神経症状の悪化を抑制した。さらに、血腫から放出されるヘモグロビンやその代謝産物の負荷は、細胞内の二価鉄蓄積の増加と ROS 産生亢進を介して細胞死を誘発した。ヘモグロビンの代謝産物であるヘミンをマウス脳実質内に注入した結果、脳障害が惹起されたが、鉄キレート剤ビピリジル投与により抑制された。加えて、鉄過剰症への承認薬である鉄キレート剤デフェラシロクスの処置は、ヘミンによる神経細胞死を抑制し、マウス脳出血モデルにおける神経症状の悪化を抑制した。

これらの結果は、脳卒中急性期における酸化ストレスの亢進に対しての様々な治療アプローチを提示している。なかでも、ROS の供給源として考えられる鉄の蓄積をキレート剤によって制御することは、脳卒中病態における新たな治療戦略となる可能性を示唆することから、博士（薬学）論文として価値あるものと認める。