

称号及び氏名	博士（獣医学）鎌中 喜久		
学位授与の日付	平成 17 年 3 月 31 日		
論文名	「一酸化窒素カスケードの脳梗塞病態における 関与と制御に関する研究」		
論文審査委員	主査 教授	中村洋一	
	副査 教授	畑 文明	
	副査 教授	小崎俊司	

論文要旨

緒 言

一酸化窒素（NO）は血管内皮細胞から遊離される血管弛緩因子の一つとして **Moncada** らによって同定され、当初は血管壁トーンスの調節に果たす役割が主に注目されていた。今日では血管内皮細胞だけではなく、様々な細胞において NO 合成酵素（NOS）の活性が認められており、NO の作用も生理的メディエータとしてだけではなく過剰に発生して組織障害性に働く場合まで、広汎に及んでいることが知られている。脳においてはその構成要素である、ニューロン（神経細胞）、グリア細胞ならびに血管内皮細胞のいずれからも NO が放出され、脳血流の調節や神経伝達といった恒常性の維持はもちろん、脳虚血など病態時においても NO が重要な役割を果たしていると考えられている。特に虚血性脳疾患の一つである脳梗塞については、高齢化や糖尿病などの生活習慣病の増加に伴い患者数が年々増加の一途を辿っているものの、世界的に有効性が確立している脳保護剤が未だないという現状や脳梗塞患者の病態進展に NO が関連するという報告があることから、NO を制御した神経保護薬にも注目が集まっている。そこで本研究は脳梗塞の病態進展における NO による制御機構を明らかにし、

NOあるいはそれによる一連のシグナル伝達系（NOカスケード）を制御する薬剤が脳梗塞治療剤として有望であるかどうかを検証することを目的とした。

第一章：脳梗塞モデルにおけるNOの変動について

脳梗塞の原因としては末梢で生じた血栓が中大脳動脈（MCA）等に詰まる脳血栓症と動脈硬化などの原因により脳血管が閉塞する脳血栓症とがある。そこで今回、光増感反応を利用して、ヒトと同様に実際に血栓でMCAを閉塞した脳梗塞（Photochemically induced thrombosis : PIT）モデルを用いて実験を行った。これまでに本モデルにおいてのNOに関する研究が行われていないことから、まず病態進展に伴うNOの関与について検討を始めた。

第1節：PITモデルの作製

体重250g前後の雄性Sprague-Dawleyラットを使用し、ハロセン麻酔下、手術用顕微鏡下で左眼窩側縁に沿って皮膚を切開し、頭蓋底を歯科用ドリルで左側中大脳動脈が硬膜下に見えるように約3mmの楕円形の窓を削開した。540nmの波長の緑色光を中大脳動脈に照射しながら、光増感剤であるローズベンガル（10mg/kg）を尾静脈より投与し、投与10分後には中大脳動脈が白色血栓にて完全に閉塞していることを顕微鏡下に確認できた。

1) 脳梗塞体積の経時的变化：MCA閉塞後に脳を取り出して2,3,5-トリフェニルテトラゾリウムクロライド染色により梗塞領域を可視化したところ、脳梗塞はMCA支配領域である大脳皮質および線条体に広がっていた。梗塞体積は閉塞24時間後までに急速に拡大し、その後48時間後まで暫増して最大となり、72時間後の梗塞体積は48時間後のそれと変わらなかった。

2) 神経症状の経時的变化：ラットの尻尾をもって持ち上げると、ラットは右へ大きく捻り、また右回転に歩行し、体の横から押してやると右側へ倒れやすいなど右側の麻痺が観察された。神経症状の評価は前肢と後肢の麻痺の程度や体位をスコア化して、総合的に評価した。その経時的推移については、閉塞24

時間後には明らかな神経症状が認められ、72 時間後もほぼ同程度の神経症状を示していた。

3) 脳内水分含量の経時的変動：脳浮腫の形成について脳内水分含有率を指標に検討した。脳内水分含有率は脳を摘出し虚血側と非虚血側領域(大脳皮質および皮質下部)の各々の水分含量から算出した。その結果、虚血側の脳内水分含有率は閉塞後増加し 48~72 時間後に最大となり、その後増加の程度は減弱した。

4) 血栓溶解剤の効果：ヒトにおいて脳梗塞治療剤として用いられている血栓溶解剤 tissue plasminogen activator (t-PA) を用いて本モデルの評価系としての妥当性を検討した。t-PA を投与すると、血栓閉塞により低下した脳血流量が増加し、閉塞 24 時間後では有意な脳梗塞体積の拡大抑制と神経症状の改善効果が認められた。

以上より、脳梗塞巣の拡大および脳浮腫の形成と機能的なアウトプットである神経症状の悪化を呈する PIT モデルはヒトの脳梗塞治療剤が有効性を示す脳梗塞モデルであることが確認できた。

第 2 節： PIT モデルにおける NO の推移

1) 脳内 NO_x 量の変化：経時的に摘出した虚血半球の大脳皮質および皮質下部における組織中 NO_x 量を Griese 法により測定した。閉塞 24~72 時間後で増加が認められ、最大変化は閉塞 48~72 時間後であった。

2) 血中 NO_x 量の変化：MCA 閉塞後、経時的に頸静脈から採血し、血中 NO_x 量について測定したが、閉塞 96 時間後まで明らかな変化は認められなかった。

3) 脳内 NOS 活性の変化：経時的に摘出した虚血半球の大脳皮質および皮質下部における組織中の Ca²⁺依存性および Ca²⁺非依存性の NOS 活性について RI 法を用いて測定した。Ca²⁺依存性 NOS 活性は、虚血後 48 時間後まで明らかな活性上昇は認められなかった。一方、Ca²⁺非依存性 NOS 活性は、虚血 12 時間後までは明らかな活性の上昇は認められなかったが、24~96 時間後では明らか

な酵素活性の上昇が認められ、48 時間後では最大であった。

以上の脳内 NOx 量の増加と NOS 活性の経時変化の結果から、脳内で増加した NOx 量は主に Ca²⁺非依存性 NOS 活性化により産生された NO である可能性が示唆される。また脳梗塞病態進展との関連性については、脳梗塞巣が閉塞 24 時間後までに急速に拡大し、脳内水分含有率の増加が閉塞 48 時間後に最大変化を示したことから、今回認められた脳内 NOx 量の明らかな増加は梗塞領域の急速な拡大よりは、むしろ脳浮腫の形成に関与している可能性が考えられた。

第二章：脳梗塞病態進展における NOS 阻害剤の効果について

次に PIT モデルの脳梗塞病態に対する NOS 阻害剤の効果について、MCA 閉塞 48 時間後の脳梗塞体積、神経症状および脳内水分含有率を指標に検討した。

NOS 阻害剤は iNOS (Ca²⁺非依存性) 阻害剤として

N-(3-(Aminomethyl)benzyl)acetamidine(1400W)を、nNOS (Ca²⁺依存性) 阻害剤として 7-nitroindazole (7-NI) を、更に iNOS と nNOS に阻害活性を有する化合物

として(1S,5S,6R,7R)-7-chloro-3-imino-5-methyl-2- azabicyclo[4.1.0]heptane

hydrochloride(ONO-1714)および 1-(2-Trifluoromethyl- phenyl)-imidazole (TRIM)を用いた。

第 1 節：脳梗塞体積および神経症状に対する効果

1400W は 10 および 30 mg/kg を閉塞 12, 24, 36 時間後に皮下投与したが、有意な梗塞拡大抑制作用は認められなかった。一方、7-NI を閉塞直後、6 時間後、24 時間後に腹腔内投与した場合、10 mg/kg では明らかな作用を示さなかったものの、30 mg/kg では有意な梗塞拡大抑制作用を示した。しかしながら神経症状に関しては 1400W, 7-NI とともに有意な改善作用は示さなかった。さらに ONO-1714 や TRIM についても検討したが、明らかな神経症状改善効果はみられなかった。

第2節：脳内水分含有率に対する効果

1400W は 10 および 30 mg/kg で用量依存的な脳内水分含有率の上昇抑制作用を示したが、7-NI は 30 mg/kg でも明らかな作用を示さなかった。

以上の結果から本モデルにおける脳梗塞病態進展については急速な梗塞巣の拡大には一部 nNOS から産生される NO が、さらにそれ以降に発現する脳浮腫の形成には iNOS から産生される NO が一部関与している可能性が考えられた。しかしながら脳梗塞の病態改善という観点から考えると NOS 阻害剤の作用は機能面の神経症状の改善には結びつかず、NOS 阻害剤に脳梗塞治療剤としての有用性を見出すことはできなかった。これには脳梗塞進展における NO の関与の程度や iNOS や nNOS から産生される NO が全て傷害的に働くものではないという NO の二面的な特徴などが関連している可能性が考えられた。そこで、NO カスケードの下流側で NO が障害性に働くと考えられる因子で病態を制御する方が効率的ではないかと考え、その因子の一つである Poly ADP-ribose polymerase (PARP) に注目して研究を進めた。

第三章：脳梗塞病態進展における PARP の関与について

PARP は DNA 修復に関与する核内酵素であるが、虚血や炎症状態で発生する NO を始めとするラジカルなどの傷害因子が引き金となり PARP が異常活性化してエネルギー産生系が破綻して細胞死に関与すると報告されている。また脳梗塞の病態進展における PARP の関与については、PARP 欠損マウスが脳虚血に対して抵抗性を示すことからその可能性が示唆されている。そこで PIT モデルにおける PARP の関与について明らかにするため PARP 阻害剤である

N-[3-(4-Oxo-3,4-dihydro-phthalazin-1-yl)phenyl]-4-(morpholin-4-yl)butanamide methanesulfonate monohydrate(ONO-1924H)を用いて実験を行った。

第1節：培養神経細胞のラジカル誘発細胞死に対する PARP 阻害剤の効果

1) 初代培養神経細胞の peroxynitrite 誘発細胞死に対する効果：ラット大脳由来

培養神経細胞に peroxynitrite を処置したところ、培養上清中の lactate dehydrogenase (LDH) 活性の上昇と神経特異的タンパクである microtubule-associated protein 2 (MAP2) の免疫染色性の低下が認められ、神経細胞死が惹起された。これに対して PARP 阻害剤である ONO-1924H を処置したところ添加濃度に応じた LDH 活性の上昇抑制と MAP2 免疫染色性の低下抑制、すなわち神経細胞死抑制作用が認められた。

2) 株化神経細胞の過酸化水素誘発細胞死に対する効果：NGF を処置して神経様細胞に分化させた PC12 細胞に過酸化水素を処置すると、細胞死が惹起され (LDH 法) と Poly ADP-ribose (PAR) 量の増加すなわち PARP の活性化が認められた。これに対し、ONO-1924H は添加濃度に応じて PARP 活性化を抑制し、細胞死を抑制した。

これらの結果から PARP 阻害剤は NO カスケードの下流に作用することで NO 関連ラジカルである peroxynitrite だけではなく過酸化水素など他のラジカルで惹起された細胞死に対しても抑制作用を示すことが明らかとなった。

第2節：脳梗塞 (PIT) モデルにおける PARP の関与と阻害剤の効果

1) Ex vivo 脳内 PARP 活性化に対する ONO-1924H の効果：ラット脳スライスに過酸化水素を処置すると有意な脳内 PAR 含量の増加、すなわち PARP 活性化が認められた。これに対して ONO-1924H を予め投与しておいたラット脳スライスに過酸化水素を処置すると用量依存的な PAR 含量の増加抑制、すなわち ONO-1924H が脳内の PARP 活性化を阻害することが確認された。

2) PIT モデルにおける ONO-1924H の効果：ONO-1924H を MCA 閉塞直後から 3, 10, 30 mg/kg/h の投与量で 3 時間静脈内持続投与を行ったところ、閉塞 24 時間後において用量依存的な梗塞拡大抑制作用が認められた。更に 30 mg/kg/h では神経症状の改善効果と脳内水分含量増加抑制作用が認められた。これらの結果から ONO-1924H は脳梗塞拡大抑制作用と関連した神経症状の改善作用を

示し、機能面としての有効性も確認された。

3) PIT モデルにおける PARP 活性化とそれに対する ONO-1924H の効果 : PIT モデルの脳梗塞進展に伴う PARP 活性化の経時変化について PAR 含量を指標に検討した。その結果、MCA 閉塞 3 時間後より PAR 含量が明らかに増加して 6 時間後に最大となり、その程度は減弱したが 24 時間後まで高値を維持した。そこで MCA 閉塞 6 時間後と 24 時間後の PAR 含量の増加に対する ONO-1924H の効果について検討したところ、有意な抑制作用が認められ、ONO-1924H は PIT モデルにおける PARP 活性化を阻害することが明らかとなった。

これらの結果から PARP 阻害剤である ONO-1924H は MCA 閉塞による脳内 PARP 活性化を抑制して、脳梗塞体積の拡大や脳内水分含量の増加を抑制することが明らかとなった。更に神経症状改善という重要な機能面の有効性も確認されており、脳梗塞治療剤として PARP 阻害剤が有望である可能性が示唆された。

総 括

1. 光増感反応を利用してヒトと同様に中大脳動脈が血栓で閉塞された脳梗塞モデル (PIT モデル) を用いて脳梗塞体積、脳内水分含量および神経症状を指標に病態進展に対する NO の関与について検討した。
2. 脳梗塞体積については、閉塞 24 時間後までに急速に広がり、48 時間後に最大になった。脳浮腫の形成は閉塞 24 時間後より現れ始め、48 から 72 時間で最大となった。神経症状については閉塞 24 時間後に最大の麻痺を示し、72 時間後もその程度は維持した。尚、ヒトの脳梗塞治療剤である t-PA は PIT モデルにおいて有効性を示すことが確認された。
3. 閉塞 24 時間以降で脳内虚血域の NOx 量の増加および Ca²⁺非依存的 NOS 酵素活性の上昇が認められた。Ca²⁺依存的 NOS 酵素活性については閉塞後で明らかな活性上昇は認められなかった。血中 NOx 量については閉塞 96 時間後まで明らかな変化は認められなかった。

4. 脳梗塞病態進展に対する NOS 阻害剤の影響について検討した。脳梗塞体積については nNOS 阻害剤でのみ拡大抑制作用が認められた。脳内水分含有率については iNOS 阻害剤でのみ含有率増加抑制作用が認められた。神経症状については NOS 阻害剤で明らかな改善効果は認められなかった。

5. 脳梗塞の病態進展を NO カスケード下流側で制御できる可能性があるかどうかについて、NO が傷害性に働く因子、Poly ADP-ribose polymerase (PARP) に注目した。PARP 阻害剤は in vitro 細胞系で NO ラジカルである peroxynitrite だけではなく過酸化水素で惹起された細胞死に対しても抑制作用を示すことが明らかとなった。

6. PARP 阻害剤は PIT モデルにおいて脳内 PARP 活性化の阻害作用を伴って脳梗塞病態（脳梗塞体積の拡大，神経症状および脳内水分含量の増加）を改善した。特に脳梗塞拡大抑制作用と相関して神経症状の改善効果を示し、PARP 阻害剤は脳梗塞治療剤として有用である可能性が示唆された。

PIT モデルにおいて、急速な脳梗塞巣の拡大には nNOS から産生される NO が、その後の脳浮腫の形成には iNOS から産生される NO が、それぞれ関与する可能性が高い。また NOS 阻害剤は神経症状の改善には結びつかなかったが、NO カスケードの下流にある PARP の阻害剤は、梗塞体積だけでなく神経症状に対しても改善効果を示した。脳梗塞という病態を、二面的特徴を持つ NO カスケードの調節で改善治療することを考えた場合、上流の NOS 酵素等の調節より、下流側で NO が傷害性に働く PARP などの調節の方が、病態進行を効率的に制御することが容易であり、脳梗塞治療剤として有用である可能性が示唆された。

【関連論文】

Kamanaka Y., Kondo K., Ikeda Y., Kamoshima W., Kitajima T., Suzuki Y., Nakamura Y., Umemura K., 2004. Neuroprotective effects of ONO-1924H, an inhibitor of poly

ADP-ribose polymerase (PARP), on cytotoxicity of PC12 cells and ischemic cerebral damage. *Life Sciences* 76(2), 151-162

Sekiguchi F., Mita Y., Kamanaka Y., Kawao N., Matsuya H., Taga C., Kawabata A., 2004. The potent inducible nitric oxide synthase inhibitor ONO-1714 inhibits neuronal NOS and exerts antinociception in rats. *Neuroscience Letter* 365(2), 111-115

Naka M., Nanbu T., Kobayashi K., Kamanaka Y., Komeno M., Yanase R., Fukutomi T., Fujimura S., Seo HG., Fujiwara N., Ohuchida S., Suzuki K., Kondo K., Taniguchi N., 2000. A potent inhibitor of inducible nitric oxide synthase, ONO-1714, a cyclic amidine derivative. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 270(2), 663-667

【その他の論文】

Kamanaka Y., Kawabata A., Matsuya H., Taga C., Sekiguchi F., Kawao N., 2003. Effect of a potent iNOS inhibitor (ONO-1714) on acetaminophen-induced hepatotoxicity in the rat. *Life Sciences* 74(6), 793-802

Takahashi M., Mutoh M., Shoji Y., Kamanaka Y., Naka M., Maruyama T., Sugimura T., Wakabayashi K., 2003. Transfection of K-rasAsp12 cDNA markedly elevates IL-1beta- and lipopolysaccharide-mediated inducible nitric oxide synthase expression in rat intestinal epithelial cells. *Oncogene*. 22(48), 7667-7676

審査結果の要旨

脳においてその構成要素である、ニューロン、グリア細胞ならびに血管内皮細胞のいずれからも一酸化窒素 (NO) が放出され、神経伝達機構や脳血流の調節といった恒常性の維持はもちろん、脳虚血など病態時においても NO が重要な役割を果たしている。虚血性脳疾患の一つである脳梗塞について、NO あるいはそれによる一連のシグナル伝達系 (NO カスケード) を制御する薬剤が脳梗塞治療剤として有望であるかどうかを検証した。

第一章では、光増感反応を利用して、実際に血栓で中大脳動脈 (MCA) を閉塞する脳梗塞 (PIT) モデルを用い、病態進展に伴う NO の関与について検討し、脳内 NOx 量の増加と NOS 活性の経時変化の結果から、脳内で増加した NOx 量は主に Ca²⁺非依存性 NOS 活性化により産生された NO であることが示唆された。また脳梗塞病態進展との関連性については、脳梗塞巣が閉塞 24 時間後までに急速に拡大し、脳内水分含有率の増加が閉塞 48 時間後に最大変化を示したことから、今回認められた脳内 NOx 量の明らかな増加は梗塞領域の急速な拡大よりは、むしろ脳浮腫の形成に関与している可能性が考えられた。

第二章では、脳梗塞病態に対する NOS 阻害剤の効果について、MCA 閉塞 48 時間後の脳梗塞体積、神経症状および脳内水分含有率を指標に検討した。種々の阻害剤の作用結果から、PIT モデルにおける脳梗塞病態進展については急速な梗塞巣の拡大には一部 nNOS から産生される NO が、さらにそれ以降に発現する脳浮腫の形成には iNOS から産生される NO が関与している可能性が考えられた。しかしながら脳梗塞の病態改善という観点から考えると NOS 阻害剤の作用は機能面の神経症状の改善には結びつかず、NOS 阻害剤に脳梗塞治療剤としての有用性を見出すことはできなかった。

第三章では、NO カスケードの下流側で NO が障害性に働くと考えられる因子の一つである Poly ADP-ribose polymerase (PARP) に注目して種々の検討を加えた。ラット大脳由来初代培養神経細胞の peroxynitrite 添加による細胞死は PARP 阻害剤である N-[3-(4-Oxo-3,4-dihydro-phthalazin-1-yl)phenyl]-4-(morpholin-4-yl)butanamide methanesulfonate monohydrate (ONO-1924H)により濃度依存的に抑制された。NGF を処置して神経様細胞に分化させた PC12 細胞の過酸化水素添加による細胞死も ONO-1924H により濃度依存的に抑制された。

PIT モデルにおいて ONO-1924H を MCA 閉塞直後から 3, 10, 30 mg/kg/h の投与量で 3 時間静脈内持続投与を行ったところ、閉塞 24 時間後の用量依存的な梗塞拡大抑制作用が認められた。また、PIT モデルの脳梗塞進展に伴う PARP 活性化の経時変化について PAR 含量を指標に検討したところ、MCA 閉塞 3 時間後より PAR 含量が明らかに増加して 6 時間後に最大となり、その程度は減弱したが 24 時間後まで高値を維持した。そこで MCA 閉塞 6 時間後と 24 時間後の PAR 含量の増加に対する ONO-1924H の効果について検討したところ、有意な抑制作用が認められ、ONO-1924H は PIT モデルにおける PARP 活性化を阻害することが明らかとなった。また、30 mg/kg/h では神経症状の改善効果と脳内水分含量増加抑制作用が認められた。

審査委員会の所見

本研究では、臨床症状に酷似したラット PIT モデル実験系を用い、急速な脳梗塞巣の拡大には nNOS から産生される NO が、その後の脳浮腫の形成には iNOS から産生される NO が、それぞれ関与する可能性が高いことを明確に示した。NOS 阻害剤は神経症状の改善には結びつかなかったが、NO カスケードの下流にある PARP の阻害剤は、梗塞体積だけでなく神経症状に対しても改善効果を示した。

脳梗塞という病態を、二面的特徴を持つ NO カスケードの調節により改善治療する場合、上流の NOS 酵素等を調節するより、下流側で NO が傷害性に働く PARP などを調節する方が病態進行を効率的に制御することが容易であり、脳梗塞治療剤として有用である可能性を明らかにした。

本研究成果は動物の生理学・薬理学を中心とする獣医学のみならず、医学・薬学分野にも広く貢献する重要な知見を含んでおり、本論文の審査及び最終試験の結果を併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。