

# 学 位 論 文 要 旨

学 位 申 請 者 氏 名 浅 野 昂 志

脳卒中は、わが国における死因の第4位であり、様々な後遺症を引き起こす重大疾患である。脳卒中中の約7割を占める脳梗塞は、高血圧や糖尿病、高脂血症などの危険因子を背景とし、血栓によって脳血管が閉塞し、脳組織の壊死を引き起こす。その発作は突発的に生じることから、処置の遅れによる死亡率が高く、救命できた場合でも重篤な後遺症をもたらす。脳梗塞の後遺症としては、半身麻痺や言語障害、嚥下障害などが挙げられ、介護原因となる頻度が他の疾患と比較して最も多い。なかでも嚥下障害は、患者 QOL を低下させるばかりでなく、窒息や誤嚥性肺炎を引き起こし、慢性期や予後においても患者生命を脅かす。脳梗塞の薬物治療としては、発症後 4.5 時間以内の組織プラスミノゲン活性化因子 (tissue plasminogen activator: t-PA) の急速静注による血栓溶解療法が最も効果的であるが、治療可能時間の制限から、実際に t-PA を投与できるのは脳梗塞患者全体の約 3%とごくわずかである。他に、フリーラジカルスカベンジャーであるエダラボンによる脳保護療法や、アスピリンやアルガトロバンによる抗血小板療法があるが、これらの薬剤は、腎障害や出血などの重篤な副作用リスクがある。このような脳梗塞治療の現状と問題点を踏まえ、脳梗塞既往歴をもつ患者や高血圧、糖尿病などの生活習慣病罹患患者をターゲットとし、安全性が高く、発症前からの予防投与によって脳梗塞発作の障害軽減が可能な予防的治療薬の開発が必要であると考えた。この薬物を発作後も継続して投与することによって、後遺症の予防および改善も期待できる。

フェルラ酸 (ferulic acid: FA) は、植物全般に含まれる天然のフェノール性化合物の一種であり、毒性が低く、現在、酸化防止剤や認知症の予防を目的としたサプリメントとして用いられている。これまでの基礎研究から、FA は、抗酸化作用を介した抗アポトーシス効果、血管内皮保護作用、血管拡張作用やアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害作用による降圧効果をもつことが報告されている。これらの作用は、脳梗塞の予防や発症時の脳保護に有効であることから、FA は、予防的治療薬のシードとして必要な作用を多面的に兼ね備えているといえる。そこで本研究において、FA をシード化合物として、脳梗塞発症前から発症後慢性期まで継続投与可能な予防的治療効果を有する FA 誘導体 (ferulic acid derivative: FAD) 化合物の創出を目指して検討を行った。

第 1 章では、中枢移行性や薬理作用の向上を目的として分子デザインした 13 種類の FAD (本学大学院薬学研究科医薬品化学講座 坂本武史教授より供与) について、抗酸化活性および ACE 阻害活性を指標としてスクリーニングを行った。その結果、ACE 阻害活性については、カプトプリルより強い化合物はなかったものの、アスコルビン酸、Trolox および FA よりも強い抗酸化活性を示し、理論上、良好な中枢移行性が期待できる FAD012 を見出した。PC12 細胞を用いた *in vitro* 実験系において、毒性および細胞保護効果の検討を行った結果、FAD012 は、FA と同等に毒性が低く、過酸化水素処置による酸化ストレス障害に対して、FA よりも強い細胞保護効果を示すことが明らかになった。また、生体に対する予防投与を想定した、*in vivo* ラットの長期経口投与による毒性試験においても毒性が低いことが確認された。

第 2 章では、動物実験において脳梗塞急性期モデルとして汎用されているラット中大脳動脈閉塞/

再灌流 (MCAO/Re) モデルを用い、脳血流量や神経症状、脳梗塞巣の形成に対する FAD012 の効果を検討した。雄性 SD ラットに FAD012 (10 または 30 mg/kg) を 1 週間、連日経口投与した後、MCAO/Re 処置を行った。その結果、FAD012 は、MCAO 処置後の脳血流量の減少を抑制し、Re 処置 24 時間後における神経症状の軽減および脳梗塞巣の形成を抑制することが明らかになった。大脳皮質表層の血流量を 2 次元レーザー血流画像装置によって測定した結果、FAD012 は、正常時の血流量には影響せず、MCAO 時の MCA 主幹動脈およびその周辺の細動脈灌流領域の血流量を維持することが明らかになった。血管拡張ガスメディエーターである NO は、虚血時の血流量を維持するとの報告があることから、FAD012 の脳血流量維持作用がみられた大脳皮質における内皮型 NO 合成酵素 (eNOS) の発現量を組織学的に検討した。その結果、FAD012 は、MCAO 処置後に血管内皮細胞において低下する eNOS 発現量を維持することが明らかになった。これらのことから、脳梗塞急性期において、FAD012 は、内皮細胞の eNOS 発現量の維持を介して MCA 主幹動脈およびその周辺の細動脈の血流量を維持し、虚血障害から脳組織を保護することが示唆された。

第 3 章では、脳梗塞慢性期における嚥下障害モデルとして、ラットの両側総頸動脈永久結紮 (2VO) により作製した慢性脳低灌流モデルを用い、嚥下反射障害に対する FAD012 の効果を検証した。雄性 SD ラットに FAD012 (3 または 10 mg/kg) を 1 週間連日経口投与した後、2VO 処置を行った。FAD012 は、2VO によるラットの死亡率を低下させた。また FAD012 は、2VO による脳血流量の減少を抑制し、この効果は 2 週間後においても継続して認められた。2VO 処置 2 週間後に嚥下反射機能を電気生理学的に測定した結果、FAD012 は、2VO による嚥下反射の潜時の延長および嚥下回数の減少を抑制し、脳虚血による嚥下反射機能低下を抑制することが明らかになった。これまでに、虚血による大脳基底核の障害は、黒質線条体神経系のドパミン産生、貯蔵を低下させ、咽喉頭粘膜において、嚥下反射トリガーであるサブスタンス P (SP) を減少させることにより、嚥下障害を引き起こすことが報告されている。そこで、FAD012 の嚥下反射障害改善メカニズムを組織学的に検証した。まず、線条体における障害を評価するため、アポトーシス関連タンパクである cleaved caspase-3 の免疫染色を行った。その結果、FAD012 は、虚血による活性化カスパーゼ陽性細胞の増加を顕著に抑制し、長期的な虚血によるアポトーシスを抑制することが明らかになった。続いて、線条体におけるドパミン合成酵素であるチロシンヒドロキシラーゼ (TH) および SP の発現量を免疫染色により評価した結果、FAD012 は、虚血による TH および SP の発現量の低下を顕著に抑制した。さらに FAD012 は、2VO による咽喉頭粘膜 SP 発現量の減少を顕著に抑制した。以上のことから、FAD012 の予防的長期投与は、慢性脳低灌流ラットの嚥下反射機能障害を軽減し、その機序には、嚥下反射に重要な黒質線条体ドパミン-SP 神経機能の保護を介した咽頭 SP 量の維持が関与していることが示唆された。

以上、本研究結果より、FAD012 は、ラットの脳梗塞急性期において脳血流量を維持することによって脳障害を軽減することを示した。また、慢性期における FAD012 の継続投与によって、脳梗塞の後遺症である嚥下障害を軽減できる可能性を明らかにした。以上、FA をシードとして見出した FAD012 は、長期間の予防投与が可能な低毒性の化合物であり、既存の薬にはない新たな予防的治療薬としての可能性をもつ化合物であることを示した。

## Thesis Abstract

Degree Applicant Takashi Asano

Ischemic stroke is a serious disease with various sequelae, such as higher brain dysfunction, motor/sensory impairment, and dysphagia, which are some of the most common reasons for long-term care. Reperfusion as early as possible after the onset of stroke symptoms by thrombolytic therapy using tissue plasminogen activator (t-PA) is the most efficacious treatment for cerebral infarction. However, because of the narrow window of t-PA administration, only few patients can be treated with it. Therefore, it is suggested that administration of a prophylactic drug (before the onset of stroke) that could reduce impairment associated with sudden cerebral infarction is necessary. Further, if the risk of side effects is low, long-term continuous administration would be possible, similar to a conventional supplement, and the prevention or improvement of sequelae in the chronic phase of cerebral infarction would also be possible.

Ferulic acid (FA) is a natural phenolic compound found in products such as rice bran. FA is less toxic and has been used as an antioxidant food supplement and to delay dementia progression. Basic research has revealed the various pharmacological functions of FA. Among these, the author focused on the anti-apoptosis effect through its antioxidant action and the hypotensive effect through its inhibitory effect on angiotensin converting enzyme (ACE), protective effects on the vascular endothelium, and vasodilator action. These actions are considered to combine in a multifaceted manner to effectively protect the brain during ischemia as a potential prophylactic treatment. Accordingly, the goal of this study was to synthesize highly effective FA derivatives (FADs) with a prophylactic treatment effect that can be administered continuously from before cerebral infarction onset to the chronic phase.

In section 1, by using FA as a seed compound and with the goal of improving intracerebral transferability and pharmacological function, 13 molecularly designed candidate FAD compounds (donated by Prof. Sakamoto, Medicinal Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Josai University) were screened for their antioxidant activity and ACE inhibitory activity. Although no compounds exhibited stronger ACE inhibition than captopril, the antioxidant activity of FAD012 which has theoretical high intracerebral permeability was stronger than that of ascorbic acid, Trolox, and FA. Therefore, FAD012 was selected from the candidate compounds and its toxicity and cytoprotective effects were investigated in PC12 cells. The results showed that FAD012 had low toxicity, equivalent to that of FA, and exhibited a stronger cytoprotective effect than FA against oxidative stress induced by hydrogen peroxide. Accordingly, to test the prophylactic administration, FAD012 was orally administered to male Sprague Dawley (SD) rats for 10 weeks and the toxicity was evaluated. FAD012 was confirmed to have low *in vivo* toxicity in rats.

In section 2, the effects of FAD012 on cerebral blood flow (CBF), neurological symptoms, and cerebral infarction were investigated in a rat model of middle cerebral artery occlusion/reperfusion (MCAO/Re), a model of acute-phase cerebral infarction. After the oral administration of FAD012 (10 or 30 mg/kg/day) for 1 week to male SD rats, MCAO/Re was conducted. FAD012 suppressed the reduction in CBF after MCAO treatment; further, at 24 h after Re treatment, FAD012 reduced the neurological symptoms and suppressed the cerebral

infarction. A detailed investigation of the CBF maintenance action of FAD012 by using a 2D laser blood flow imaging apparatus revealed that FAD012 does not normally affect blood flow in the cerebral cortex, but when the MCA is blocked, it maintains blood flow to the cerebral cortex through the main MCA and its surrounding arterioles. As there are reports that nitric oxide (NO), a vasodilation gas mediator, maintains blood flow during ischemia, the expression level of endothelial NO synthase (eNOS) was histologically investigated in the cerebral cortex, wherein the cerebral blood flow maintenance action of FAD012 was observed. It was revealed that FAD012 preserved eNOS expression in the cerebral cortex after MCAO. These results indicated that FAD012 protected the brain from impairment in the acute phase of cerebral infarction through the maintenance of CBF via the preservation of eNOS expression level.

Dysphagia not only impairs patient QOL, but can be life-threatening owing to the increased risk of asphyxia or complications with aspiration pneumonia. In section 3, the effect of FAD012 on the impaired swallowing reflex was investigated in rats with bilateral common carotid artery permanent ligation (2VO) as a model of dysphagia in the chronic phase of cerebral infarction. After the oral administration of FAD012 (3 or 10 mg/kg/day) for 1 week to male SD rats, 2VO was performed. In the rats administered FAD012, the mortality rate was suppressed. In addition, continuous administration of FAD012 after 2VO suppressed the reduction in CBF caused by 2VO for a long period (2 weeks). Further, FAD012 suppressed the reduction in swallowing frequency and the increase in swallowing reflex latency caused by 2VO. Previously, it was reported that the impairment of the basal ganglia by ischemia reduced dopamine (DA) production and storage in the nigrostriatal pathway, which reduces substance P (SP; the trigger for the swallowing reflex in the laryngopharyngeal mucosa) and caused dysphagia. Therefore, the mechanism by which FAD012 improved the impairment of the swallowing reflex was histologically investigated. FAD012 markedly suppressed the increase in activated caspase-3 positive cells and suppressed the long-term apoptotic cell death. In addition, the expression levels of SP and tyrosine hydroxylase (TH), which is responsible for DA synthase in the striatum, were assessed by using immunostaining and FAD012 was found to remarkably suppress the decreases in TH and SP expression. Further, FAD012 suppressed the reduction of SP expression in the laryngopharyngeal mucosa. The above results suggested that the long-term prophylactic administration of FAD012 reduced dysphagia in 2VO rats by the maintenance of the pharyngeal SP level, mediated through the protection of the neurological function of nigrostriatal DA and SP.

The results of this study demonstrated that FAD012, designed from the seed compound of FA, had low toxicity, could be used as a long-term prophylactic agent, and reduced the brain damage after the sudden onset of acute-phase cerebral infarction through the maintenance of CBF during ischemia. Further, it was revealed that the continued administration of FAD012 in the chronic phase ameliorated the impairment of the swallowing reflex by protecting the nigrostriatal DA-SP system. FAD012 was therefore indicated as a potential compound for the development of a new prophylactic treatment drug against ischemic stroke. The results of this study may contribute to the development of preventative medicines for the treatment of ischemic stroke.

## 論文審査の結果の要旨

脳卒中は、わが国における死因の第4位であり、様々な後遺症を引き起こす重大疾患である。近年脳梗塞が脳卒中に占める割合が増加しており、処置の遅れによる死亡率も高く、救命できた場合でも重篤な後遺症をもたらすことが多い。現在、脳梗塞の薬物治療としては、組織プラスミノゲン活性化因子 (tissue plasminogen activator: t-PA) の静注による血栓溶解療法が最も効果的であるが、適応時間の制限等から、実際に t-PA を投与できるのは脳梗塞患者全体の約 3%と低い。他に、フリーラジカルスカベンジャーであるエダラボンによる脳保護療法や、アスピリンやアルガトロバンによる抗血小板療法があるが、これらの薬剤は、出血や腎障害などの重篤な副作用リスクを伴う。このような脳梗塞治療の現状と問題点を踏まえ、当研究において浅野氏は、脳梗塞既往歴をもつ患者や高血圧、糖尿病などの生活習慣病罹患患者をターゲットとし、安全性が高く、発症前からの予防投与によって脳梗塞発作の障害軽減が可能な予防的治療薬の開発が必要であるとの考えに至った。

フェルラ酸 (ferulic acid: FA) は、植物全般に含まれる天然のフェノール性化合物の一種であり、毒性が低く、現在、酸化防止剤や認知症の予防を目的としたサプリメントとして用いられている。これまでの基礎研究から、FA は、抗酸化作用を介した抗アポトーシス効果、血管内皮保護作用、血管拡張作用やアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害作用による降圧効果をもつことが報告されている。これらの作用は、脳梗塞の予防や発症時の脳保護に有効であると考えられ、FA は、予防的治療薬のシードとして必要な作用を多面的に兼ね備えているといえる。そこで浅野氏は、FA をシード化合物として、脳梗塞発症前から発症後慢性期まで継続投与可能な予防的治療効果を有する FA 誘導体 (ferulic acid derivative: FAD) 化合物の創出を目指して検討を行った。

**第1章 FADの抗酸化活性、細胞保護効果の評価 (*in vitro*) および毒性評価 (*in vivo*)** 本章において浅野氏は、中枢移行性や薬理作用の向上を目的として分子デザインした 13 種類の FAD (本学大学院薬学研究科医薬品化学講座 坂本武史教授より供与) について、抗酸化活性および ACE 阻害活性を指標としてスクリーニングを実施した。その結果、ACE 阻害活性については、カプトプリルより強い化合物はなかったものの、アスコルビン酸、Trolox および FA よりも強い抗酸化活性を示し、良好な中枢移行性が期待できる FAD012 を見出すに至った。PC12 細胞を用いた *in vitro* 実験系において、毒性および細胞保護効果の検討を行った結果、FAD012 は、FA と同等に毒性が低く、過酸化水素処置による酸化ストレス障害に対して、FA よりも強い細胞保護効果を示すことを明らかにした。また、生体に対する予防投与を想定した、*in vivo* ラットの長期経口投与による毒性試験においても毒性が低いことを確認している。

**第2章 一過性脳虚血ラットを用いた FAD012 の脳保護効果に関する検討** 本章において浅野氏は、脳梗塞急性期モデルとして汎用されているラット中大脳動脈閉塞/再灌流 (MCAO/Re) モデルを用い、脳血流量や神経症状、脳梗塞巣の形成に対する FAD012 の効果について検討している。雄性 SD ラットに FAD012 (10 または 30 mg/kg) を 1 週間、連日経口投与した後に、MCAO/Re 処置を施した。この検討において浅野氏は、FAD012 は、MCAO 処置後の脳血流量の減少を抑制し、Re 処置 24 時間後における神経症状の軽減および脳梗塞巣の形成を抑制することを明らかにした。次に大脳皮質表層の血流量を 2

次元レーザー血流画像装置によって測定した結果、FAD012 は、正常時の血流量には影響せず、MCAO 時の MCA 主幹動脈およびその周辺の細動脈灌流領域の血流量を維持することを明らかにした。さらに浅野氏は、血管拡張ガスメディエーターである NO に、虚血時の血流量を維持する効果があるとの報告が見られることから、FAD012 の脳血流量維持作用がみられた大脳皮質における内皮型 NO 合成酵素 (eNOS) の発現量を組織学的に検討している。その結果、FAD012 は、MCAO 処置後に血管内皮細胞において低下する eNOS 発現量を維持することを明らかにした。以上の結果より浅野氏は、脳梗塞急性期において、FAD012 は、内皮細胞の eNOS 発現量の維持を介して MCA 主幹動脈およびその周辺の細動脈の血流量を維持し、虚血障害から脳組織を保護すると考察した。

**第 3 章 慢性脳低灌流ラットを用いた FAD012 の嚔下反射障害改善効果に関する検討** 本章において浅野氏は、脳梗塞慢性期における嚔下障害モデルとして、ラットの両側総頸動脈永久結紮 (2V0) により作製した慢性脳低灌流モデルを用い、嚔下反射障害に対する FAD012 の効果を検証している。雄性 SD ラットに FAD012 (3 または 10 mg/kg) を 1 週間連日経口投与した後、2V0 処置を行った。このような条件下において FAD012 は、ラットの死亡率を低下させることを明らかにした。また FAD012 は、2V0 による脳血流量の減少を抑制し、この効果は 2 週間後においても継続することを発見した。さらに浅野氏は、2V0 処置 2 週間後に嚔下反射機能を電気生理学的に測定した結果、FAD012 は、2V0 による嚔下反射の潜時の延長および嚔下回数の減少を抑制し、脳虚血による嚔下反射機能低下を抑制することも明らかにした。これまでの報告で、虚血による大脳基底核の障害は、黒質線条体神経系のドパミン産生、貯蔵を低下させ、咽喉頭粘膜において、嚔下反射トリガーであるサブスタンス P (SP) を減少させることにより、嚔下障害を引き起こすとされている。そこで次に浅野氏は、FAD012 の嚔下反射障害改善メカニズムを組織学的に検証しようと試みた。その結果、FAD012 は、線条体において虚血による活性化カスパーゼ陽性細胞の増加を顕著に抑制し、長期的な虚血によるアポトーシスを抑制することが判明した。続いて、線条体におけるドパミン合成酵素であるチロシンヒドロキシラーゼ (TH) および SP の発現量を免疫染色により評価した結果、FAD012 は、虚血による TH および SP の発現量の低下を顕著に抑制するとの結果を得た。さらに FAD012 は、2V0 による咽喉頭粘膜 SP 発現量の減少を顕著に抑制した。以上の結果より浅野氏は、FAD012 の予防的長期投与は、慢性脳低灌流ラットの嚔下反射機能障害を軽減し、その機序には、嚔下反射に重要な黒質線条体ドパミン-SP 神経機能の維持が関与していると結論付けた。

以上より、浅野氏は新規化合物である FAD012 は、ラットの脳梗塞急性期において脳血流量を維持することによって脳障害を軽減することを証明した。また、慢性期における FAD012 の継続投与によって、脳梗塞の後遺症である嚔下障害を軽減できる可能性をも明らかにしている。これらの結果を踏まえて浅野氏は、FA をシードとして見出した低毒性の新規化合物である FAD012 が、長期間投与可能な虚血性脳血管障害の新規予防的治療薬となる可能性がある」と提唱している。

当研究は虚血性脳血管障害の基礎的研究において多くの新知見を加えただけでなく、新規治療戦略をも提示しており、本研究科において課程による博士 (薬学) の学位を授与するに値するものと判断する。