

令和元年6月12日現在

機関番号：32403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09255

研究課題名(和文)新規フェルラ酸誘導体FAD012の虚血性脳障害抑制メカニズムに関する基礎的研究

研究課題名(英文)Protective mechanism of FAD012, a ferulic acid derivative, against ischemic brain injury.

研究代表者

岡崎 真理 (OKAZAKI, MARI)

城西大学・薬学部・教授

研究者番号：50272901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：脳梗塞発作は突発的に生じ、処置が遅れるほど予後不良となる。申請者の研究グループは、発症前からの予防的投与によって、発作時の脳保護にはたらく新たな予防的治療薬が必要であると考え、天然由来低分子化合物であるフェルラ酸(FA)の誘導体を数十種類、設計・合成し、効果を検討してきた。その結果、誘導体の一つであるFAD012の慢性予防投与が、両側総頸動脈永久結紮(2VO)処置や中大脳動脈閉塞・再灌流(MCAO/Re)処置を行ったラットの脳血流低下を抑制し、脳障害をFAよりも強く抑制することを明らかにした。この効果には脳血管内皮細胞における一酸化窒素合成酵素(eNOS)の活性化が関与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的特色は、虚血性脳障害の予防・軽減を目的とし、フェルラ酸をシードとして創出した新規化合物の有効性を多岐にわたる研究分野を連結して検証し、安全性の高い脳保護薬の開発を目指すところにある。現在、脳梗塞に対する治療は、発症後の薬物療法が中心であり、治療の遅れによる重篤化が医療・介護の負担を増大させている。我々の研究成果により、FAD012は既存薬とは異なるメカニズムを有する安全な脳保護薬として、ハイリスク患者や既往歴のある患者の発症・再発予防および障害の軽減に貢献できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Stroke occurs suddenly, which leads to a poor prognosis. To discover a new preventive therapeutic agent that can protect brain against ischemic injury, we have designed and synthesized dozens of derivatives of ferulic acid (FA) and screened them in vitro. Chronic preventive administration of FAD012, one of the derivatives preserved cerebral blood flow (CBF) and markedly suppressed brain damage in rats treated with bilateral permanent carotid artery permanent occlusion (2VO) or middle cerebral artery occlusion/reperfusion (MCAO / Re). We showed that these effects involve the activation of nitric oxide endothelial synthase (eNOS) in cerebral blood vessels. Our study demonstrated that FAD012, designed from 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.

研究分野：中枢神経系薬理学

キーワード：フェルラ酸誘導体FAD012 虚血性脳血管障害 両側総頸動脈永久結紮(2VO) 中大脳動脈閉塞・再灌流(MCAO/Re) 脳血流維持作用 内皮型NO合成酵素(eNOS) 脳保護薬 予防的治療薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳血管疾患(脳卒中)はわが国の3大死因のひとつであり、その70~80%は脳梗塞に代表される虚血性脳血管障害である。脳梗塞発作が生じた際、処置が遅れるほど症状は重篤化し致死的になり、命を取りとめた場合でも半身運動麻痺、言語障害、嚥下障害等の後遺症が患者QOLの低下や介護負担の増大をもたらす。脳梗塞には、発症後の迅速な血栓融解薬の投与による脳血流回復処置が有効である。しかし、脳梗塞発作は突発的に生じ、処置が遅れることが多いことから、発症・再発の抑制や発作時の障害軽減を目的とした有効な予防法の開発が必要であると考えられる。

植物に広く含まれる桂皮酸誘導体の一種であるフェルラ酸(FA)は、4位水酸基から芳香環、オレフィン、カルボン酸に広がる共役系のラジカル消去作用が強く、古くから抗酸化物質として知られている。申請者の研究グループは、FAの慢性経口投与が両側総頸動脈永久結紮(2VO)処置によって脳循環不全を誘導した低灌流脳虚血ラットの脳障害を軽減することを確認している。この結果をふまえ、FAよりも安定でかつ吸収性に優れ、有効性が高い新規FA誘導体(FAD)を創出し、その脳保護効果や嚥下障害抑制効果を検証することを目的として研究を進めてきた(科研費25460910)。これまでに、置換基の種類やその位置の異なった数十種類の新規FADを合成し、これら化合物の*in vitro*抗酸化活性、培養細胞を用いたアポトーシス抑制効果を指標にスクリーニングを行い、FAよりも効果の強い誘導体を見出した。うち培養実験系の毒性試験において毒性の低かったFAD012を選出し、*in vivo*における脳保護効果を検証した。その結果、FAD012の慢性経口投与は、2VOラットの脳障害を軽減し、学習記憶障害や嚥下障害をFAよりも強く抑制することが明らかになった。FAD012の作用についてさらに調査したところ、FAD012は、2VOによる虚血時の脳血流低下を顕著に抑制することがわかった。これらの結果は、FAD012を虚血性脳血管障害の発症前から予防的に経口服用しておくことにより、安全に虚血発作時の脳障害を軽減できる可能性を示している。しかし、FAD012の詳細な脳保護メカニズムや局所脳虚血に対する効果は不明である。

2. 研究の目的

申請者らのこれまでの研究結果を踏まえ、FAD012による虚血性脳血管障害の予防・軽減の分子生物学的メカニズムを明らかにし、脳梗塞モデルとして汎用されている中大脳動脈閉塞・再灌流ラットを用いてその効果を検証し、ヒトでの応用の実現に向けた基礎研究データを蓄積することを目的とした。

3. 研究の方法

1. 2VOモデルを用いたFAD012の慢性経口投与による虚血時の脳血流維持作用とそのメカニズムの薬理学的手法による検討

- (1) 2VO処置時の脳血流低下に対するFAD012の影響(用量依存性の検討)
- (2) FAD012の脳血流維持に関わるメカニズムの薬理学的検討

FAD012の虚血時の脳血流維持作用は、脳血管拡張反応の増強によると推測されることから、血管拡張因子であるNOおよびH₂S系の関与の検討を行った。NO合成酵素阻害薬のL-NAME、H₂S合成酵素のシスタチオニン合成酵素(CSE)阻害薬dl-propargylglycineをそれぞれラットに静脈内投与した後に2VO処置を行い、脳血流量の変化を観察した。

2. 局所脳虚血・再灌流モデルを用いたFAD012の脳血流維持および脳保護作用の検討

脳梗塞モデルとして汎用されているラットMCAO/Reモデルを用い、1-(1)と同様の実験を行った。MCAOは、麻酔下、ラットの右総頸動脈から先端を丸めたナイロン栓糸を挿入し、中大脳動脈分岐部で血管を閉塞することにより行った。その2時間後、栓糸を引き抜き血流を再開させた(Re)。FAD012の脳血流量に対する影響および梗塞の形成に対する効果について検討した。

3. FAD012による虚血時脳血管拡張および脳保護作用の分子生物学的メカニズムの解明

(1) FAD012の虚血時脳血流維持作用の分子生物学的メカニズムの検討

脳サンプルを採取し、血管拡張反応のシグナル経路の機能性蛋白質内皮型NO合成酵素(eNOS)の活性化についてリン酸化eNOSの免疫染色により検討した。

(2) FAD012の脳保護(細胞死抑制)に関わる分子生物学的メカニズムの検討

細胞死抑制メカニズムについては、主にアポトーシスシグナルに関わる蛋白質やその上流の調節蛋白質の発現について解析を行った。脳組織サンプルを採取し、アポトーシス関連蛋白質の発現をWestern blot法を用いて検討した。

4. 研究成果

1. 2VOモデルを用いたFAD012の慢性経口投与による虚血時の脳血流維持作用とそのメカニズムの薬理学的手法による検討

FAD012の脳障害の予防・軽減のメカニズムを解明することを目的とし、FAD012の虚血時の脳血流維持作用とそのメカニズムの薬理学的手法による検討を行った。2VO処置時の脳血流低下に対するFAD012の影響を経時的に測定したところ、FAD012は2VO処置直後から持続的かつ用量依存的に脳血流維持作用を示すことがわかった。また、FAD012の脳血流維持メカニズムを解明する目的で、血管拡張因子であるNOおよびH₂S系の関与について検討を行った結果、NO合成酵素阻害薬であるL-NAME、dl-propargylglycineのいずれの投与によってもFAD012の脳血

流維持作用は減弱することが明らかになった。これらの結果から、FAD012 は NO および H₂S を介して脳血管を拡張し、虚血時の脳血流の低下を抑制することが示唆された。

2. 局所脳虚血・再灌流モデルを用いた FAD012 の脳血流維持および脳保護作用の検討

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 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 の予防投与による脳保護効果を検討した。FAD012 を慢性投与した群では、MCAO 処置直後の脳血流量は、対照群と比較して高く維持され、MCAO による脳血流量の減少が抑制された。また FAD012 の脳血流量低下抑制作用は、2 時間の MCAO 処置中、持続した。また、FAD012 は、MCAO/Re による脳梗塞巣の形成を有意に抑制し、神経症状の改善作用を示した (Fig. 1A)。さらに FAD012 の脳血流量維持作用について、2 次元レーザー血流画像装置を用いて詳細に検証したところ、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 (Fig. 1B)。

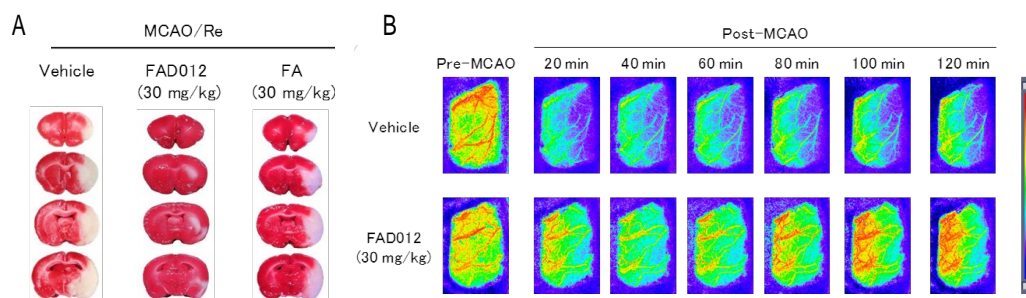


Fig. 1 Effects of oral administration of FAD012 on infarction and cerebral blood flow (CBF). Representative photographs of TTC staining of coronal brain sections at 24 h of reperfusion after 2 h MCAO (A) and images of CBF at the indicated time points pre and post MCAO in FAD012 treated rats (B).

3. FAD012 による虚血時脳血管拡張および脳保護作用の分子生物学的メカニズムの解明

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、2VO 時に FAD012 による脳血流量維持作用がみられた大脳皮質におけるリン酸化 eNOS 発現を組織学的に検討した。その結果、FAD012 は、2VO 時に血管内皮細胞の eNOS のリン酸化を増大させることが明らかになった。これらのことから、FAD012 の予防投与は、虚血時に内皮細胞の eNOS の活性化を介して 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。

2VO によって誘発されたラット大脳皮質におけるアポトーシスに対する FAD012 の抑制効果およびそのメカニズムを明らかにするために、JNK、p38 および ERK の各アポトーシス関連シグナル伝達経路の主要タンパク質の発現について、Western blot 法を用いて検討したところ、FAD012 は p-ERK 発現およびアポトーシス抑制の指標である Bcl-2/Bax を増大させ、cleaved caspase-3 発現を抑制した。一方、JNK および p38 経路に対しては影響しなかった。これらの結果から、FAD012 は、主に ERK 経路の活性化を介して抗アポトーシス作用を示すことが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

寺前 裕之、玄 美燕、山下 司、高山 淳、岡崎 真理、坂本 武史、フェルラ酸のフリーラジカル消去能に関する理論的研究, *J. Comput. Chem. Jpn.*, Vol. 17, No. 3, pp. 150-152 (2018)
Asano T., Matsuzaki H., Iwata N., Xuan M., Kamiuchi S., Hibino Y., Sakamoto T., Okazaki M. Protective effects of ferulic acid against chronic cerebral hypoperfusion-induced swallowing dysfunction in rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 550; doi:3390/ijms18030550 (2017)

〔学会発表〕(計 21 件)

松本 花織、小林 凌晟、浅野 昂志、松崎 広和、玄 美燕、日比野 康英、高山 淳、坂本 武史、岡崎 真理 : 両側総頸動脈結紮ラットにおけるフェルラ酸誘導体 FAD012 の脳血流維持効果、日本薬学会第 139 年会、2019 年 3 月 (千葉)

玄 美燕、中村 梨花、木下 智史、加藤 洋介、高山 淳、坂本 武史、岡崎 真理 : 酸化ストレス傷害に対するフェルラ酸誘導体の ERK および Nrf2 経路を介した細胞保護メカニズムの検討、日本薬学会第 139 年会、2019 年 3 月 (千葉)

加藤 洋介、北田 尚也、鈴木 雄介、水島 寛堂、玄 美燕、高山 淳、岡崎 真理、坂本 武史、広澤 成美、坂本 安 : プロテオーム解析用 MALDI マトリックスとしてのフェルラ酸誘導体のイオン化能力の評価、日本薬学会第 139 年会、2019 年 3 月 (千葉)

小山 貴大、玄 美燕、中村 梨花、山下 司、高山 淳、松崎 広和、岡崎 真理、坂本 武史、

寺前 裕之：新規フェルラ酸誘導体のフリーラジカル消去能及び細胞保護作用の評価、日本薬学会第 139 年会、2019 年 3 月（千葉）

Takashi Asano, Ryo Endo, Kosuke Hayashi, Yosuke Kato, Naohiro Iwata, Hirokazu Matsuzaki, Takeshi Sakamoto, Yasuhide Hibino, Mari Okazaki : FAD012, a ferulic acid derivative, protects against middle cerebral artery occlusion (MCAO)-induced ischemic stroke by preserving cerebral blood flow in rats, 18th WORLD CONGRES OF BASIC AND CLINICAL PHARMACOLOGY, July 2018 (Kyoto)

Takashi Asano, Hirokazu Matsuzaki, Yosuke Kato, Kosuke Hayashi, Meiyuan Xuan, Naohiro Iwata, Jun Takayama, Takeshi Sakamoto, Yasuhide Hibino, Mari Okazaki : FAD012, a ferulic acid derivative, improves cerebral blood flow and enhances swallowing reflux in a rat chronic cerebral hypoperfusion model, 18th WORLD CONGRES OF BASIC AND CLINICAL PHARMACOLOGY, July 2018 (Kyoto)

浅野 昂志, 遠藤 諒, 林 浩輔, 岩田 直洋, 松崎 広和, 坂本 武史, 日比野 康英, 岡崎 真理：フェルラ酸誘導体 FAD012 の予防的投与によるラット中大脳動脈閉塞時の脳血流維持作用、日本薬学会第 138 年会、2018 年 3 月 25-28 日（金沢）。

加藤 洋介, 北田 尚也, 鈴木 雄介, 水島 寛堂, 玄 美燕, 高山 淳, 岡崎 真理, 坂本 武史, 広澤 成美, 坂本 安：フェルラ酸誘導体の MALDI マトリックスとしての評価とプロテオーム解析への応用、日本薬学会第 138 年会、2018 年 3 月 25-28 日（金沢）。

Yosuke Kato, Narumi Hirosawa, Jun Takayama, Meiyuan Xuan, Mari Okazaki, Yasushi Sakamoto, Takeshi Sakamoto : Use of halogenated derivatives of the ferulic acid as matrices in proteomic analysis with Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry, The protein society, 2017 July 24-27 (Montreal Canada).

浅野 昂志, 遠藤 諒, 林 浩輔, 岩田 直洋, 松崎 広和, 坂本 武史, 日比野 康英, 岡崎 真理：一過性脳虚血ラットにおいてフェルラ酸誘導体 FAD012 の予防投与は脳血流を維持し脳障害を軽減する、生体機能と創薬シンポジウム 2017、2017 年 8 月 24 -25 日（京都）。

加藤 洋介, 北田 尚也, 玄 美燕, 高山 淳, 岡崎 真理, 坂本 武史, 広澤 成美, 坂本 安：プロテオーム解析用 MALDI マトリックスとしてのフェルラ酸誘導体の評価、第 61 回日本薬学会関東支部大会、2017 年 9 月 16 日（東京）。

加藤 洋介, 松田 千代子, 辻村 和博, 玄 美燕, 高山 淳, 岡崎 真理, 坂本 武史, 広澤 成美, 坂本 安：新規フェルラ酸誘導体の合成と MALDI Matrix への応用及び評価。創薬懇話会 2016 in 薬科、2016 年 6 月 30 日～7 月 1 日（長野）。

加藤 洋介, 廣澤 成美, 坂本 武史, 松田 千代子, 辻村 和博, 玄 美燕, 高山 淳, 岡崎 真理, 植村 靖史, 坂本 安：新規フェルラ酸誘導体：PMF 解析用 Matrix としての特性の違い及びプロテオーム解析への応用。日本プロテオーム学会 2016 年大会（JHUPO 第 14 回大会）、2016 年 7 月 28 日～29 日（東京）。

加藤 洋介, 松田 千代子, 辻村 和博, 玄 美燕, 高山 淳, 岡崎 真理, 坂本 武史, 広澤 成美, 坂本 安：新規フェルラ酸誘導体の合成とプロテオーム解析用 MALDI マトリックスへの応用。第 60 回日本薬学会関東支部大会、2016 年 9 月 17 日（東京）。

玄 美燕, 木下 智史, 荒野 舞, 加藤 洋介, 高山 淳, 坂本 武史, 松崎 広和, 岡崎 真理：PC12 細胞の酸化ストレス障害に対する新規フェルラ酸誘導体 FAD024 の保護メカニズムの検討。第 60 回日本薬学会関東支部大会、2016 年 9 月 17 日（東京）。

浅野 昂志, 松崎 広和, 奥平 嵩士, 金本 貴文, 玄 美燕, 林 浩輔, 坂本 武史, 日比野 康英, 岡崎 真理：慢性脳低灌流ラットにおけるフェルラ酸誘導体 FAD012 の脳保護効果。第 19 回日本補完代替医療学会学術集会、2016 年 11 月 26 日～27 日（金沢）。

浅野 昂志, 松崎 広和, 岩田 直洋, 林 浩輔, 玄 美燕, 坂本 武史, 日比野 康英, 岡崎 真理：脳虚血再灌流ラットにおけるフェルラ酸誘導体 FAD012 の脳保護効果。第 90 回日本薬理学会年会、2017 年 3 月 15 日～17 日（長崎）。

松崎 広和, 清水 杏里, 金本 貴文, 奥平 嵩士, 浅野 昂志, 玄 美燕, 林 浩輔, 坂本 武史, 日比野 康英, 岡崎 真理：フェルラ酸誘導体 FAD012 の慢性脳低灌流ラットにおける学習障害軽減効果。日本薬学会第 137 年会、2017 年 3 月 24 日～27 日（仙台）。

浅野 昂志, 松崎 広和, 岩田 直洋, 林 浩輔, 玄 美燕, 坂本 武史, 日比野 康英, 岡崎 真理：慢性脳低灌流ラットにおいてフェルラ酸誘導体 FAD012 は黒質線条体ドパミン神経系を保護し嚔下反射機能を改善する。日本薬学会第 137 年会、2017 年 3 月 24 日～27 日（仙台）。

加藤 洋介, 松田 千代子, 辻村 和博, 玄 美燕, 高山 淳, 岡崎 真理, 坂本 武史, 広澤 成美, 坂本 安：MALDI-TOFMS PMF 解析用マトリックスとしてのフェルラ酸誘導体の評価。日本薬学会第 137 年会、2017 年 3 月 24 日～27 日（仙台）。

⑳ 玄 美燕, 中村 梨花, 林 浩輔, 加藤 洋介, 高山 淳, 坂本 武史, 松崎 広和, 岡崎 真理：PC12 細胞におけるフェルラ酸誘導体 FAD012 の酸化ストレス障害抑制メカニズムの検討。日本薬学会第 137 年会、2017 年 3 月 24 日～27 日（仙台）。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡崎 真理 (OKAZAKI MARI)
城西大学・薬学部・教授
研究者番号 : 50272901

(2)研究分担者

松崎 広和 (MATSUZAKI HIROKAZU)
城西大学・薬学部・助教
研究者番号 : 80582238

坂本 武史 (TAKESHI SAKAMOTO)
城西大学・薬学部・教授
研究者番号 : 20187040

玄 美燕 (Meiyan Xuan)
城西大学・薬学部・助手
研究者番号 : 50711751

日比野 康英 (HIBINO YASUhide)
城西大学・薬学部・教授
研究者番号 : 10189805

岩田 直洋 (IWATA NAOHIRO)
城西大学・薬学部・助教
研究者番号 : 50552759

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。