

研究テーマ

ドラッグリポジショニングによる脊髄損傷治療薬の開発

研究代表者

施設名 : 国立大学法人北海道大学
北海道大学病院 整形外科

氏 名 : 五月女 慧人

研究テーマ：ドラッグリポジショニングによる脊髄損傷治療薬の開発

所属先：国立大学法人北海道大学 北海道大学病院 整形外科

氏名：五月女 慧人

【目的と方法】

脊髄損傷は重篤な麻痺と疼痛を来す予後不良な疾患である。様々な治療方法が開発中であるが、臨床的に有効な治療方法は未だ確立されていない。

急性期脊髄損傷には、一次損傷と二次損傷が存在する。外傷などの機械的損傷である一次損傷が生じると、生物学的反応である二次損傷が起こり、脊髄の障害範囲はより拡大する。この二次損傷には、局所の出血、虚血や水腫、イオン不均衡、フリーラジカルや炎症物質の産生など、様々な機序の関与が示唆されているが、なかでも血液脊髄関門（**Blood-Spinal Cord Barrier: BSCB**）破綻の関与が大きいとされている。**BSCB**は、血管壁を形成する血管内皮細胞、**BSCB**の機能制御や維持を行うペリサイト、血管周囲を被覆するアストロサイトから構成されており、脊髄実質と血管内を隔て、イオンや分子、タンパク、細胞などの移動を制御し、脊髄の恒常性を維持する役割を持っている。**BSCB**が破綻すると、血管内から中枢神経実質に免疫細胞や組織障害性物質が流入し、より広範囲の組織障害が生じる（図1）。この**BSCB**の破綻を防ぐことが出来れば、二次損傷を軽減し、損傷範囲の縮小、麻痺の改善やADLの上昇が期待できるが、**BSCB**の破綻を防ぐ手段はいまだ確立されていない。

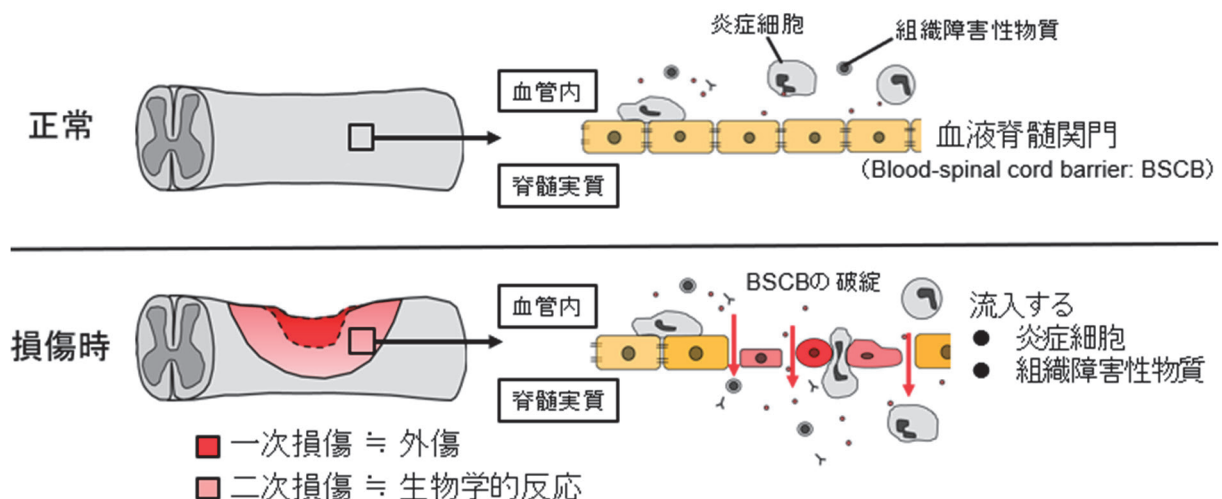


図1：脊髄損傷に伴うBSCBの破綻。正常な脊髄では、BSCBによって炎症細胞や組織障害性物質は血管内に留まるが（上）、BSCBが破綻すると炎症細胞や組織障害性物質が脊髄実質に流入し、脊髄の損傷範囲が拡大する（下）。

我々は、BSCBの主たる構成細胞である血管内皮細胞を保護する薬剤をスクリーニングするHigh-throughput screening assayを開発し、このassayによって同定された薬剤が、脊髄損傷後のBSCB機能保護を介して、神経組織を保護し、機能回復を促進することを確認した¹。そして、このassayを用いてFDA承認薬3,200種類の薬剤をスクリーニングした結果、BrexipiprazoleをBSCB保護薬の候補として同定した。Brexipiprazoleは、ドパミンD2受容体、セロトニン5-HT1受容体に部分アゴニストとして作用し、セロトニン5-HT2受容体にはアンタゴニストとして働く、SDAM（セロトニンドパミンアクティビティモデュレーター）で、統合失調症の治療薬として臨床応用されている²。しかし、Brexipiprazoleの血管内皮細胞に対する作用、BSCB機能に対する作用、外傷後の中枢神経保護作用は、これまで報告されていない。本研究の目的は、Brexipiprazoleの血管内皮保護作用、BSCB保護作用を検討し、急性期脊髄損傷に対する神経保護作用を明らかにすることである。

方法 1 : In vitro BSCB assayによる無酸素・無糖負荷 (Oxygen-glucose deprivation; OGD) 試験

我々のHigh-throughput screening assayは過酸化水素を用いて脳血管内皮細胞を障害するassayである。よりBSCBに近い状態を模擬したassayを用いて、過酸化水素以外の障害に対するBrexipiprazoleのBSCB保護効果を確認することとした。

ラット初代脳血管内皮細胞 (RBEC: rat brain endothelial cells) を用いたin vitro BSCB共培養モデルを、過去の報告と同様に作成した³⁻⁵ (図2)。24 well plate用のTranswellのinsertを上下反転させ、collagenをコーティングしたinsert下側のpolycarbonate膜にペリサイトを半球状に乗せ、3時間培養してペリサイトを接着させた。アストロサイトはプレートの底面に播種した。一晩かけて接着した後、collagenとfibronectinをコーティングしたTranswell insert上側のポリエステル膜にRBECを播種した。BSCB共培養モデルにはhydrocortisoneを含有したRBEC II培地を用いた。

細胞傷害性負荷として、OGD6時間と再酸素化 (Reox; Reoxygenation) 12時間を行った。OGD負荷には、hydrocortisoneを含有したDMEM/F12培地 (糖・血清不含) を用い、Anaero Pack Kenki 5%を使用して無酸素条件を作成した。OGD負荷後、hydrocortisone不含RBEC I培地に交換し、BrexipiprazoleまたはControl (1% ジメチルスルホキシド (DMSO)) を添加した。12時間のReox後、経内皮的電気抵抗 (Transendothelial electrical resistance: TEER) およびsodium fluorescein (Na-F) 透過性でその効果を評価した。

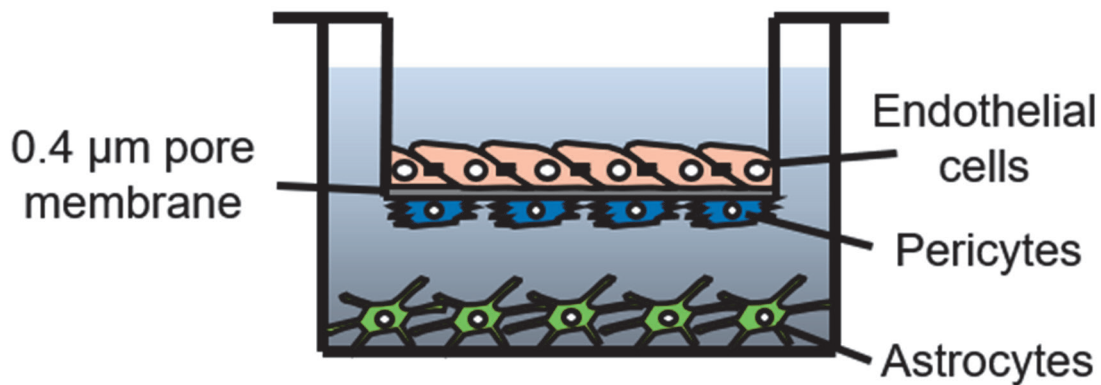


図 2. In vitro BSCB共培養モデルの概念図

BSCBの構成細胞である脳脊髄血管内皮細胞、周皮細胞（ペリサイト）、星状神経膠細胞（アストロサイト）の3種類の細胞により立体的に構成されている。

方法 2：ラット頸髄圧座損傷モデル

In vivoにおける、Brexipiprazoleの神経保護効果、機能回復効果を検証することとした。9～10週齢の雌性Lewisラットを各群14体ずつ使用した。Lewis系ラットの頸椎後方より切開を加え、第5頸椎（C5）椎弓切除術を施行した。C5頸髄高位に、Infinite Horizons Impactorを用いて、200 kdynの頸髄圧挫損傷を作成した。実験動物の麻酔には、ケタミンとメドミジンの混合液を用い、腹腔内投与した。手術後、実験動物は電子保温パッド（37℃）上で保温し、antisedanを腹腔内投与して麻酔からの覚醒を行った。脊髄損傷作成直後に、BrexipiprazoleまたはControl（1% DMSO）を1週間連続で筋肉内投与した（1 mg/kg）。損傷作成前、損傷作成4週後、損傷作成8週後にElectric von Frey 試験とトレッドミル歩行解析試験を行った。損傷作成8週後に4%Paraformaldehydeで灌流固定を行い、脊髄の水平断切片を作成し、免疫蛍光染色を行い、空洞面積とグリア瘢痕面積を評価した。

● Electric von Frey試験

Dynamic Plantar Aesthesiometerを用いて、ラットの前後肢の感覚機能を評価した。全てのラットは脊髄損傷作成前に、試験用の暗室で10分間自由に行動させ、暗室への馴化を行った。試験の際は、まず暗室に入れて5分間自由に行動させた。ラットの行動が落ち着いた後に、20秒かけて0 gから40 gまで徐々に負荷がかかるように、φ0.5 mm径のフィラメントを両前後肢に当て、ラットが肢を離すまでの時間を計測した。両前後肢に各3回ずつ試験を行い、その平均値を結果として使用した。試験を同個体に行う場合、最低1分以上のインターバルを設けた。

● トレッドミル歩行解析試験

DigiGait歩行解析システムを使用したトレッドミル歩行解析を行った。実際の歩行試験前に、トレッドミル上で歩行をさせ、馴化を行った。試験日は、1分間、ラットを

トレッドミル上に静置した後、5 cm/sから20 cm/sの速さまで5 cm/sごとに、トレッドミルの速度を増加させた。10歩以上歩行できたものを歩行可能と定義し、その動画を解析した。

● 組織評価

灌流固定したラットの脊髄を摘出し、厚み30 μm の水平断切片を作成した。180 μm ごとの切片をGFAPで免疫蛍光染色し、左右の灰白質の距離が最も近いものから順に3つの切片を選択した。オールインワン蛍光顕微鏡で組織の観察を行い、Photoshop CS3で撮影した画像を白黒に二値化して、空洞部の面積とグリア瘢痕面積を定量した。

方法3：Brexpiprazoleの薬理機序検討

Brexpiprazoleの主たる薬理作用は①セロトニン1A受容体（5-HT_{1R}）刺激、②セロトニン2A受容体（5-HT_{2R}）阻害、③ドパミンD₂受容体（D_{2R}）刺激である。これらの薬理作用を示す薬剤を単独、あるいは複数組み合わせ、我々が開発したHigh-throughput screening assayで細胞保護効果を検証することとした。96 well plateにヒト脳血管内皮細胞（hCMEC/D3）をEBM-2培地（成長因子不含、FBS 不含）とともに播種した。24時間経過後、各種薬剤を20 μL 添加し、さらに24時間経過後に過酸化水素含有培地を20 μL 添加した。6時間後、PrestoBlueを11 μL 添加して細胞活性を評価した（図3）。5-HT_{1R}刺激にはIpsapirone、5-HT_{2R}阻害にはMDL100907、D_{2R}刺激にはSumanitrole Maleateを代表薬剤として使用した。

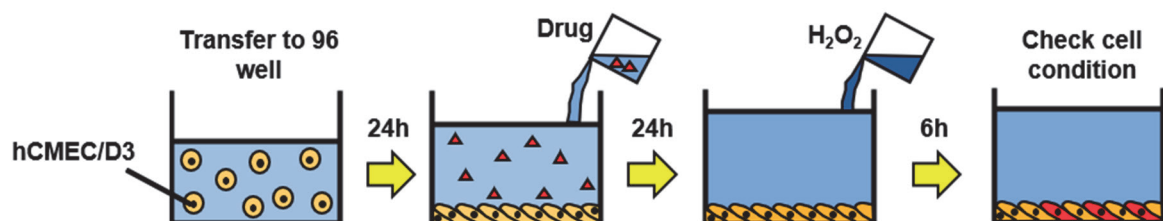


図3：assayの概要

ヒト脳血管内皮細胞に各種薬剤を添加し、過酸化水素による細胞障害の程度を、吸光度を利用して確認する。

統計学的解析

2群間の有意差検定にはStudent's t検定（two-tailed）を、3群間の有意差検定にはOne-way ANOVA解析を行い、Post-hoc testとしてTukey-Kramer testを用いた。p値は0.05未満を有意とした。データは、平均値 $\pm$ 標準偏差（Mean $\pm$ SD）で示した。すべての統計解析は統計解析ソフトJMP Pro 17を用いて行った。

【結果】

結果 1 : In vitro BSCB assayによるOGD試験

In vitro BSCB assayで、BrexpiprazoleのOGD負荷条件下に対する細胞保護効果を検討した。TEERはBSCBが保たれているほど高値に、Na-F透過性はBSCBが保たれているほど低値となる。OGDとReoxによって、TEERは有意に対照の34%まで低下したが、Brexpiprazole投与により、80%までにとどまった。Na-F透過性は、OGDとReoxによって、6倍増加したが、Brexpiprazole投与により、2倍に留まり、Brexpiprazoleは有意にNa-F透過性の亢進を抑制した。Brexpiprazoleはin vitro BSCBモデルのバリア機能を、OGDとReox負荷から維持することが示された（図4）。

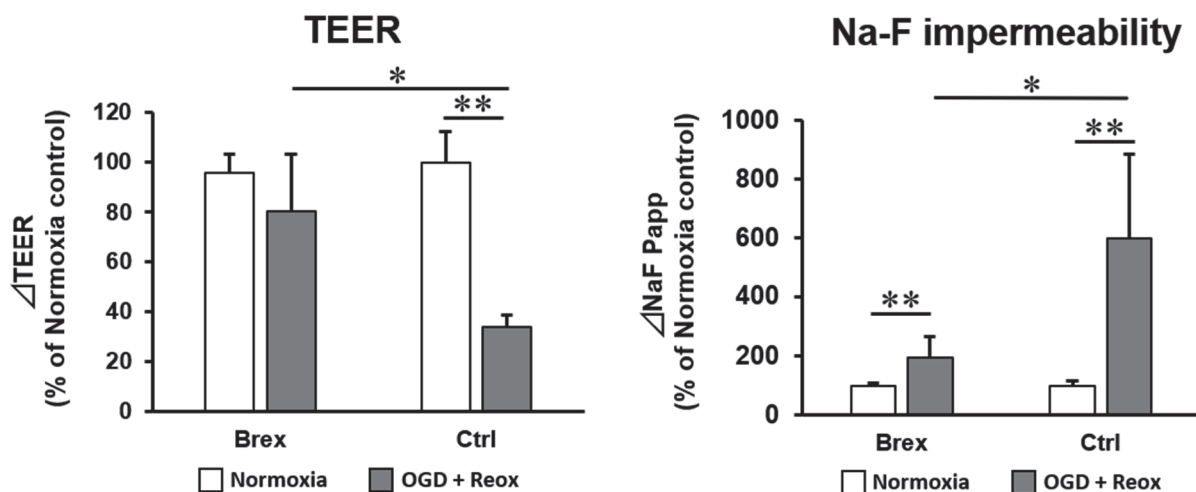


図 4 : BrexpiprazoleのOGD負荷に対するin vitro BSCB保護効果

BrexpiprazoleはOGD+Reox条件下において、Control（1%DMSO）と比較し有意にTEERとNa-F透過性を改善した。

結果 2 : ラット頸髄圧座損傷モデル

● Electric von Frey試験

前肢の反応時間は、脊髄損傷前と比較して損傷後に遅延していた。損傷後4週で、両前肢の反応時間が、損傷前に比較して短縮したが、Control群の方がBrexpiprazole群よりも有意に短縮していた。また、損傷後8週でも、右前肢でControl群がBrexpiprazole群よりも、有意に短縮していた。後肢の反応時間は、脊髄損傷による変化を認めなかった（図5）。

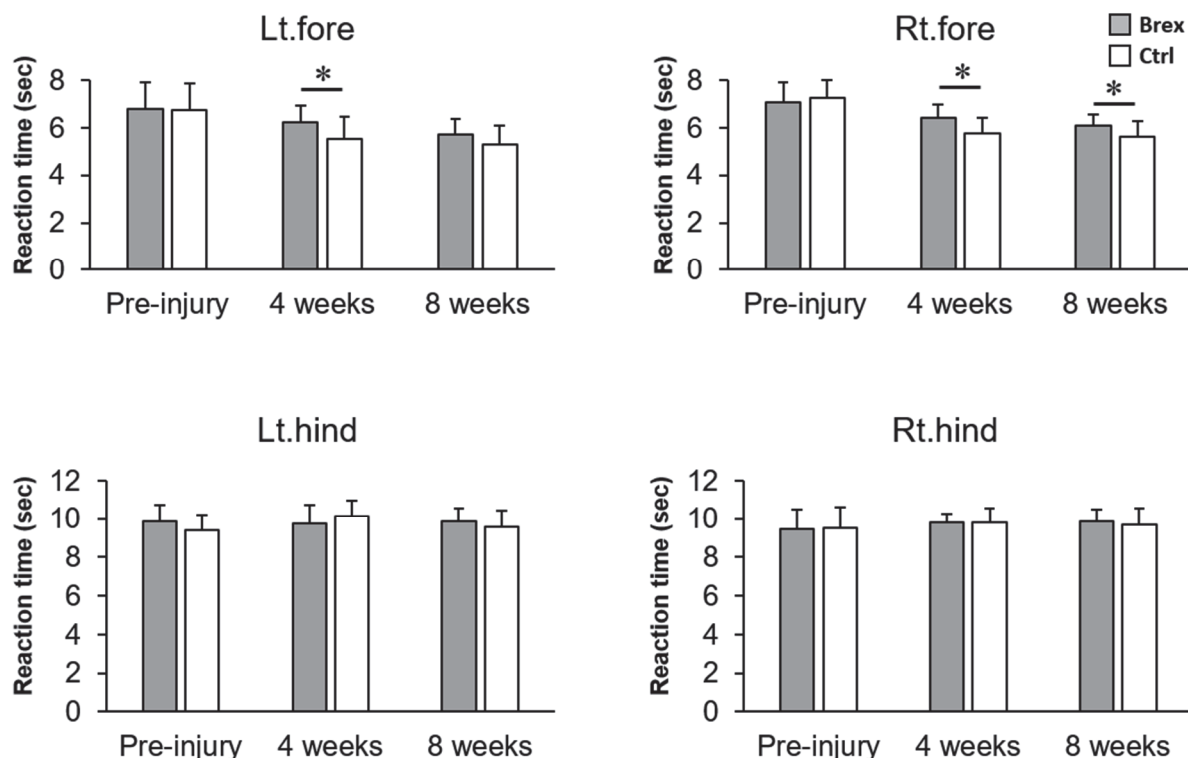


図 5 : Electric von Frey試験結果

損傷前の前肢の反応時間はBrexpirozole群とControl群で有意差がなかったが、損傷後4週では両前肢、損傷後8週では右前肢の反応時間の遅延が、Brexpirozole群で有意に改善していた。後肢の反応時間は、損傷前後で変化がなかった。

● トレッドミル歩行解析試験

トレッドミルの速度を5cm/sにしても、トレッドミル上での歩行ができなかった個体が、損傷後4週でControl群4匹、Brexpirozole群2匹、損傷後8週で、Control群2匹、Brexpirozole群2匹であった。歩行解析の結果、脊髄損傷後4週、8週共に、Control群の歩隔（Stance width）が有意に拡大したが、Brexpirozole群のStance widthは損傷前と有意な変化を認めなかった。後肢のStance widthは、両群ともに、4週で拡大したが、8週で損傷前と変わらない状態に回復した（図6）。

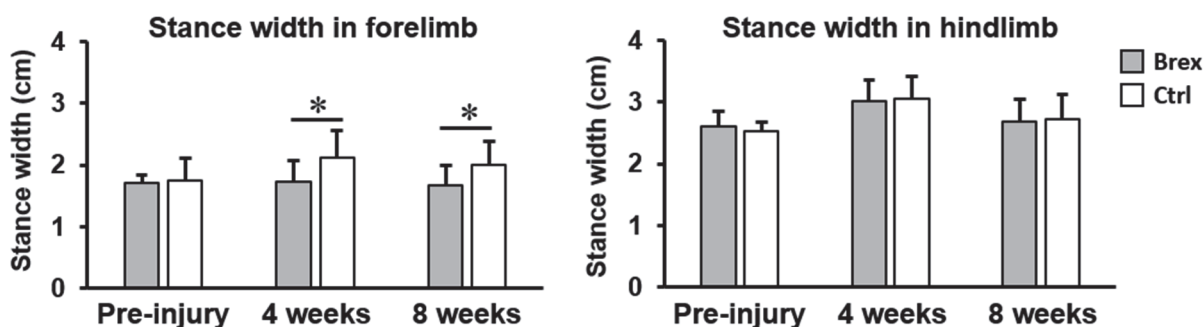


図 6 : トレッドミル歩行解析結果

脊髄損傷によって、四肢が麻痺すると、体幹を支えることが出来ないため**stance width**は拡大する。**Brexipiprazole**群の**Stance width**は損傷前と比較しても、有意な変化を認めなかった。

● 組織評価

損傷後8週で灌流固定を行い、**Brexipiprazole**群と**Control**群の損傷脊髄の切片の組織評価を行ったところ、**Brexipiprazole**群で**Control**群と比較して、有意に空洞面積が縮小しており、グリア瘢痕面積も有意に縮小していた（図7）。

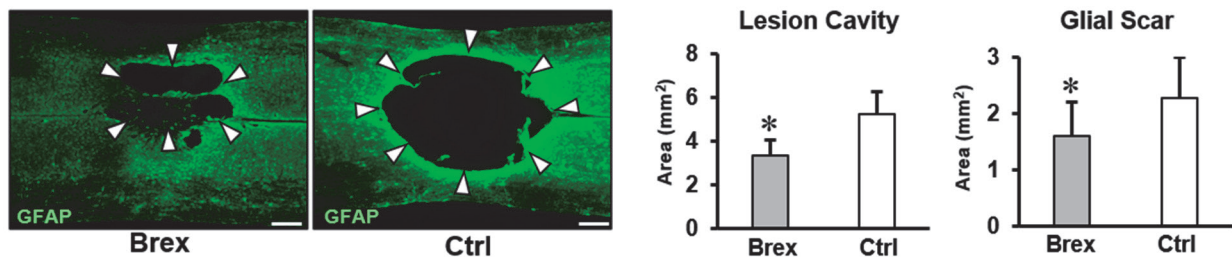


図7：損傷後8週の組織学的評価項目

空洞面積（画像中心の空洞部）、グリア瘢痕面積（GFAP染色性+の領域）ともに、**Brexipiprazole**群で有意に縮小しており、**Brexipiprazole**の神経組織保護効果が示された。

結果3：Brexipiprazoleの薬理機序検討

Ipsapirone (5-HT_{1R}刺激)、**MDL100907** (5-HT_{2R}阻害)、**Sumanitrole Maleate** (D_{2R}刺激)を単剤、あるいは複数組み合わせ、**hCMEC/D3**の細胞保護効果を検証したが、いずれの場合も、脳血管内皮細胞効果は全く認められなかった（図8）。

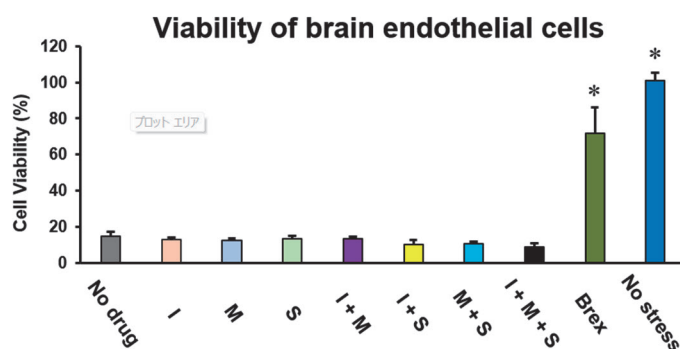


図8：各種薬剤のヒト脳血管内皮細胞保護効果

Brexipiprazoleの主たる薬理作用と類似した作用の薬剤を添加しても、脳血管内皮細胞保護効果は認められなかった。**Brexipiprazole**の細胞保護効果は、**SDAM**による機序を介していないことが示唆される。※ I : **Ipsapirone**、M : **MDL100907**、S : **Sumanitrole Maleate**

【考察】

Brexpiprazoleはin vitro BSCBモデルのバリア機能に対して保護作用を示し、in vivoにおいて脊髄損傷後の神経保護効果、機能改善効果を示した。これらの作用機序は、BrexpiprazoleがBSCBを構成する主細胞である脳血管内皮細胞を、血管内から保護することで、脊髄損傷による、BSCB破綻を減弱し、その結果、細胞障害性物質や炎症細胞の脊髄実質部への拡散が抑制されることで、組織障害が減弱したものと考えられる。また、Brexpiprazoleは、BSCB透過性があるため⁶、血管内皮細胞だけでなく、グリア細胞、神経細胞に対しても直接影響を及ぼすことができる。血管内皮細胞だけでなく、これらの細胞に対する直接の細胞保護効果を有している可能性もある。

また、Brexpiprazoleの薬理機序に関しては、主たる薬理作用である、SDAMによる機序を介していないことが示唆された。Brexpiprazoleには、AMPK/SREBP1経路を介して、大腸がんの細胞増殖を抑制したり⁷、PC12細胞における神経突起伸長を増強したりする作用を持つことも報告されている⁸ことから、本研究で認められた細胞保護効果もSDAM以外の機序を介している可能性が高い。今後はRNAシーケンスなどにより、その詳細な機序の解明を検討している。

Brexpiprazoleは副作用が少ない抗精神病薬として知られており、既に臨床使用されている薬剤であることから、急性期脊髄損傷、周術期の使用に際して、懸念される副作用が乏しい。また、本研究での投与濃度も、過去の動物モデルに使用した濃度と同様であり、比較的早期に臨床治験を行える可能性がある。引き続き本薬剤の臨床応用に向けて、研究を進めていく予定である。

【結論】

1. Brexpiprazoleのin vitro BSCB保護効果、ラット脊髄圧座損傷モデルでの、BSCB保護作用、神経組織保護作用、機能回復促進効果を検討した。
2. Brexpiprazoleは脊髄損傷後のBSCB機能を保護することで、二次損傷を抑制し、神経組織保護効果と機能回復促進効果を有していた。
3. BrexpiprazoleのBSCB保護効果は、主たる薬理作用である、SDAMによる機序を介しておらず、未知の機序が関与していることが示唆された。

【参考文献】

1. Suzuki Y, Nakagawa S, Endo T, et al. High-throughput screening assay identifies berberine and mubritinib as neuroprotection drugs for spinal cord injury via blood-spinal cord barrier protection. *Neurotherapeutics*. 2022;19(6):1976-1991.
2. Yee A. Brexpiprazole for the treatment of schizophrenia. *Expert Review of Neurotherapeutics*. 2016;16(2):109-122.
3. Deli MA, Ábrahám CS, Kataoka Y, Niwa M. Permeability studies on in vitro blood-brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology. *Cell Mol Neurobiol*.

2005;25(1):59-127.

4. Nakagawa S, Deli MA, Nakao S, et al. Pericytes from brain microvessels strengthen the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells. *Cell Mol Neurobiol*. 2007;27(6):687-694.
5. Nakagawa S, Deli MA, Kawaguchi H, et al. A new blood–brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochemistry International*. 2009;54(3-4):253-263.
6. Girgis RR, Forbes A, Abi-Dargham A, Slifstein M. A positron emission tomography occupancy study of brexpiprazole at dopamine D2 and D3 and serotonin 5-HT1A and 5-HT2A receptors, and serotonin reuptake transporters in subjects with schizophrenia. *Neuropsychopharmacol*. 2020;45(5):786-792.
7. Li T, Liu X, Long X, et al. Brexpiprazole suppresses cell proliferation and de novo lipogenesis through AMPK/SREBP1 pathway in colorectal cancer. *Environmental Toxicology*. 2023;38(10):2352-2360.
8. Ishima T, Futamura T, Ohgi Y, Yoshimi N, Kikuchi T, Hashimoto K. Potentiation of neurite outgrowth by brexpiprazole, a novel serotonin–dopamine activity modulator: A role for serotonin 5-HT1A and 5-HT2A receptors. *European Neuropsychopharmacology*. 2015;25(4):505-511.