



## GIF-0173 protects against cerebral infarction through DP1 receptor activation

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2010-10-06 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Min, Thura メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1929">http://hdl.handle.net/10271/1929</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 5 5 3 号	学位授与年月日	平成 21 年 9 月 18 日
氏 名	Min Thura		
論文題目	GIF-0173 protects against cerebral infarction through DP1 receptor activation (GIF-0173 は脳梗塞に対し、DP1 受容体を介し脳保護作用を示す)		

博士(医学) Min Thura

## 論文題目

GIF-0173 protects against cerebral infarction through DP1 receptor activation

(GIF-0173 は脳梗塞に対し、DP1 受容体を介し脳保護作用を示す)

## 論文の内容の要旨

[はじめに]

シクロペンテノン構造を持つプロスタグランジン  $PGI_2$  の誘導体である GIF-0173 は、*in vitro* の実験において強い神経突起伸張作用を有し、さらに GIF-0173 は抗アポトーシス作用も持った化合物であるということが報告されている。しかし脳梗塞急性期における効果について検討はされておらず、そこで今回の研究で GIF-0173 の脳梗塞急性期への影響を検討するとともに、そのメカニズム解明を行った。

[材料ならびに方法]

*in vivo* の実験には Sprague-Dawley 雄性ラット 8 週齢を供した。脳梗塞モデルには photochemical induced thrombosis (PIT) モデルを用いた。脳梗塞モデル作製直後に左大腿静脈に留置したカニューレより GIF-0173 を投与した。投与後 24 時間目に神経症状をスコア化し、麻痺症状を評価した。その後に 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride で染色し、コンピュータ解析により脳梗塞サイズを計測した。

GIF-0173 の脳血流に対する影響は、ペナンプラ領域に留置したレーザードップラー血流計にて脳血流を測定することで評価を行った。PIT モデル作製直後 GIF-0173 を投与し、連続的に 1 時間目まで脳血流、血圧および心拍数を測定した。

*in vitro* の実験では Wistar 雄性ラット 1 日齢を供した。エーテル麻酔下に大脳を摘出し、ホモジナイズした大脳皮質神経細胞を培養した。培養開始から 10~14 日目に初代培養神経細胞を実験に用いた。

神経細胞の形態学的変化は微分干渉顕微鏡を用いて検討を行った。観察開始 20 分前に GIF-0173 (最終濃度  $0.03\sim 0.3 \mu\text{mol/L}$ ) を滴下し、 $37^\circ\text{C}$ 、二酸化炭素濃度 5 % の条件下にて培養を行った。そしてグルタミン酸滴下による神経細胞の変化を、4 分間隔で 20 分間観察した。

細胞死率は propidium iodide (PI) 染色により観察を行った。グルタミン酸刺激の 20 分前に GIF-0173 を滴下し、6 時間培養を行い、核内に取り込まれた PI を指標に細胞死率を算出した。

細胞内カルシウムイオン濃度の測定には共焦点レーザー顕微鏡を用いた。実験開始 20 分前に GIF-0173 を滴下し、カルシウム指示薬である Fluo-3 AM により染色される神経細胞内のカルシウムを実験前と比較し、検討を行った。

[結果]

脳梗塞モデルを用いた *in vivo* の実験では、GIF-0173 の投与により用量依存的に 24 時間目における神経症状および脳梗塞サイズの改善を認めた。しかし、GIF-0173 は投与から 1 時間目までペナンプラ領域の脳血流に影響をおよぼさなかった。

*in vitro* の実験では、神経細胞に対し GIF-0173 は細胞腫脹および細胞死を用量依存的に抑制した。また、GIF-0173 はグルタミン酸刺激による細胞内カルシウム流入を用量依存的に抑制した。

しかし GIF-0173 は N-メチル-D-アスパラギン酸およびカイニン酸刺激による細胞内カルシウム流入を抑制しなかった。GIF-0173 が持つ細胞内へのカルシウム流入抑制作用はプロスタグランジン D2 受容体拮抗薬、BWA868C により減じた。また、プロスタグランジン D1 受容体作動薬である BW245C は GIF-0173 同様に、グルタミン酸による細胞内カルシウム流入を抑制した。小胞体の SERCA ポンプ阻害薬であるタプシガルジンを併用することにより GIF-0173 が持つ細胞内へのカルシウム流入抑制作用を減じた。

#### [考察]

GIF-0173 はプロスタグランジン J<sub>2</sub> 誘導体であることから、プロスタグランジン D 受容体への影響を検討したところ、GIF-0173 はプロスタグランジン D2 受容体拮抗薬により細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が抑えられ、またプロスタグランジン D1 受容体作動薬は GIF-0173 同様、グルタミン酸刺激によるカルシウム流入を抑制した。また SERCA ポンプの阻害薬を用いることで GIF-0173 のカルシウム流入抑制作用が減じた。このことから GIF-0173 はプロスタグランジン D1 受容体を介し、小胞体に存在する SERCA ポンプの機能を増強することで、細胞内のカルシウム上昇を抑えていることが示唆された。

#### [結論]

本研究においてプロスタグランジン J<sub>2</sub> 誘導体である GIF-0173 が脳梗塞急性期において脳保護作用を持つ化合物であることが初めて明らかとなった。またこの作用はプロスタグランジン D1 を介することで神経細胞を直接的に保護しており、今後 GIF-0173 が脳梗塞急性期における治療薬となる可能性が示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

プロスタグランジン J<sub>2</sub> の誘導体である GIF-0173 は、*in vitro* の実験において強い神経突起伸展作用を有することが知られている。GIF-0173 には神経細胞のアポトーシス抑制作用も報告されている。しかし、脳梗塞急性期におこるネクローシスへの効果について検討はされていない。そこで申請者は、GIF-0173 の脳梗塞急性期への影響を検討し、そのメカニズムの解析を行った。

脳梗塞モデルは Sprague-Dawley 雄性ラット 8 週齢を用いて、photochemical induced thrombosis (PIT) により作製し、脳梗塞モデル作製直後に左大腿静脈に留置したカニューレより GIF-0173 を投与した。

24 時間後に神経症状をスコア化して定量的に評価し、脳梗塞サイズは、2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 染色法を用い、非染色部位の面積をコンピュータ計測して評価した。また、脳血流に対する影響は、血圧、心拍数に加えて、ペナンプラ領域に留置したレーザードップラー血流計にて脳血流を測定して評価を行った。その結果、GIF-0173 の投与により用量依存的に 24 時間後の神経症状および脳梗塞サイズの改善を認めた。しかし、1 時間後のペナンプラ領域の脳血流には影響をおよぼさなかった。

GIF-0173 の脳梗塞急性期での保護効果のメカニズムを解析するため、グルタミン酸神経毒性による細胞ネクローシスへの作用を検討した。Wistar 雄性ラット 1 日齢から大脳を摘出して培養し、培養開始後 10-14 日の初代培養神経細胞を実験に用いた。グルタミン酸添加 20 分前に GIF-0173 (最終濃度 0.03-0.3  $\mu$  mol/L) を添加し、37°C、二酸化炭素濃度 5% の条件下において細胞ネクローシスへの作用を観察した。

グルタミン酸滴下による神経細胞の形態学的変化を微分干渉顕微鏡を用いて 4 分間隔で 20

分間観察し、細胞死は6時間後に核内に取り込まれた propidium iodide (PI) を指標にして細胞死率を算出した。GIF-0173 はネクロシスに認められる細胞腫脹および PI の核内取り込みを用量依存的に抑制した。

共焦点レーザー顕微鏡を用いカルシウム指示薬である fluo-3 を負荷した細胞の細胞内カルシウムイオン濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) の変化を測定した。GIF-0173 はグルタミン酸刺激による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇を用量依存的に抑制したが、N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) およびカイニン酸刺激による細胞外からの  $Ca^{2+}$  流入は抑制しなかった。プロスタグランジン  $D_2$  受容体 (DP1 および DP2) の非選択的拮抗薬、BWA868C 存在下では GIF-0173 はグルタミン酸刺激による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇を抑制しなかった。一方、DP1 受容体選択的作動薬である BW245C は GIF-0173 同様に、グルタミン酸による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇を抑制した。また、小胞体の  $Ca^{2+}$  ポンプ阻害薬であるタプシガルジンはグルタミン酸神経毒性に対する GIF-0173 の抑制作用を減弱した。

以上からプロスタグランジン  $J_2$  誘導体である GIF-0173 は、プロスタグランジン  $D_2$  の DP1 受容体を介し、小胞体に存在する  $Ca^{2+}$  ポンプの機能を増強することで、グルタミン酸による  $[Ca^{2+}]_i$  過剰の結果として起こるネクロシス性の神経毒性を抑制することが示唆された。

審査委員会では、申請者がプロスタグランジン  $J_2$  誘導体である GIF-0173 が脳梗塞急性期において脳保護作用を持つことを初めて示し、さらに、この作用が DP1 受容体を介した神経細胞への直接作用であることを明らかにしたことにより、今後 GIF-0173 が脳梗塞急性期における治療薬となる可能性に示唆を与えた点を高く評価した。

審査の過程において、申請者に対して次のような質問がなされた。

- 1) GIF-0173 の体内動態・代謝経路について
- 2) 脳梗塞モデルにおける GIF-0173 の作用は他の脳保護剤と比較してどうか
- 3) 線条体の梗塞巣に対しての GIF-0173 の効果は皮質より弱かったか
- 4) ペナンプラ領域はどのように決めたか、脳血流は他部位と差があったか
- 5) GIF-0173 による脳血流変化で平均値が同等のコントロールより SD 値が小さい意味は何か
- 6) プロスタグランジン  $J_2$  や  $D_2$  に脳血管拡張作用はないのか
- 7) GIF-0173 の有効濃度が細胞死率と細胞腫脹で異なるのはなぜか
- 8) 細胞浮腫と  $[Ca^{2+}]_i$  上昇の因果関係は
- 9) ネクロシスと判断できる根拠は
- 10) NMDA 誘発の  $[Ca^{2+}]_i$  上昇が fluo-3 の  $Ca^{2+}$  解離定数では測定できない可能性は
- 11) DP1 受容体の選択的阻害薬は使えなかったのか
- 12) BW245C と GIF-0173 を同時に投与した場合の結果をどう予測するか
- 13) BW245C は細胞死率と細胞腫脹にも保護的作用があったか
- 14) グルタミン酸神経毒性の刺激条件をもう少し弱めたほうが良いのではないか
- 15) グルタミン酸誘発  $[Ca^{2+}]_i$  上昇の経路としてメタボトロピック受容体はあるか
- 16) グルタミン酸誘発  $[Ca^{2+}]_i$  上昇の時間経過が実験条件により異なるのはなぜか
- 17) タプシガルジンは GIF-0173 のグルタミン酸誘発  $[Ca^{2+}]_i$  上昇抑制に影響したか
- 18) タプシガルジン単独での細胞死率に対する効果はどうだったか
- 19) タプシガルジンは小胞体の貯蔵  $Ca^{2+}$  を枯渇させたか
- 20) NMDA 誘発の  $[Ca^{2+}]_i$  上昇には小胞体  $Ca^{2+}$  ポンプの作用は関与しないのか
- 21) PKA 促進/抑制剤の効果は調べたか

これらの質問の対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 福田 敦夫  
副査 浦野 哲盟 副査 川上 純一