流体衝撃による脳傷害後のマウス脳浮腫に対するエンドセリン ET_B 受容体遮断薬の効果 —血管透過性亢進因子 VEGF-A の関与—

道永昌太郎

The Endothelin ET_B Receptor Antagonist BQ788 Protects against Brain Edema after Fluid Percussion Injury by Decreasing Vascular Endothelial Growth Factor-A Expression in Mice

Shotaro Michinaga

Laboratory of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Osaka Ohtani University;
3-11-1 Nishikiori-Kita, Tonda-bayashi, Osaka 584-8540, Japan.

(Received June 4, 2017)

Brain edema is a severe morbid complication of brain injury, characterized by excessive fluid accumulation and an elevation of intracranial pressure. However, effective anti-brain edema drugs are lacking. One of the causes of brain edema is disruption of blood-brain barrier (BBB) function, which results in extravasation of intravascular fluid. After brain damage, astrocytes are activated, and astrocyte-derived vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) is known to induce BBB dysfunction. Therefore maintaining BBB integrity by regulating astrocyte function is a potentially effective strategy for treating brain edema. In this review, we focus on the endothelin ET_B receptor and its role in regulation of astrocyte functions. In mice, brain damage was induced by fluid percussion injury (FPI), and the resulting BBB disruption and brain edema were observed in the mouse cerebrum. BQ788, a selective ET_B receptor antagonist, attenuated the FPI-induced BBB disruption and brain edema. Levels of brain VEGF-A increased after FPI, mainly in reactive astrocytes. BQ788 suppressed the FPI-induced increase in VEGF-A expression in reactive astrocytes. Moreover, intraventricular administration of VEGF neutralizing antibody also attenuated FPI-induced BBB disruption and brain edema. Claudin-5 is an endothelial tight junction protein essential for normal BBB structure and function. Levels of claudin-5 protein were reduced by FPI. Furthermore, VEGF neutralizing antibody blocked FPI-induced decrease in claudin-5. These results suggest that the ET_B receptor antagonist BQ788 protects against brain edema by inhibiting VEGF-A-mediated decrease in claudin-5.

Key words—brain edema; endothelin ET_B receptor; astrocyte; vascular endothelial growth factor-A

1. はじめに

脳浮腫は脳水分含量の過剰な増加及び頭蓋内圧の上昇を特徴とする病態であり、頭部外傷や脳血管傷害などの脳傷害によって引き起こされ、その後の呼吸不全による突然死や四肢の麻痺などの後遺症の一因となる。^{1,2)} 現在、脳浮腫に対する治療薬としてはステロイド薬、利尿薬及び高張液が主に使用されているが、これらは対処療法に過ぎず、脳浮腫の根本的な原因を抑える薬ではない。したがって、脳浮腫を根本的に治療するためには、現在使用されている治療薬とは作用機序が異なる新たな脳浮腫治療薬の

開発が必要とされている。³⁻⁵⁾

脳浮腫の病態は、細胞内への水分の貯留が原因となる細胞毒性浮腫と血管内から漏出した水分の脳実質内への貯留が原因となる血管原生浮腫に分類される。^{2,6,7)} 特に後者は、脳浮腫の特徴である脳水分量の過剰な増加の主な原因として考えられており、脳傷害後の血液脳関門 (blood-brain barrier; BBB) の破綻により引き起こされることが知られている。^{2,6,7)} BBB の破綻により脳血管の透過性が過剰に亢進してしまうと、血管内の水分やアルブミンなどが脳実質内へ漏出してしまい、脳実質内への過剰な水分の貯留が引き起こされる。^{2,6,7)} したがって、脳傷害後の BBB 破綻を抑制することは脳水分量の過剰な増加を抑制し、脳浮腫の抑制につながると考えられる。

大阪大谷大学薬学部薬理学講座 (〒584-8540 大阪府富田林市錦織北 3-11-1)

e-mail: mitinasy@osaka-ohtani.ac.jp

本総説は、平成 28 年度日本薬学会近畿支部奨励賞 (生物系薬学) の受賞を記念して記述したものである。

Fig. 1. Involvement of Reactive Astrocytes in Brain Edema

Under normal conditions, astrocytes regulate endothelial cells through their end-feet and play a key role in maintaining BBB function. After brain damage, astrocytes are activated, and these reactive astrocytes produce vascular permeability factors resulting in BBB disruption. The BBB disruption accelerates the extravasation of intravascular fluid, leading to brain edema.

2. アストロサイトを標的とした脳浮腫治療薬の探索

脳浮腫の発生には脳に存在する様々な細胞が関与しているが、それらの細胞の中でも特に、脳グリア細胞の一種であるアストロサイトが注目される。アストロサイトの end-feet は BBB を構成する血管内皮細胞に隣接しており、血管内皮細胞の機能をコントロールすることで BBB のバリア機能を維持するための重要な役割を担っている。^{8,9)} しかしながら、脳傷害後に活性化されるアストロサイトにより産生される血管透過性亢進因子などは、この BBB のバリア機能の破綻を促すことで脳浮腫の一因となっている (Fig. 1)。

以前に筆者らが行った研究において、マウスの脳に凍結傷害を与えると、BBB の破綻による血管原生脳浮腫が惹起され、この血管原生脳浮腫の発生にはアストロサイト由来の血管透過性亢進因子が関与することが示唆された。¹⁰⁻¹²⁾ したがって、脳傷害後のアストロサイトの機能をコントロールし、活性型

道永昌太郎

大阪大谷大学薬学部薬理学講座助教、博士 (薬学)。2007 年福山大学薬学部卒業。2009 年熊本大学大学院薬学教育部博士前期課程修了 (香月博志教授)。2011 年熊本大学大学院薬学教育部博士後期課程中途退学後、同年より現職 (小山 豊教授)。

アストロサイト由来の血管透過性亢進因子の産生を抑制することで、BBBの破綻により惹起される血管原生脳浮腫を緩和できることが期待される。

現在、臨床で使用されている中枢神経疾患治療薬のターゲットは主に神経細胞であり、アストロサイトをメインターゲットとした治療薬は開発されていない。アストロサイトは脳傷害だけではなく、様々な中枢神経疾患の病態形成にも関与している。そのため、アストロサイトを標的とした薬物は現在の治療薬では十分な効果が得られない中枢神経疾患に対しても、有効性を示す可能性が考えられる。

3. 頭部外傷マウスの作製及び脳浮腫の評価

本稿では、脳傷害による脳浮腫を惹起させるための方法として、臨床における頭部外傷モデルとして確立されている流体衝撃傷害 (fluid percussion injury; FPI) について紹介する。FPIを与えるために Fluid percussion 装置 (Model FP302, AmScien Instruments, Richmond) を使用し、この装置によって発生させる水圧によりマウスの脳に打撃による頭部外傷を与えた (Fig. 2)。FPIを与えた直後のマウスにおいて、数秒から数十秒程度の四肢の痙攣及び呼吸麻痺がみられ、これらの反応がみられたマウスを頭部外傷モデルとした。

脳浮腫の評価は脳浮腫の特徴である脳水分含有量の増加により確認した。脳水分含有量は脳摘出直後の脳重量 (wet weight) 及び 70°C で一晩乾燥させた後の脳重量 (dry weight) を用いた wet-dry 法による計算式 [脳水分含有量 (%) = (wet weight - dry weight) × 100 / wet weight] により計算した。また、BBBの破綻はマウスの尾静脈血管内より投与した Evans blue 色素の脳血管外への漏出により評価した。FPIによる頭部外傷後、マウスの脳組織において水分含有量の増加が認められた [Fig. 3 (A)]。また、FPIを与えたマウス脳の傷害半球では Evans blue 色素の漏出が増加しており、BBBの破綻も確認された [Fig. 3 (B)]。

4. ET_B 受容体遮断薬の抗脳浮腫効果

これまでの本研究室における研究成果により、種々の中枢神経疾患への関与が知られている生理活性ペプチドであるエンドセリン (ET) が ET 受容体のサブタイプである ET_B 受容体を介してアストロサイトを活性化させ、血管透過性亢進因子の産生を増加させることが明らかとなった。^{10,12)} この結果

Fig. 2. Fluid Percussion Injury

To induce brain damage by fluid percussion injury in the mouse cerebrum, a fluid percussion device was used.

は、アストロサイトの機能調節及び血管透過性亢進因子の産生における ET_B 受容体の重要性を示している。

FPIによる頭部外傷マウスの脳浮腫に対する ET_B 受容体遮断薬の効果を検討したところ、ET_B 受容体選択的拮抗薬である BQ788 を投与したマウスでは、FPI後にみられる BBBの破綻が抑制された。また、BQ788投与は、FPI後の脳水分含有率の増加も抑制した。これらの結果より、ET_B 受容体遮断薬による抗脳浮腫作用が示された。

5. ET_B 受容体遮断薬による抗脳浮腫作用の機序—VEGF-Aの関与—

活性型アストロサイトによって産生される vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) が BBB破綻の一因であることが知られている。¹³⁾ また、本研究室における研究成果により、ET_B 受容体作動薬が培養アストロサイト及びラット脳における VEGF-Aの発現を増加させることが確認されてい

Fig. 3. BBB Disruption and Brain Edema after Brain Damage by FPI

(A) Brain edema was evaluated by measuring brain water content. Brain water content was calculated with the following formula: Brain water content (%) = $[\text{wet weight (g)} - \text{dry weight (g)}] \times 100 / \text{wet weight (g)}$. Results are expressed as means $\pm$ S.E.M. of six mice. ** $p < 0.01$ vs. Sham-operated group by one-way ANOVA followed by Tukey's test. (B) BBB disruption was evaluated by measuring extravasation of Evans blue dye. Evans blue was administered into the tail vein, and the rate of Evans blue extravasation was calculated with the following formula: Evans blue (%) = $\text{brain Evans blue content } (\mu\text{g/g}) \times 100 / \text{serum Evans blue content } (\mu\text{g/mL})$. Results are expressed as means $\pm$ S.E.M. of six mice. ** $p < 0.01$ vs. Sham-operated group by one-way ANOVA followed by Tukey's test.

Fig. 5. Attenuation of BBB Disruption and Brain Edema by VEGF Inhibition

Mouse VEGF neutralizing antibody (VEGF Ab; 1 $\mu\text{g/d}$) or control IgG (cont Ab) was administered into the lateral ventricle. (A) The effects of VEGF inhibition on Evans blue extravasation. The FPI-induced Evans blue extravasation was attenuated by VEGF Ab. Results are expressed as means $\pm$ S.E.M. of six mice. ** $p < 0.01$ vs. Sham-operated group; ## $p < 0.01$ vs. vehicle administration (one-way ANOVA followed by Tukey's test). (B) The effects of VEGF inhibition on brain water content. The FPI-induced increase in brain water content was attenuated by VEGF Ab. Results are expressed as means $\pm$ S.E.M. of six mice. ** $p < 0.01$ vs. Sham-operated group; ## $p < 0.01$ vs. vehicle administration (one-way ANOVA followed by Tukey's test).

Fig. 4. Immunohistochemistry for Astrocytes and VEGF-A

Frozen brain slices containing the core site of injury were reacted with antibodies against glial fibrillary acidic protein (GFAP), a maker of reactive astrocytes, and VEGF-A. The red and green stainings show GFAP and VEGF-A, respectively. Arrowheads show VEGF-A-positive cells. Scale bar = 50 μm .

る.^{14,15)}したがって、 ET_B 受容体遮断薬による抗脳浮腫作用と VEGF-A の関連を検討した。FPI 後の VEGF-A の発現変化を確認したところ、FPI を与えたマウスの脳組織では VEGF-A の発現量が増加しており、この発現増加はアストロサイトで多く確認された (Fig. 4)。この VEGF-A の発現増加に対する ET_B 受容体遮断薬の効果を確認したところ、BQ788 を投与したマウスの脳組織では FPI 後の VEGF-A の発現増加が抑制されており、VEGF-A 産生アストロサイトの数も減少していた (Fig. 4)。さらに、VEGF-A が FPI による BBB の破綻及び脳浮腫に係わっているかを確認するため、VEGF-A

の作用を阻害する VEGF 中和抗体をマウスの側脳室内へ投与したところ、FPI による BBB の破綻及び脳浮腫が抑制されていた [Figs. 5(A) and (B)]. これらの結果より、VEGF-A は頭部外傷による BBB の破綻及び脳浮腫の一因であり、ET_B 受容体遮断薬の抗脳浮腫作用には VEGF-A の産生抑制が関与していることが示唆された。

BBB はアストロサイト、ペリサイト、血管内皮細胞など様々な脳細胞によって構造的及び機能的に形成されている.^{8,9)} 特に血管内皮細胞は、細胞同士が密着結合 (Tight junction) を形成することで、脳実質内への血管内容物の漏出や異物の侵入を防ぐバリアとして機能しており、BBB を構成する上で重要な役割を担っている.¹⁶⁾ Tight junction は血管内皮細胞の細胞膜に発現している tight junction protein によって構成されており、この tight junction protein が減少した場合、BBB の機能が破綻してしまう。これまでの研究報告により、VEGF-A が tight junction protein の一種である claudin-5 (CLN-5) の発現を抑制することが知られており、このことが VEGF-A による BBB 破綻の一因であることが考えられている。¹⁷⁾ FPI を与えたマウスの脳組織における CLN-5 の発現を確認したところ、FPI 後のマウスの脳組織では CLN-5 のタンパク質発現が減少していた (Fig. 6)。この CLN-5 の発現減少は、VEGF 中和抗体の側脳室投与により抑制されていた (Fig. 6)。これらの結果より、ET_B 受容体遮断薬の抗脳浮腫作用には VEGF-A の発現抑制による CLN-5 の保護作用が関与していることが考えられる。

6. おわりに

本稿では、エンドセリン ET_B 受容体遮断薬の頭部外傷後の脳浮腫に対する抑制効果及びその機序について述べた。中枢神経系において、ET_B 受容体はアストロサイトに多く分布しているため、ET_B 受容体遮断薬のメインターゲットはアストロサイトであると考えられる。本稿での見解をまとめると、ET_B 受容体遮断薬は脳傷害後の活性型アストロサイトにおける VEGF-A の産生を抑制することで、CLN-5 の減少による BBB の破綻を抑制し、その結果、脳浮腫に対する抑制効果を示すという抗脳浮腫機序が考えられる (Fig. 7)。本稿では BBB の破綻が原因となる病態として脳浮腫に注目したが、

Fig. 6. Protection against Claudin-5 Reduction by VEGF Inhibition

The levels of claudin-5 protein were evaluated by western blot analysis. Claudin-5 levels were normalized to those of actin. Results are expressed as means $\pm$ S.E.M. of four mice. ** $p < 0.01$ vs. Sham-operated group; ## $p < 0.01$ vs. vehicle administration (one-way ANOVA followed by Tukey's test).

Fig. 7. Schematic Showing the Anti-edema Effects of the ET_B Receptor Antagonist

Blockade of the ET_B receptor decreases astrocytic VEGF-A production, inhibiting the reduction in claudin-5 after brain damage, thereby protecting against BBB disruption and brain edema.

BBB の破綻は脳浮腫以外にも、血管内からの好中球の浸潤による炎症反応などにも係わっており、過剰な炎症反応は脳傷害による 2 次傷害を引き起こすことが知られている。¹⁸⁾ したがって、ET_B 受容体遮断薬は脳傷害後に引き起こされる炎症性傷害なども抑制できることが期待され、今後、これらについては検討していく必要がある。

現在、脳浮腫を根本的に治療するための薬物治療法は確立されていないが、ET_B 受容体遮断薬のよ

うなアストロサイトの活性化及び BBB の破綻を抑制できる薬が新たな脳浮腫治療薬となり得ることが期待される。

謝辞 本研究は大阪大谷大学薬理学講座の小山豊教授（現神戸薬科大学薬理学研究室）にご指導頂き、遂行したものであり、小山 豊先生に厚く御礼申し上げます。また、ともに研究を遂行してくれた大阪大谷大学薬学部薬理学講座の学生諸氏に心より御礼申し上げます。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Unterberg A. W., Stover J., Kress B., Kiening K. L., *Neuroscience*, **129**, 1019–1027 (2004).
- 2) Nag S., Manias J. L., Stewart D. J., *Acta Neuropathol.*, **118**, 197–217 (2009).
- 3) Rabinstein A. A., *Neurologist*, **12**, 59–73 (2006).
- 4) Raslan A., Bhardwaj A., *Neurosurg. Focus*, **22**, E12 (2007).
- 5) Walcott B. P., Kahle K. T., Simard J. M., *Neurotherapeutics*, **9**, 65–72 (2012).
- 6) Stokum J. A., Gerzanich V., Simard J. M., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **36**, 513–538 (2016).
- 7) Michinaga S., Koyama Y., *Int. J. Mol. Sci.*, **16**, 9949–9975 (2015).
- 8) Abbott N. J., Rönnbäck L., Hansson E., *Nat. Rev. Neurosci.*, **7**, 41–53 (2006).
- 9) Wolburg H., Noell S., Mack A., Wolburg-Buchholz K., Fallier-Becker P., *Cell Tissue Res.*, **335**, 75–96 (2009).
- 10) Michinaga S., Nagase M., Matsuyama E., Yamanaka D., Seno N., Fuka M., Yamamoto Y., Koyama Y., *PLoS ONE*, **9**, e102009 (2014).
- 11) Michinaga S., Koyama Y., *Bio Protoc.*, **5**, e1469 (2015).
- 12) Michinaga S., Seno N., Fuka M., Yamamoto Y., Minami S., Kimura A., Hatanaka S., Nagase M., Matsuyama E., Yamanaka D., Koyama Y., *Eur. J. Neurosci.*, **42**, 2356–2370 (2015).
- 13) Argaw A. T., Asp L., Zhang J., Navrazhina K., Pham T., Mariani J. N., Mahase S., Dutta D. J., Seto J., Kramer E. G., Ferrara N., Sofroniew M. V., John G. R., *J. Clin. Invest.*, **122**, 2454–2468 (2012).
- 14) Koyama Y., Nagae R., Tokuyama S., Tanaka K., *Neuroscience*, **192**, 689–698 (2011).
- 15) Koyama Y., Maebara Y., Hayashi M., Nagae R., Tokuyama S., Michinaga S., *Glia*, **60**, 1954–1963 (2012).
- 16) Stamatovic S. M., Keep R. F., Andjelkovic A. V., *Curr. Neuropharmacol.*, **6**, 179–192 (2008).
- 17) Argaw A. T., Gurfein B. T., Zhang Y., Zameer A., John G. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 1977–1982 (2009).
- 18) Lopes Pinheiro M. A., Kooij G., Mizze M. R., Kamermans A., Enzmann G., Lyck R., Schwaninger M., Engelhardt B., de Vries H. E., *Biochim. Biophys. Acta*, **1862**, 461–471 (2016).