ロイコトリエン B₄ 及びその受容体を標的とした脳内出血治療薬の創薬研究

肱岡雅宣

**A Research on Drug Discovery for Intracerebral Hemorrhage
Focusing on Leukotriene B₄ and Its Receptor**

Masanori Hijioka

*Laboratory of Pharmacology and Neurobiology, College of Pharmaceutical Sciences,
Ritsumeikan University; 1-1-1 Noji-Higashi, Kusatsu, Shiga 525-8577, Japan.*

(Received June 10, 2020)

Intracerebral hemorrhage (ICH) results from blood vessels rupture in the brain, forming a blood clot in the brain parenchyma. Leakage of blood constituents causes detrimental tissue damages, ensuing long-lasting neurological deficits; however, effective therapeutic approaches are not yet developed to date. In this study, leukotriene B₄ (LTB₄) and its receptor leukotriene B₄ receptor 1 (BLT1) are proposed as novel therapeutic targets for ICH therapy. After the onset of ICH, the LTB₄ content in the brain transiently elevated. Microglia are considered as the source of LTB₄ production. Thrombin, a blood constituent, activated the BV-2 microglia and increased the LTB₄ secretion from the BV-2 cells. Microglia-released LTB₄ promoted its own microglial activation and neutrophil-like differentiated HL-60 cell migration activity. LTB₄ receptors comprised of two types: BLT1 and BLT2, with BLT1 known to be a high-affinity receptor associated with chemotaxis. BLT1 knockout mice showed decreased neutrophil invasion, attenuating sensorimotor dysfunction after ICH. Furthermore, therapeutic administration of ONO-4057, an orally active LTB₄ receptor antagonist, attenuated neutrophil invasion, microglial activation, axonal fragmentation, and sensorimotor deficits induced by ICH. These results suggest that LTB₄ and its receptor BLT1 can be potential promising therapeutic targets that prevent tissue damages following ICH.

Key words—intracerebral hemorrhage; leukotriene B₄; microglia; neutrophil

1. はじめに

脳内出血 (intracerebral hemorrhage; ICH) は脳血管が破れることで血液が漏出し、脳実質内に血腫を形成する疾患である。高血圧を原因とする高血圧性脳内出血のほか、脳動静脈の奇形を原因として出血が起こるとされているが、大部分は高血圧性脳内出血である。近年の血圧管理の充実により脳内出血患者数は漸減しているものの、ひとたび発症すると著しく重篤な症状を呈すため、予後を改善させる薬物の開発が望まれる。^{1,2)} 現行の脳内出血治療においては血腫の除去手術のほか、血圧の低減を目的としたカルシウム拮抗薬の使用や頭蓋内圧の低減を目的とした高浸透圧薬の投与が推奨されている。³⁻⁵⁾ しか

しながら、これらは血腫の除去及び拡大抑制を目的としたものであり、血液成分の漏出に伴う脳組織傷害を軽減させるものではない。本稿では、脳内出血モデルマウスを用いて脳組織傷害を引き起こすメカニズムについて調べ、新規治療標的となり得る分子を見い出した成果について紹介する。

2. 脳内出血と神経軸索傷害

脳内出血の基礎研究においては2種のモデルマウスが用いられている。1つは尾静脈から採取した自家血を脳内に注入するモデルで、もう1つは血管基底膜を溶解させる酵素であるコラゲナーゼを注入するモデルである。⁶⁾ 筆者は血管の破裂に起因する血腫の拡大を模倣できるという観点からコラゲナーゼの注入による脳内出血モデルマウスを用いてきた。^{7,8)} しかしながら、コラゲナーゼの投与によって形成される血腫は大きさや位置にばらつきが生じ、個体毎に病態重篤度が異なるため、病態形成機構の解明や薬物の治療効果の評価が難しいという欠点がある。

立命館大学薬学部薬効解析科学研究室 (〒525-8577 滋賀県草津市野路東 1-1-1)

e-mail: m-hiji@fc.ritsumei.ac.jp

本総説は、2019年度日本薬学会関西支部奨励賞 (生物系薬学) の受賞を記念して記述したものである。

Fig. 1. BLT1-KO Mice Showed Decreased Neutrophil Invasion, Attenuating Sensorimotor Dysfunction after Intracerebral Hemorrhage (ICH)

(A) Representative images of myeloperoxidase (MPO)-positive cells in the central region of the hematoma at 72 h after ICH. Scale bars, 100 μ m. (B) The number of MPO-positive cells ($n = 7-9$). *** $p < 0.001$ compared with WT by the Mann-Whitney U -test. (C) Motor functions were evaluated using a modified limb-placing test at indicated times after ICH ($n = 7-9$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with ICH-induced WT mice, according to the two-way analysis of variance (ANOVA) with repeated measures followed by post hoc comparisons with the Bonferroni method. This figure was modified from Hijioka *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **360**(3), 399-408 (2017).

あった。そこで筆者らは magnetic resonance imaging (MRI) を用いて血腫の位置及び大きさと病態重篤度の相関について調べた結果、内包と呼ばれる白質領域に血腫が形成されることで、脳内出血モデルマウスの個体致死率及び運動機能障害の重篤度が著しく悪化することが判明した。⁹⁾ このとき、内包領域に形成された血腫内の軸索の形態を観察すると軸索の断片化が誘導されており、内包における軸索の損傷を抑えることが脳内出血の予後不良を改善させる方策となることが示唆された。¹⁰⁾ 脳内出血時に軸索の損傷を誘導する要因としては好中球の浸潤が報告されている。¹¹⁾ そのため、好中球の浸潤を制御することが脳内出血治療において有用だと考えた。

3. 脳内出血病態形成に対する LTB_4 の関与

好中球の浸潤に関与する因子としてロイコトリエン B_4 (leukotriene B_4 ; LTB_4) に注目した。 LTB_4 は好中球の浸潤を誘導する強力な走化性因子であり、5-リポキシゲナーゼ (5-lipoxygenase; 5-LOX) によってアラキドン酸が代謝されることで生合成される脂質代謝物である。大変興味深いことに、脳内出血患者の血腫組織を用いて行われた DNA マイクロアレイの結果、5-LOX をコードする遺伝子の発現量が増加していることが見い出されており、脳内出血時には LTB_4 が増加することが予想された。¹²⁾ 上記の背景より、 LTB_4 が脳内出血病態に与える影響を調べ、治療標的として有用であるかを調べた。脳内出血惹起後の脳を摘出し、LC-MS/MS により脂質の定量解析を行った結果、脳内出血惹起 6 時間後という早期においてシクロオキシゲナーゼによって

生合成される脂質代謝物の減少がみられた。一方で、5-LOX によって生合成される LTB_4 は出血惹起 12 時間をピークとして顕著な増加を示した。マウスミクログリア細胞株 BV-2 細胞に対して出血性刺激として血液成分の一種であるトロンビン (30 U/mL) を処置したところ、iNOS mRNA の著明な発現量増加を示した。このとき、培養上清中の LTB_4 量を ELISA によって測定したところ、有意な増加が観察されたことから、脳内出血時にはトロンビン刺激によって活性化したミクログリアから LTB_4 が放出されることが示唆された。ミクログリアから放出された LTB_4 がミクログリア自身の活性化に影響するか調べるために LTB_4 受容体の遮断薬を用いた。 LTB_4 には BLT1 と BLT2 の 2 種の受容体があり、なかでも高親和性の受容体である BLT1 は好中球の細胞膜上に発現し、細胞遊走に関与することが明らかになっている。¹³⁾ また、BLT1 はミクログリア細胞膜上にも発現することが報告されていることから、BV-2 ミクログリアに対し BLT1 遮断薬である U-75302 の存在下でトロンビンを処置したところ、U-75302 (100 nM) により iNOS や IL-1 β , IL-6 の mRNA 発現量の増加が有意に抑制された。さらに、好中球様に分化させたヒト前骨髄性白血病細胞 (differentiated HL-60 細胞; dHL-60 細胞) を用いて、BV-2 ミクログリアの培養上清に対する遊走能を調べた。その結果、トロンビンを処置した BV-2 ミクログリアの培養上清は dHL-60 細胞の遊走を有意に亢進し、それは BLT1 遮断薬である U-75302 (0.1 or 1 μ M) の共処置によって抑制された。上記

Fig. 2. Blockade of LTB_4 Receptor Attenuated ICH-induced Neutrophil Invasion and Sensorimotor Deficits

(A) Representative images of MPO-positive cells in the central region of the hematoma at 72 h after ICH. Mice were orally administered with vehicle or ONO-4057 at 3, 27, and 51 h after ICH induction. Scale bars, 100 μ m. (B) The number of MPO-positive cells ($n = 5-7$). $*p < 0.05$ compared with the vehicle-treated ICH group according to the one-way ANOVA, followed by Tukey's multiple comparison test. (C) Motor functions were evaluated using a modified limb-placing test at indicated times after an ICH induction ($n = 6-8$). $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ compared with the vehicle-treated ICH group according to the two-way ANOVA with repeated measures, followed by post hoc comparisons using the Bonferroni method. This figure was modified from Hijioka *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **360**(3), 399-408 (2017).

Fig. 3. Hypothesis of Pathomechanisms Which Induce Microglial Activation and Neutrophil Recruitment to the Hematoma Following ICH

Blood vessel rupture causes leakage of blood contents, such as thrombin, into the brain parenchyma. The thrombin stimulates microglia/macrophages in the hematoma and promotes LTB_4 release. Microglia/macrophage-released LTB_4 induces further microglial activation and neutrophil migration. Activated microglia and migrated neutrophils contribute to axonal injury, ensuing motor dysfunctions.

の結果から、脳内出血時には血液中のトロンビンによって活性化したミクログリアから LTB_4 が放出されることや、放出された LTB_4 がミクログリア自身の活性化を増強し、好中球の浸潤を誘導することが示唆された。¹⁴⁾ 脳内出血モデルマウスにおいて LTB_4 が脳内出血病態の形成に寄与するか調べるために、5-LOX 阻害薬である zileuton を脳内出血惹起 15 分後に尾静脈投与した。その結果、出血により誘導される LTB_4 の増加は抑制された。血腫内に

浸潤するミエロペルオキシダーゼ (myeloperoxidase; MPO) 陽性の好中球数を定量したところ、zileuton (3, 10 mg/kg) により細胞数の減少がみられた。また、zileuton を出血惹起 15 分後、24 時間後、48 時間後と連日投与することにより、出血に伴う運動機能障害の程度が改善された。続いて、 LTB_4 受容体である BLT1 ノックアウトマウスを用いて脳内出血病態の解析を行った。BLT1 ノックアウトマウスでは野生型と比較して、血腫内の MPO

陽性好中球の数が著明に減少し、出血惹起後の運動機能障害も有意に軽減された。よって、脳内出血時には LTB_4 の産生が亢進し、 BLT1 を作用点として脳内出血病態を増悪させることが判明した (Fig. 1).¹⁵⁾

4. LTB_4 受容体遮断薬の治療効果

BLT1 の治療標的としての有用性を検証するために、 LTB_4 受容体遮断薬である ONO-4057 を用いて薬効解析を行った。¹⁶⁾ ONO-4057 を脳内出血惹起 3, 27, 51 時間後に経口投与した結果、出血惹起 72 時間後の血腫内において ONO-4057 (100 mg/kg) は MPO 陽性好中球の数を有意に減少させた、また、出血惹起 72 時間後には Iba-1 陽性ミクログリアの肥大化が抑制されることや、内包領域における軸索の断片化が抑制されることが分かった。さらに、 ONO-4057 (30, 100 mg/kg) は出血惹起後の運動機能障害も有意に改善した (Fig. 2).¹⁵⁾ このことから、 LTB_4 受容体を遮断することにより、脳内出血発症後の組織傷害が軽減され、病態重篤度を軽減させることが分かった。

5. おわりに

本研究では、脳内出血発症後の組織傷害を誘導する因子として LTB_4 を見出し、病態形成時に好中球の浸潤やミクログリアの活性化を促進することを明らかにした (Fig. 3)。加えて、 LTB_4 受容体が脳内出血治療の標的として有用であることを示した。しかしながら、その治療効果は完全ではなく、更なる改善が求められる。脳内出血時には LTB_4 以外にも各種サイトカイン、ケモカイン類の産生亢進が起こるため、これらの作用を包括的に制御することが重要である。¹⁷⁾ 今後は、 LTB_4 と協調して脳内出血病態を重篤化させる因子に注目して、更なる治療効果を示すような治療法策を探索していきたい。

謝辞 本研究を遂行するに際し、多大なお力添えを頂きました立命館大学薬学部薬効解析科学研究室 北村佳久教授、熊本大学大学院生命科学研究部 (薬学系) 薬物活性学分野 香月博志教授、順天堂大学大学院医学研究科生化学第一講座 横溝岳彦教授、秋田大学生体情報研究センター 中西広樹助教に謹んで感謝の意を表します。また研究に携わって頂いた立命館大学薬学部薬効解析科学研究室及び熊本大学薬学部/大学院薬学教育部薬物活性学分野の

諸氏に感謝致します。本研究で用いた LTB_4 受容体遮断薬 ONO-4057 を提供して頂いた小野薬品工業株式会社に感謝致します。

利益相反 共同研究者の香月博志は小野薬品工業株式会社から ONO-4057 の提供を受けた。

REFERENCES

- 1) An S. J., Kim T. J., Yoon B. W., *J. Stroke*, **19**, 3–10 (2017).
- 2) Katsuki H., *J. Pharmacol. Sci.*, **114**, 366–378 (2010).
- 3) Antihypertensive Treatment of Acute Cerebral Hemorrhage (ATACH) investigators, *Crit. Care Med.*, **38**, 637–648 (2010).
- 4) Qureshi A. I., Palesch Y. Y., *Neurocrit. Care*, **15**, 559–576 (2011).
- 5) Koga M., Toyda K., Yamagami H., Okuda S., Okada Y., Kimura K., Shiokawa Y., Nakagawara J., Furui E., Hasegawa Y., Kario K., Osaki M., Miyagi T., Endo K., Nagatsuka K., Minematsu K., *J. Hypertens.*, **30**, 2357–2364 (2012).
- 6) MacLellan C. L., Silasi G., Poon C. C., Edmundson C. L., Buist R., Peeling J., Colbourne F., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **28**, 516–525 (2008).
- 7) Hijioka M., Matsuhita H., Hisatsune A., Isohama Y., Katsuki H., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **338**, 741–749 (2011).
- 8) Hijioka M., Matsuhita H., Ishibashi H., Hisatsune A., Isohama Y., Katsuki H., *Neuroscience*, **222**, 10–19 (2012).
- 9) Matsushita H., Hijioka M., Hisatsune A., Isohama Y., Iwamoto S., Terasawa H., Katsuki H., *PLOS ONE*, **8**, e67691 (2013).
- 10) Hijioka M., Anan J., Matsushita H., Ishibashi H., Kurauchi Y., Hisatsune A., Seki T., Katsuki H., *Neurosci. Res.*, **106**, 38–46 (2016).
- 11) Moxon-Emre I., Schlichter L., *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **70**, 218–235 (2011).
- 12) Carmichael S. T., Vespa P. M., Saver J. L., Coppola G., Geschwind D. H., Starkman S., Miller C. M., Kidwell C. S., Liebeskind D. S., Martin N. A., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **28**, 1860–1875 (2008).

-
- 13) Yokomizo T., *J. Biochem.*, **157**, 65–71 (2015).
- 14) Hijioka M., Futokoro R., Ohto-Nakanishi T., Nakanishi H., Katsuki H., Kitamura Y., *Int. Immunopharmacol.*, **85**, 106678 (2020).
- 15) Hijioka M., Anan J., Ishibashi H., Kurauchi Y., Hisatsune A., Seki T., Koga T., Yokomizo T., Shimizu T., Katsuki H., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **360**, 399–408 (2017).
- 16) Kishikawa K., Tateishi N., Maruyama T., Seo R., Toda M., Miyamoto T., *Prostaglandins*, **44**, 261–275 (1992).
- 17) Katsuki H., Hijioka M., *Biol. Pharm. Bull.*, **40**, 564–568 (2017).