

Na⁺, K⁺-ATPase阻害薬PBI-05204による 脳虚血傷害後の治療効果の検討

井筒美和, 工藤雅哉, 川前金幸

山形大学医学部麻酔科学講座
(平成29年2月14日受理)

抄 録

【背景】 脳虚血障害においてNa⁺, K⁺-ATPase 活性は低下することが知られている。Na⁺/Ca²⁺交換系も障害されるため、細胞内Ca²⁺濃度の上昇から神経細胞死が誘発されると考えられている。一方で、Na⁺, K⁺-ATPase 阻害薬であるPBI-05204 (PBI) やその主要成分が高い脳血管閉門通過性をもち、脳由来神経栄養因子(BDNF)を上昇させ、脳神経細胞保護効果を示すことが報告された。PBIは抗腫瘍薬として既に臨床応用の可能性が示唆されている薬物である。今回、我々はPBIによる脳虚血障害後の神経保護作用を成熟ラット中大脳動脈虚血再還流(MCAO)モデルを用いて詳細に検討した。

【方法】 MCAOモデルは雄性成熟Wisterラットを用いて、右外頸動脈よりフィラメントを挿入し、右中大脳動脈を閉塞させることにより作成した。フィラメントは70分留置した後に抜去し、血流を再開させた。PBIは腹腔内投与にて治療効果の検討を開始したが、連続投与で腹腔内癒着が認められたため、経口投与に変更して実験を行った。PBI (0, 40, 100, 200 mg/kg/day) は再灌流90分後に初回の投与を行い、その後6日間連続投与した。虚血7日後に神経学的、組織学的評価を行った。また正常ラットにおけるPBI投与後の非観血的動脈圧測定と、脳中BDNFの測定を行った。

【結果】 100 および200 mg/kg/day 群において、対照群と比較して24時間後に神経学的所見の改善を認めた(P = 0.0005, 0.004)が、7日後では神経学的、組織学的所見の改善に有意差はなかった。正常ラットにおいて、高用量PBI群でコントロール群、低用量群と比較して血圧低下を認めたが、血圧は正常域であった。また有意ではないが、PBIの用量依存性に脳中BDNFの上昇を認めた。

【結論】 本研究においてPBIの経口投与では脳虚血障害に対して長期的な神経保護作用を得るのが困難であることを明らかにした。その原因としてPBIの含有成分が投与経路や吸収を制限していることが考えられる。しかし、PBIの主要成分を用いて投与時期/経路を検討することにより効果が得られる可能性は高いと考えられ、本研究によって今後検討すべき方向を示すことができた。

キーワード : Na⁺, K⁺-ATPase inhibitor, middle cerebral artery occlusion, BDNF, rat

【緒言】

Na⁺, K⁺-ATPaseは、中枢神経系においてイオン勾配を維持する重要な役割を果たしているが¹⁾、脳虚血によりエネルギー代謝とATP産生が中断されることにより、ATPを必要とする酵素機能が傷害されることがある。Na⁺, K⁺-ATPase活性は、中大脳動脈閉塞(MCAO)において低下し^{2), 3)}、再灌流24時間後に活性は80%であったとの報告がある。Na⁺, K⁺-ATPase活性は、生理学的レベルでの遊離細胞内Ca²⁺とNa⁺濃度

を維持するNa⁺/Ca²⁺交換体⁴⁾ および虚血再灌流後の生理的Ca²⁺の回復⁵⁾に関連しており、強心配糖体のひとつであるOuabainが誘導するNa⁺, K⁺-ATPase阻害は、細胞内Ca²⁺の増加と培養皮質ニューロン内のアポトーシスを引き起こし⁶⁾、虚血後のNa⁺, K⁺-ATPase活性の薬理的回復は、神経保護的であると報告されている⁷⁾。したがって、傷害された脳においてNa⁺, K⁺-ATPaseレベルを一定に保つことは、組織生存に重要であるとされている⁸⁾。

一方で、Na⁺, K⁺-ATPase阻害薬の脳保護作用を示唆した報告がある。Wangら⁹⁾は、High through put

screening platformを用いて、脱酸素・脱グルコース (OGD) にさらされた新生児ラット大脳皮質スライスでニューロン生存能力を保存することのできる薬理学的物質を特定し、その中で特にNeriifolinが非常に有効であると報告した。Neriifolinは、 Na^+ , K^+ -ATPase阻害薬として働くことによって、うっ血性心不全や不整脈に用いられる強心配糖体と構造的類似性を持つ、キバナキョウチクトウ (*Thevetia peruviana*, *Thevetia neriifolia*としても知られている) に由来する植物二次代謝産物である^{10), 11)}。Neriifolinの有効性は、新生児ラット低酸素虚血モデルと成熟ラットMCAOの急性転帰モデルでさらに調査され、両ケースで病変量が減少した。以前にOuabainで報告されているように、虚血回復中のある程度の Na^+ , K^+ -ATPase阻害は、潜在的に $\alpha 2$ および $\alpha 3$ Na^+ , K^+ -ATPaseアイソフォームとの相互作用を介して、ATPの需要を減少させることにより治療効果を持つ可能性がある¹⁾と仮定されている¹⁾。さらに、虚血中の細胞内への Ca^{2+} 流入は、虚血の有害反応と広範囲に関連しているが、虚血細胞の回復に少なくともある程度は、 Ca^{2+} のレギュレーションが依存している^{12), 13)}。

Neriifolinは、血液脳関門 (BBB) を通過しにくいいため、臨床開発は難しいと考えられている¹⁴⁾。しかし脳虚血傷害の治療薬としての強心配糖体の研究への論理的根拠を提供したといえる。予備実験において我々は最初に、臨床使用経験が豊富な Na^+ , K^+ -ATPase阻害薬であるジゴキシンの神経保護作用を検討した。低用量のOuabainとジゴキシンは、OGDにさらされたラット培養海馬スライスにおいて Na^+ , K^+ -ATPase活性を増加させ¹⁵⁾、*in vivo*での神経学的転帰を改善したと報告がある¹⁶⁾。我々は、ラットの周産期低酸素虚血転帰モデルにおいて、さまざまな低毒性用量のジゴキシンの実験を行った。しかしジゴキシンの低いBBB透過性のため、脳梗塞巣を減少させる効果は見られなかった (未発表データ)。

我々はその研究結果を受けて、同じくキョウチクトウの強心配糖体である Na^+ , K^+ -ATPase阻害薬、PBI-05204について調査した。PBI-05204は高いBBB透過性を有し、新生児ラットの大脳皮質スライスOGDアッセイへの投与と、新生児ラットへ虚血前全身投与の両方で有効性が証明されている¹⁷⁾。また抗がん剤として臨床開発中である¹⁸⁾。さらに、PBI-05204は、OGDによって損傷を受けたラットの脳スライスにおいて、標準的な神経成長因子と関連している脳由来神経栄養因子 (BDNF) を増加させた¹⁹⁾。

本試験は限局性虚血性脳卒中に対するPBI-05204の

脳神経保護効果を7日間にわたり検討した初めての研究である。本研究で提示された段階的なスタディーデザインは、PBI-05204の治療効果の可能性を追求するため、さらなる包括的な前臨床試験が必要かどうかという基準で設定された。我々はまた、PBI-05204による心血管系への影響が脳虚血の悪化に寄与する可能性を調査するため正常ラットにおけるPBI-05204投与後の平均動脈圧 (MAP) の測定を行い、*in vivo*におけるBDNFへの効果についても検討したので報告する。

【対象と方法】

これらの試験はデューク大学のAnimal Care and Use Committeeによって承認された。中大脳動脈閉塞 (MCAO) 試験で使用する成熟オスウィスターラット (250~300 g) をHarlan Sprague Dawley, Inc.社 (インディアナポリス) から購入した。

中大脳動脈閉塞 (MCAO)

我々は実証されたラット一過性MCAOモデルを利用した^{20), 21)}。ラットは手術前夜に絶食とした。5%イソフルランで麻酔を導入し、気管挿管した。1.3~2%のイソフルランで麻酔を維持し、手術中は30% O_2 で機械換気とし、尾動脈カテーテルと頭蓋骨膜温度サーミスタを留置した。凝血を防止するために50 IUのヘパリンを尾動脈より投与した。平均動脈圧 (MAP) を継続的にモニターして、血液ガス (pH, PaO_2 , PaCO_2) とグルコースを測定するために、動脈血を採取した。体表面の加温と冷却によって頭蓋骨膜温度を $37.5^\circ\text{C} \pm 0.2^\circ\text{C}$ に調整した。

過去に提唱されている修正型MCAOを用いて^{20), 22)}、ラットにMCAOの準備をした。頸部腹側正中切開を行い、右総頸動脈を同定した。外頸動脈 (ECA) を露出し、結紮、分離した。内頸動脈 (ICA) を、翼突口蓋動脈起始部が見えるようになるまで遠位で切断し、総頸動脈を一時的に閉塞した。ナイロンモノフィラメント (直径0.25 mm) の遠位0.5 cmをシリコンで被覆したもの (直径0.38 mm) をECA断端に挿入し、わずかな抵抗が感じられるまで挿入して、70分間ICAに留置した (頸動脈分岐部から約19~20 mm)。70分のMCAOの後で、灌流を回復させるためにフィラメントを引き抜いて、創傷を縫合糸で閉鎖して、0.1 mlの0.25%ブピバカインを創部に染み込ませた。閉創後、尾動脈カテーテルを取り外した。イソフルランを中止して、頭蓋骨膜サーミスタを取り外した。麻酔から回復した後に、抜管した。その後ラットは30% O_2 の

2Lのアクリルボックスに85分間留置したのちに、ホームケージに戻してエサと水に自由にアクセスできるようにした。

神経機能の測定

MCAOラットに対し、過去に報告されている標準神経学的評価を行った^{20), 21), 23)}。この評価システムでは4つの異なる機能（全身状態、単純運動障害、複雑運動障害、感覚障害）を評価した。各ラットに与えられたスコアは、4つすべての個々のスコアの合計で、0が最小（最良）スコアで48が最大（最悪）スコアであった。この評価システムは、脳梗塞サイズとよく相関していることが示されている²³⁾。神経機能の評価は群の割り付けに盲検化された観察者がおこなった。

ロータロッド

実験3と4において、MCAOの1日前と7日後にロータロッドの測定をおこなった。回転速度が5分間かけて4から40 rpmに加速するロータロッド試験機器（ENV-577, Med Associates Inc.社、バーモント州ジョージア）をもちいて、ラットが加速するロータロッドに留まり続けることができる時間（秒で測定）を過去の報告のように記録した^{24), 25)}。各試験日に、15分の試験間隔で、3試験を行った。各日の最良成績を記録した。

脳梗塞量の測定

脳梗塞は過去に報告されている方法を用いて測定を行った^{20), 21)}。神経学的評価後に、ラットの体重を測定し、イソフルランで麻酔して、脳組織の摘出を行った。実験1、3、4では脳組織を-20℃の2-メチルブタンの中で急速凍結し、Swansonらの方法を用いて脳梗塞量を測定した²⁶⁾。梗塞の吻側-尾側範囲にわたって720 μmの間隔で、クリオトームを用いて、連続した4つ一組の20 μm厚の冠状切片を採取した。切片を乾燥させて、HE染色をほどこした。各720-μm間隔からの代表的な切片を、画像分析器（MCID Elite™, Interfocus Imaging社, 英国リントン）で制御されたビデオカメラでデジタル化した。各切片の画像を1280 X 960-ピクセルマトリックスとして保存して、ビデオモニター上に表示した。実験条件に盲検化された観察者が以下の領域の測定を行った：非梗塞部同側大脳皮質、非梗塞部同側皮質下部、対側大脳皮質および対側皮質下部。各領域の面積（mm²）を領域内に含まれる校正ピクセルの自動計測によって決定した。非梗塞部同側大脳皮質および皮質下部面積を、対応する対側領

域値から差し引いて、梗塞量（mm³）を、差し引かれた梗塞領域に正射形として計算された梗塞の吻側-尾側範囲にわたる切片間の既知の間隔（例えば720 μm）を乗じた累積和として計算した²⁵⁾。

実験5と6では2,3,5-塩化トリフェニルテトラゾリウム（TTC）を用いて、脳梗塞量を評価した。MCAOからの再灌流の30時間後に、新鮮脳を2 mm厚の冠状連続切片に切り分けて、色の変化が安定するまで（<30分）、37.5℃で2%のTTCで染色した。その後、脳スライスを10%のホルマリンで保存した。上述のように、脳梗塞量を平面画像化と減法分析を用いて測定した。

実験1：ラットMCAOにおけるPBI-05204腹腔内投与の効果

ラットに70分間のMCAOを行った。再灌流開始の85分後に旋回行動を示さなかったラットは、さらなる試験から除外した。その後、ジメチルスルホキシド/ポリエチレングリコール、50:50 v/vに溶かしたPBI-05204の各容量群（0, 5, 10または20 mg/kg/日）にラットを無作為に割り付けた¹⁷⁾。Vehicle群の総注入量はすべての実験で0.3 ml（約0.5 mg/kgジメチルスルホキシド）であった。各投与量は、以前の報告で新生児ラットに投与された量を参考に規定した¹⁷⁾。再灌流開始の90分後に投与を開始し、その後さらに6日間、同一用量で毎日腹腔内投与を行った（1群につきn = 18）。体重を終日測定した。MCAOの24時間後と7日後に、群の割り付けに盲検化された観察者が神経学的スコアを測定した。

実験2：PBI-05204腹腔内投与によって誘発された腹部炎症

実験1においてPBI-05204を腹腔内投与されたラットで体重減少を観察したため、我々は、これがPBI-05204の腹腔内投与によって引き起こされたか調査した。正常ラットを、7日間、1日1回20 mg/kgのPBI-05204腹腔内投与群、またはVehicle腹腔内投与群に無作為に割り付けた（1群につきn = 4）。体重を終日測定した。8日目に開腹し腹腔内を調査して、標準評価システムを用いて癒着を測定した²⁷⁾。腹部を4つの領域：肝臓と大綱、大綱と腸壁、腸と腹壁および腸と胃の間に分けた。スコア0 = 癒着なし、1 = 1 ~ 3個の分離した癒着、2 = 3個以上の明瞭な分離した癒着、3 = 広範なシート状の癒着で総計最大12のスコア化を行った。

実験3：ラットMCAOにおけるPBI-05204経口投与の用量依存効果

実験2の結果をふまえて、我々はPBI-05204の投与経路を腹腔内投与から経口投与に変更して試験を行った。PBI-05204の相対的経口バイオアベイラビリティは約30%と計算されていた²⁸⁾。既知のバイオアベイラビリティを補うために、この実験ではPBI-05204の経口投与用量を増量した。上述のように、ラットに70分間のMCAOを行った。巡回行動確認後、MCAO90分後にPBI-05204 (40, 100 mg/kg/日) またはVehicleの投与を開始し、さらに続けて6日間連続投与した (1群につきn = 20)。MCAOの24時間後と7日後に神経機能を評価した。MCAOの1日前と7日後にロータロッドを行い、MCAOの7日後に、脳梗塞量の測定を行った。MCAOの24時間後の神経学的検査を除いて、実験条件に盲検化された観察者が、すべての測定を行った。

実験4：ラットMCAOにおける高用量PBI-05204の効果

実験3で100 mg/kg/日のPBI-05204を投与されたラットにおいて、24時間後の神経学的所見に統計的有意な改善効果を観察した。7日目の神経学的スコアにvehicle群との統計的差違はなかったが、PBI-05204 100 mg/kg/日群での改善傾向は明らかに認められた。これは潜在的なPBI-05204の有効性を示唆しており、高用量はより有効である可能性があると考え、我々は、経口投与量を100 mg/kg/日から200 mg/kg/日に増量して、実験3と同様の調査を行った。

実験5：PBI-05204の急性期の効果

この時期に、OGD下脳皮質スライスの介入研究で、短期のPBI-05204治療のみが長期回復パラダイムにおいて有効であることが分かった (Donald Lo, 未発表)。持続的なPBI-05204投与は毒性をもつ可能性があるということも明らかになり、その所見とともに、実験3と4で急性期にのみの非盲検下で神経学的スコアの改善がみられたという結果から、盲検下に24時間後の神経学的スコアと脳梗塞量を評価する実験5を行った。70分のMCAOを施行したのち、その90分後および20時間後に、PBI-05204 (50または100 mg/kg) またはVehicleを経口投与した (1群につきn = 15)。MCAOの26時間後に、盲検化された観察者が標準神経学的検査を行った。その後、上述のように脳梗塞量を測定するために、脳組織を摘出してTTCで染色した。

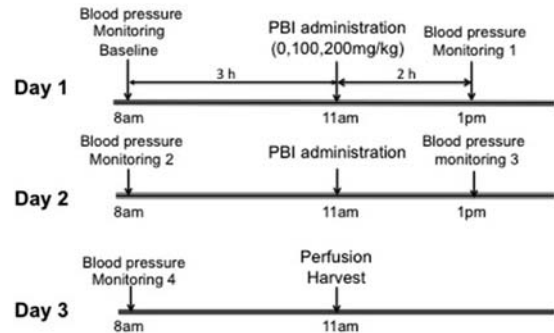


図1. 平均動脈圧 (MAP) 測定のプロトコル。正常ラットを3日間、血圧測定の刺激に慣れさせたのち、2日間PBI-05204 (100または200 mg/kg/日) またはVehicleが経口投与されるように無作為に割り付けた (1群につきn = 4)。各治療日に、治療の3時間前と治療の2時間後にMAPを測定した。最終測定後に、ラットを安楽死させて、BDNF分析のために、脳組織を摘出した。

実験6：PBI-05204前投与の急性期の効果

その後、我々は、虚血前にPBI-05204が投与された場合の急性転帰について評価した。MCAOの24時間前および2時間前に、50または100 mg/kgのPBI-05204、Vehicleまたは0.9%生理食塩水群を無作為に割り付けたラットに経口投与した (1群につきn = 10。0.9%生理食塩水群は、ジメチルスルホキシドの神経保護効果の可能性を検討するために、コントロールとして設けた)。MCAOはこれまでと同様に行い、MCAOの60分後に巡回がない場合は除外した。MCAOの24時間後に、神経機能と脳梗塞量を評価した。

実験7：平均動脈圧 (MAP) と脳由来神経栄養因子 (BDNF) へのPBI-05204の効果

MAPを測定するために、非侵襲的テールカフシステムを使用した (MRBP血圧システム、IITC Life Science社、カリフォルニア州ウッドランドヒルズ)。正常ラットを3日間、血圧測定の刺激に慣れさせてから、PBI-05204 (100または200 mg/kg/日) またはVehicleを2日間経口投与した (1群につきn = 4)。それぞれ投与開始3時間前と投与2時間後にMAPを測定した (図1)。

その後、脳を摘出して、 -80°C で保存した。大脳半球を氷の上で解凍して、Complete Miniプロテアーゼインヒビターカクテル錠 (Roche社、インディアナ州インディアナポリス) と $17\mu\text{g/ml}$ のPMSFが補充された100 mMのトリス/HCl pH 7、2%のBSA、1 MのNaCl、4 mMのEDTA、2%のトリトンX-100および

表 1. 実験 1 からの生理学的データ
(虚血後の腹腔内PBI-05204投与)

	Vehicle	5 mg/kg PBI	10 mg/kg PBI	20 mg/kg PBI
n	17	14	16	15
体重 (g)				
虚血前	273±7	272±7	277±11	278±8
虚血 3 日後	250±22	237±21	244±25	240±26
虚血 7 日後	265±35	248±40	264±29	256±44
MCAO の 10 分前				
MAP (mmHg)	76±13	78±17	79±15	80±20
体温 (°C)	37.4±0.12	37.4±0.11	37.4±0.17	37.4±0.14
pH	7.42±0.02	7.42±0.03	7.42±0.03	7.42±0.02
PaCO ₂ (mmHg)	33±2	33±4	34±2	35±2
PaO ₂ (mmHg)	123±9	121±10	121±12	116±12
グルコース (mg/dL)	128±16	126±12	128±14	136±20
ヘマトクリット (%)	42±3	41±2	42±2	41±3
MCAO 中の 35 分				
MAP (mmHg)	77±14	81±16	81±16	79±12
体温 (°C)	37.5±0.07	37.5±0.8	37.5±0.09	37.5±0.07
pH	7.38±0.04	7.36±0.05	7.37±0.04	7.37±0.04
PaCO ₂ (mmHg)	37±5	39±7	39±5	40±5
PaO ₂ (mmHg)	114±8	114±8	117±12	113±7
ヘマトクリット (%)	42±2	41±3	42±3	42±3
MCAO の 15 分後				
MAP (mmHg)	81±13	73±12	75±14	87±7
体温 (°C)	37.5±0.1	37.5±0	37.5±0.14	37.5±0.06
pH	7.37±0.02	7.38±0.04	7.38±0.03	7.39±0.04
PaCO ₂ (mmHg)	36±3	35±3	36±5	36±4
PaO ₂ (mmHg)	125±6	120±10	122±9	121±7
ヘマトクリット (%)	41±3	40±3	39±2	41±2

MAP = 平均動脈圧; PaCO₂ = 動脈血二酸化炭素分圧; PaO₂ = 動脈血酸素分圧; MCAO = 中大脳動脈閉塞 値 = 平均 ± sd. * = Vehicle に対して P < 0.05.

0.1%のアジ化ナトリウムを含有する冷たい溶解バッファーの中で均質化した。14,000 x gでの30分間の遠心分離後上澄みを採取し、BDNF ELISA (Chemikine BDNF sandwich ELISA kit; EMD Millipore社, マサチューセッツ州ビレリカ) で分析した。Absolutely RNA miniprep kits (Agilent Technologies/Stratagene社, カリフォルニア州ラホヤ) を用いてRNAも採取した。一定分量 (500 ng) のRNAを、オリゴdTプライマーとSuperscript II (Invitrogen社, カリフォルニア州カールスバッド) での逆転写に使用した。得られたcDNA試料を、ViiA 7リアルタイムPCR機器 (Applied Biosystems社) 上でBullseye EvaGreen-low ROX (MidSci社, ミズーリ州セントルイス) とイントロンスパニングBDNFプライマーを用いて、遺伝子転写物の定量PCRに使用した^{29), 30)}。各試料を3回測定しGAPDHを用いてRNA回収とサンプル処理を標準化した。

統計解析

実験群への割り付けはマイクロソフト・エクセルの乱数表を用いて無作為に行った。BDNF発現、生理学的データ、神経学的スコア、ロータロッドおよび脳梗塞巣は、一元配置ANOVAで比較した。有意差が認められた場合や、2つを超える実験条件が使用されたときには、事後解析で群間差に対してBonferroniの多重比較検定を行った。連続体重とMAP値は、反復測定

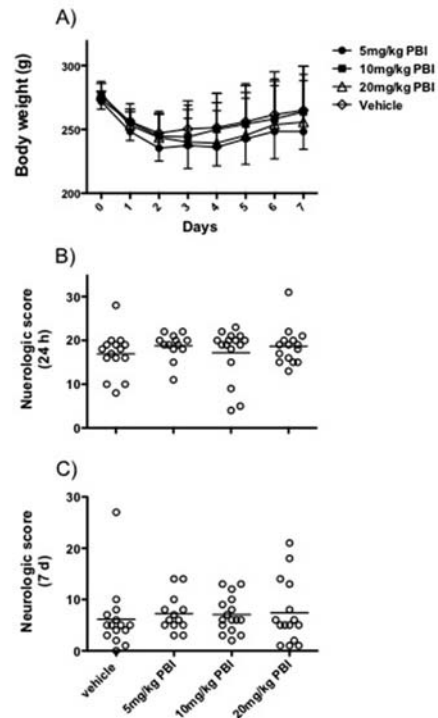


図 2. ラットMCAO後腹腔内にPBI-05204を投与後の神経学的所見 (n = 14-17)。無作為化と治療開始は再灌流90分後であった。(A) 投与後7日間の体重変動。時間 (P < 0.0001) と群 (P < 0.0001) の両方で有意差が認められた。7日目の体重に関して行った事後一元配置ANOVAで、群間差は見られなかった (P = 0.66)。(B) と (C) は、MCAOの24時間後または7日後の神経学的スコアを表している。PBI-05204は、24時間後 (P = 0.40) または7日後 (P = 0.41) の神経学的スコアを変化させなかった。(A) は平均 ± SD、(B) と (C) は、各個体の値と群の平均値を表している。

ANOVAで比較した。P < 0.05を統計的有意と見なした。統計解析はPrism 5.0aソフトウェア (カリフォルニア州ラホヤ) を用いて行った。

【結果】

実験 1 : ラットMCAOにおけるPBI-05204腹腔内投与の効果

虚血前後の体重、MAP、体温、血液ガス分析結果等生理学的検査値に群間差はなかった (表 1、n = 14~17)。Bonferroniの多重比較検定では時間経過と群間の両方で体重が有意に低下していたが (P < 0.0001)、7日目の体重に関して事後一元配置ANOVAを実施したところ、群間差は認めなかった (P = 0.66) (図 2A)。PBI-05204は、24時間 (P = 0.40、図 2B) および7日

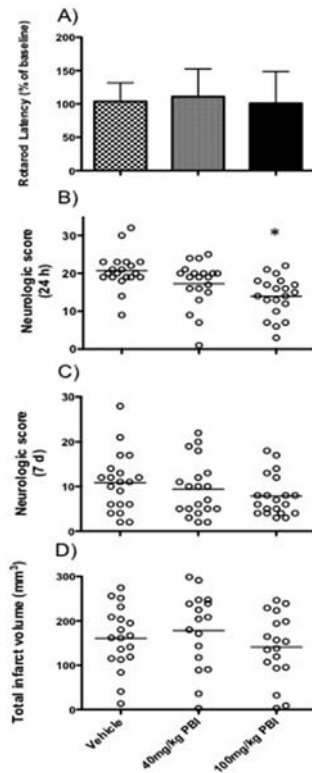


図3. ラットMCAOにおけるPBI-05204経口投与の用量依存効果(1群につきn = 20)。(A)7日目のロータロッドの成績をベースラインからの%変化で示した(P = 0.71, 平均 ± SD)。(B)経口PBI-05204(100 mg/kg/日)は、vehicleと比較して、MCAOの24時間後の神経機能を改善した(P = 0.0005)。(C)MCAO7日後の神経機能に群間差はなかった(P = 0.27)。(D)総脳梗塞量(P = 0.37)。(B)(C)(D)は各個体の値と群の平均値を表している。

目(P = 0.41、図2C)の神経学的スコアを変化させなかった。そのため、脳梗塞量は測定しなかった。

実験2：PBI-05204腹腔内投与によって誘発された腹部炎症

実験1において、反復腹腔内PBI-05204投与と関連してラットの体重が減少したため、我々はこれが注入液への腹腔内反応に起因するかどうかを検討した。正常ラットを用いたこの実験で、7日間の20 mg/kg PBI-05204腹腔内投与は体重に有意な変化を引き起こさなかった(P = 0.61、1群につきn = 4)。しかし、腹部癒着が、PBI-05204で治療された4匹のラットのうち3匹で見られ(平均癒着スコア = 2)、Vehicle投与ラットでは見られなかった。これによって、我々は腹腔内投与を中止し、その後の試験は経口投与で行うことを決定した。

実験3：ラットMCAOにおけるPBI-05204経口投与の

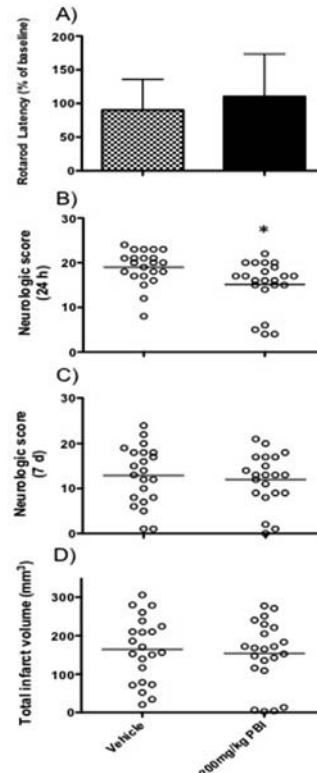


図4. ラットMCAOにおける高用量PBI-05204の効果(1群につきn = 20)。(A)7日目のロータロッドの成績をベースラインからの%変化で示した(P = 0.41, 平均 ± SD)。(B)経口PBI-05204(200 mg/kg/日)は、vehicleと比較して、MCAOの24時間後の神経機能を改善した(P = 0.0004)。(C)MCAOの7日後に群間差はなかった(P = 0.66)。(D)総脳梗塞量(P = 0.37)。(B)(C)(D)は各個体の値と群の平均値を表している。

用量依存効果

生理学的検査値は、実験1で報告された値に類似しており、群間差はなかった(データ未公開、1群につきn = 20)。7日目のロータロッドの結果に群間差はなかった(P = 0.71、図3A)。MCAO24時間後の神経学的検査の結果で、Vehicle群と比較して経口PBI-05204 100 mg/kg群は神経機能を改善した(P = 0.0005、図3B)。しかし、MCAO7日後の結果には群間差はなかった(P = 0.27、図3C)。同様に、皮質(P = 0.51)、皮質下(P = 0.14)または総脳梗塞量(P = 0.37)に差はなかった(図3D)。

実験4：ラットMCAOにおける高用量PBI-05204の効果

生理学的所見に群間差は見られなかった(データ未公表、1群につきn = 20)。実験3においてPBI-05204 100 mg/kg/日群で見られたように、PBI-05204

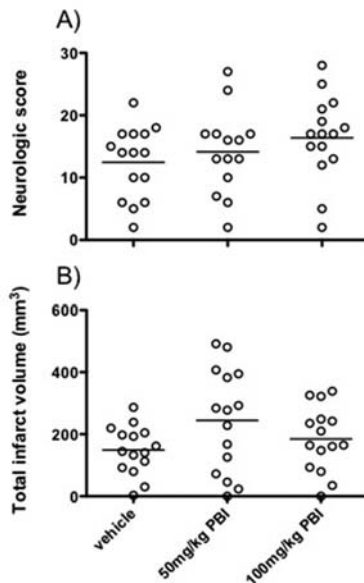


図5. MCAO後のPBI-05204の急性期の効果（1群につきn = 15）。無作為化と治療開始は再灌流の90分後であった。(A)神経学的スコア (P = 0.25)。(B)総脳梗塞量 (P = 0.11)。図は各個体の値と群の平均値を表している。

200 mg/kg/日群は、Vehicle群と比較してMCAO24時間後に神経機能の改善を示した (P = 0.004、図4B)。しかし、7日後に測定された神経機能 (P = 0.66)、ロータロッド (P = 0.41) および皮質 (P = 0.45)、皮質下 (P = 0.07)、総脳梗塞量 (P = 0.65) は、群間で差はなかった (図4A, C, D)。

実験5：MCAO後のPBI-05204の急性期の効果

生理学的所見は実験1で報告された値に類似して、群間で差は見られなかった（データ未公表、1群につきn = 15）。いずれのPBI-05204用量（50または100 mg/kg）も、神経学的スコア (P = 0.25)、皮質 (P = 0.14)、皮質下 (P = 0.49) や総脳梗塞量 (P = 0.11) を変化させなかった。図5を参照。

実験6：PBI-05204前投与の急性期の効果

生理学的所見ではMCAO 15分後のMAPで群間差が認められたが (Vehicle = 80 ± 6、生理食塩水 = 79 ± 9 mg/kg、50 mg/kg = 89 ± 10 mm Hg、100 mg/kg = 87 ± 7 mm Hg、P = 0.03、1群につきn = 10)、その他の生理学的所見に群間差はなかった（データ未公表）。PBI-05204の前治療は、神経学的スコア (P = 0.84)、皮質 (P = 0.24)、皮質下 (P = 0.59) や総脳梗塞量 (P = 0.34) を変化させなかった。Vehicle (メチル・スル

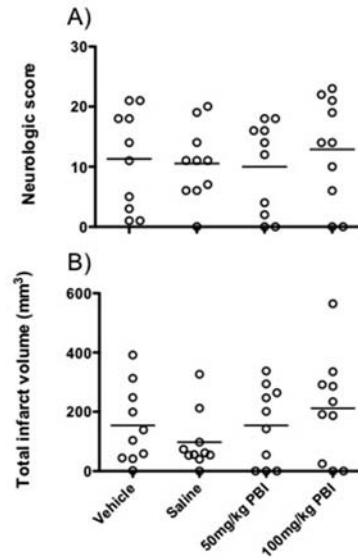


図6. PBI-05204前投与の急性期の効果（1群につきn = 10）。無作為化と治療開始はMCAOの24時間前であった。MCAOの24時間後に神経学的評価を行い、その直後に脳組織を摘出して脳梗塞量の測定をおこなった。(A)神経学的スコア (P = 0.84)。(B)総脳梗塞量 (P = 0.34)。図は各個体の値と群の平均値を表している。

ホキンド/ポリエチレン・グリコール、50:50 v/v) の効果も認められなかった (図6A, B)。

実験7：平均動脈圧 (MAP) と脳由来神経栄養因子 (BDNF) へのPBI-05204の効果を判定

PBI-05402 200 mg/kg群のMAPは、Vehicle群とPBI-05204 100 mg/kg群よりも低値であった (P < 0.05、図7A)。Vehicle群とPBI-05204 100 mg/kg群との間に有意差は認められなかった。BDNFにおいてはmRNAとタンパク質へのPBI-05204の用量依存性の効果が認められたが、群間に統計学的有意差はなかった。(それぞれP = 0.54と= 0.10、図7B, D)。1群につきn = 4。

【考察】

キョウチクトウの抽出物 (Oleander extract) であるNa⁺, K⁺-ATPase阻害薬PBI-05204は、2007年9月にFDAから“botanical drug (植物薬)”として入手された¹⁸⁾。マウスの薬物動態試験において、キョウチクトウの主な活性成分だけを精製したOleandrinと比較して、Oleander extractはBBB透過性が高くより長く脳内にとどまることが示されたため²⁸⁾、PBI-05204を用いた実験を計画した。本剤は治療域が狭いといわれて

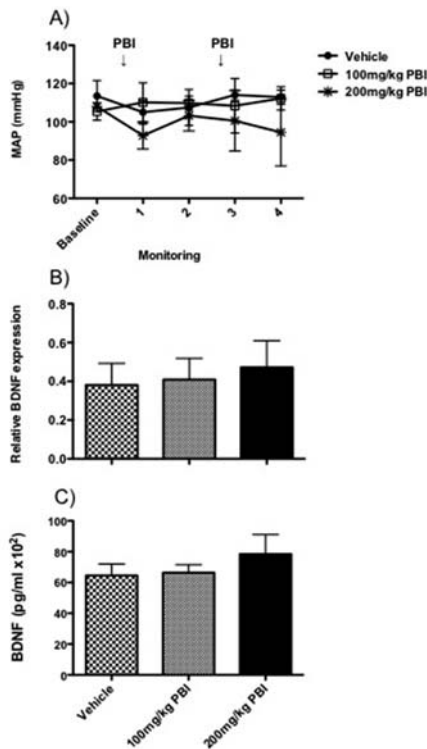


図7. 平均動脈圧 (MAP) と脳由来神経栄養因子 (BDNF) へのPBI-05204の効果 (1群につきn = 4)。治療スケジュールは図1を参照。PBI-05204治療の48時間後に、高用量PBI-05204はMAPを低下させた ($P < 0.05$) (A)。BDNF mRNA(B)またはBDNFタンパク質レベル(C)に影響はなかった。(A)(B)(C)は平均 ± SD。

いる強心配糖体であるため、ジギタリス中毒に代表されるような心循環毒性の可能性が考えられるものの、実験では中毒域を下回る用量を用いて行われた。

PBI-05204の腹腔内投与を用いた最初の実験で我々は、PBI-05204内の精製されていない植物抽出物性の化学物質が腹部炎症を引き起こし、持続的な腹腔内投与が腹部癒着を誘発するため、正常な消化管機能に影響を及ぼすことを認めた。BBB通過性を調査するために腹腔内注射を用いたPBI-05204の全身投与の研究では¹⁷⁾、PBI-05204投与が単回注射であったために腹腔には影響を与えなかった。そこで、我々は、本研究における投与経路を腹腔から経口に変更して実験を継続した。実際、有効性を示したPBI-05204での今日までの前臨床研究のほとんどは、経口投与で行われている³¹⁾。

本研究において我々はまず臨床応用を考えて虚血90分後にPBI-05204投与する実験を行った。連続投与7日目のアウトカムにおいて数値的には用量依存性に神経学的スコアおよび脳梗塞量の減少を認めたが、統計

学的に有意ではなかった。さらに、虚血前の短期治療の実験を行ったが、神経学的および組織学的転帰の改善を認めることができなかった。虚血再灌流モデルは再灌流後のフリーラジカル産生等による細胞障害が虚血による障害の大きなウェイトを占めると考えられており、Sakamotoらはフリーラジカル産生が再灌流5分後にピークをむかえ、その程度は虚血時間と相関すると報告している³²⁾。虚血前から虚血後におけるPBI-05204投与のタイミングとその量については更に工夫する必要があるかもしれない。

実験7において、高用量PBI-05204群が他の群と比較してMAPを低下させるものの、低下時の血圧は正常範囲内にあったことを認めた。この結果は、PBI-05204の心血管系への影響は軽度であり、虚血組織への側副血流を損なうことでMCAO傷害後の転帰に関与する可能性は低いことを示唆している。その実験内で我々は、mRNAとタンパク質の両レベルにおけるBDNFを測定したが、最高用量を用いたときでさえも、BDNFの有意な上昇は認めなかった。BDNFは、神経可塑性と神経機能の改善に重要な役割を果たすことが示されている³³⁾。2つの別々のグループが、脳の可塑性を促進し脳卒中後の機能的回復を増進するために、虚血性傷害後にBDNFが増加すると報告している^{34), 35)}。さらに、 Na^+ , K^+ -ATPase阻害薬Ouabainの海馬内投与がNF- κ Bの活性化を誘発して、BDNFの増加を引き起こすとの報告もある³⁶⁾。また、最近の試験において、PBI-05204はBDNFの増強に関連しており、OGDによって損傷を受けた脳スライスに神経保護作用をもたらしたと報告されている¹⁹⁾。本研究では実験に正常ラットを用いたことでPBI-05204によるBDNFへの影響が少なかった可能性があり、脳梗塞ラットを用いた実験においては異なる結果を示すかもしれない。

総合すると、PBI-05204は実験的脳卒中および低酸素状態にさらされた脳スライスにおいて神経保護作用をもたらす可能性があるが、この有効性は限定的であると言える。そしてPBI-05204の中樞神経系への治療応用に対する主な障害は、植物抽出物の有効成分とは別の化学物質であるかもしれないと推測される。その化学物質のために、腹腔内投与や経口投与において、有効成分が十分な高濃度に到達しなかった可能性がある。

近年の研究においてOleandrinによりPBI-05204で見られたような脳スライス内でのBDNF増加を示す可能性が明らかになった¹⁹⁾。Oleandrinは腹腔内および静脈内へも投与が可能であり、PBI-05204と比較する

とその程度は弱いものの、脳組織へスムーズに移行し、長く残存する可能性は高い。加えてOleandrinは、抗がん剤としての治療可能性も有し、Na⁺, K⁺-ATPaseのα-3サブユニットへの作用によってヒトのがん細胞増殖を有意に減少させることが示されている³⁷⁾。さらに、Oleandrinは抗HIV療法の新しい候補としても大きな注目を集めている³⁸⁾。これら様々な疾患に対するポジティブな前臨床試験の結果は、ヒトへの適応を進める上で有望であると考えている。

厳密なプロトコール下のin vitroデータにもかかわらず、我々の治療設定においてはPBI-05204の脳神経保護効果を示すことができなかった。しかしながらこの結果は、Na⁺, K⁺-ATPase阻害の脳虚血に対する治療効果を否定するものではなく、OleandrinをはじめとしたPBI-05204の主な活性成分に関しては、脳虚血障害の治療上有用である可能性を残しており、BDNF発現に関連したさらなる調査が必要であると考えている。

【謝辞】

本試験は、一部Phoenix Biotechnologies, Inc.社の支援を受けている。

本論文の作成にあたり、ご指導いただきましたDuke大学David S. Warner先生、また調査にご協力いただきましたWarner labの先生方 (Donald C. Lo先生、Michael Van Kanegan先生、Huaxin Sheng先生、Hercilla M. Homi先生、佐々木俊弘先生、谷西秀紀先生、Rafael. E. Chaparro先生) に、深く感謝申し上げます。

【文献】

1. Gottron MA, Lo DC: The na⁺/k⁺-atpase as a drug target for ischemic stroke. *New Strategies in Stroke Intervention: Ionic Transporters, Pumps, and New Channels*. 2009:129
2. Furui T, Tanaka I, Iwata K: Alterations in na(+)-k(+)-atpase activity and beta-endorphin content in acute ischemic brain with and without naloxone treatment. *Journal of neurosurgery*. 1990;72:458-462
3. Yang GY, Chen SF, Kinouchi H, Chan PH, Weinstein PR: Edema, cation content, and atpase activity after middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*. 1992;23:1331-1336
4. Czyz A, Baranauskas G, Kiedrowski L: Instrumental role of na⁺ in nmda excitotoxicity in glucose-deprived and depolarized cerebellar granule cells. *J Neurochem*. 2002;81:379-389
5. Tanaka E, Uchikado H, Niiyama S, Uematsu K, Higashi H: Extrusion of intracellular calcium ion after in vitro ischemia in the rat hippocampal ca1 region. *Journal of neurophysiology*. 2002;88:879-887
6. Xiao AY, Wei L, Xia S, Rothman S, Yu SP: Ionic mechanism of ouabain-induced concurrent apoptosis and necrosis in individual cultured cortical neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2002;22:1350-1362
7. Nagafuji T, Koide T, Takato M: Neurochemical correlates of selective neuronal loss following cerebral ischemia: Role of decreased na⁺, k(+)-atpase activity. *Brain Res*. 1992;571:265-271
8. Lees GJ: Inhibition of sodium-potassium-atpase: A potentially ubiquitous mechanism contributing to central nervous system neuropathology. *Brain research. Brain research reviews*. 1991;16:283-300
9. Wang JK, Portbury S, Thomas MB, Barney S, Ricca DJ, Morris DL, et al.: Cardiac glycosides provide neuroprotection against ischemic stroke: Discovery by a brain slice-based compound screening platform. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103:10461-10466
10. Ye YX, Yang XR: [inhibitory action of peruvoside and neriifolin on na⁺, k(+)-atpase]. *Zhongguo yao li xue bao = Acta pharmacologica Sinica*. 1990;11:491-494
11. Ghisalberti EL, Pennacchio M, EA: Survey of secondary plant metabolites with cardiovascular activity. *Pharmacol Biol*. 1998;36:2370279
12. Johnson EM, Jr., Koike T, Franklin J: A "calcium set-point hypothesis" of neuronal dependence on neurotrophic factor. *Exp Neurol*. 1992;115:163-166
13. Gray JJ, Bickler PE, Fahlman CS, Zhan X, Schuyler JA: Isoflurane neuroprotection in hypoxic hippocampal slice cultures involves increases in intracellular ca²⁺ and mitogen-activated protein kinases. *Anesthesiology*. 2005;102:606-615
14. Zhao KC, Zhu XY, Yi MG, Liu ZM, Song ZY: [studies on the pharmacokinetics of 3h-neriifolin in rats]. *Yao xue xue bao = Acta pharmaceutica Sinica*. 1986;21:572-579
15. Oselkin M, Tian D, Bergold PJ: Low-dose cardiotonic steroids increase sodium-potassium atpase activity that protects hippocampal slice cultures from experimental ischemia. *Neurosci Lett*. 2010;473:67-71
16. Kaur S, Rehni AK, Singh N, Jaggi AS: Studies on cerebral protection of digoxin against ischemia/

- reperfusion injury in mice. *Yakugaku zasshi : Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*. 2009;129:435-443
17. Dunn DE, He DN, Yang P, Johansen M, Newman RA, Lo DC: In vitro and in vivo neuroprotective activity of the cardiac glycoside oleandrin from nerium oleander in brain slice-based stroke models. *Journal of neurochemistry*. 2011;119:805-814
 18. Newman RA, Yang P, Pawlus AD, Block KI: Cardiac glycosides as novel cancer therapeutic agents. *Molecular interventions*. 2008;8:36-49
 19. Michael J. Van Kanegan DNH, Denise E: Dunn, Peiyang Yang, Robert A. Newman, Anne E. West, Donald C. Lo. Bdnf mediates neuroprotection against oxygen-glucose deprivation by the cardiac glycoside oleandrin. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2014;34:963-968
 20. Sheng H, Spasojevic I, Tse HM, Jung JY, Hong J, Zhang Z, et al.: Neuroprotective efficacy from a lipophilic redox-modulating mn(iii) n-hexylpyridylporphyrin, mntnhex-2-pyp: Rodent models of ischemic stroke and subarachnoid hemorrhage. *J Pharmacol Exp Ther*. 2011;338:906-916
 21. Sheng SP, Lei B, James ML, Lascola CD, Venkatraman TN, Jung JY, et al.: Xenon neuroprotection in experimental stroke: Interactions with hypothermia and intracerebral hemorrhage. *Anesthesiology*. 2012;117:1262-1275
 22. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R: Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 1989;20:84-91
 23. Yokoo N, Sheng H, Mixco J, Homi HM, Pearlstein RD, Warner DS: Intraischemic nitrous oxide alters neither neurologic nor histologic outcome: A comparison with dizocilpine. *Anesthesia & Analgesia*. 2004;99:896-903, table of contents
 24. Jones BJ, Roberts DJ: The quantitative measurement of motor incoordination in naive mice using an accelerating rotarod. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 1968;20:302-304
 25. Takata K, Sheng H, Borel CO, Laskowitz DT, Warner DS, Lombard FW: Simvastatin treatment duration and cognitive preservation in experimental subarachnoid hemorrhage. *Journal of neurosurgical anesthesiology*. 2009;21:326-333
 26. Swanson RA, Morton MT, Tsao-Wu G, Savalos RA, Davidson C, Sharp FR: A semiautomated method for measuring braininfarct volume. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 1990;10:290-293
 27. Warner DS, Ludwig PS, Pearlstein R, Brinkhous AD: Halothane reduces focal ischemic injury in the rat when brain temperature is controlled. *Anesthesiology*. 1995;82:1237-1245- discussion 1227A
 28. Ni D, Madden TL, Johansen M, Felix E, Ho DH, Newman RA: Murine pharmacokinetics and metabolism of oleandrin, a cytotoxic component of nerium oleander. *Journal of experimental therapeutics & oncology*. 2002;2:278-285
 29. Aid T, Kazantseva A, Piirsoo M, Palm K, Timmusk T: Mouse and rat bdnf gene structure and expression revisited. *Journal of neuroscience research*. 2007;85:525-535
 30. McDowell KA, Hutchinson AN, Wong-Goodrich SJ, Presby MM, Su D, Rodriguiz RM, et al.: Reduced cortical bdnf expression and aberrant memory in carf knock-out mice. *J Neurosci*. 2010;30:7453-7465
 31. Henary H, Kurzrock R, Falchook GS, Naing A, Fu S, Moulder S, et al.: Final results of a first-in-human phase i trial of pbi-05204, an inhibitor of akt, fgf-2, nf-kb and p70s6k in advanced cancer patients. *Women*. 2011;26:56.55
 32. Sakamoto A, Ohnishi T, Ohnishi T, Ogawa R: Relationship between free radical production and lipid peroxidation during ischemia-reperfusion injury in the rat brain. *Brain Research*. 1991;554:186-192
 33. Hu Y, Russek SJ: Bdnf and the diseased nervous system: A delicate balance between adaptive and pathological processes of gene regulation. *J Neurochem*. 2008;105:1-17
 34. Chen J, Zhang C, Jiang H, Li Y, Zhang L, Robin A, et al.: Atorvastatin induction of vegf and bdnf promotes brain plasticity after stroke in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2005;25:281-290
 35. Ploughman M, Windle V, MacLellan CL, White N, Dore JJ, Corbett D: Brain-derived neurotrophic factor contributes to recovery of skilled reaching after focal ischemia in rats. *Stroke*. 2009;40:1490-1495
 36. Hu LW, Kawamoto EM, Brietzke E, Scavone C, Lafer B: The role of wnt signaling and its interaction with diverse mechanisms of cellular apoptosis in the pathophysiology of bipolar disorder. *Progress in neuropsychopharmacology & biological psychiatry*. 2011;35:11-17
 37. Yang P, Menter DG, Cartwright C, Chan D, Dixon S, Suraokar M, et al.: Oleandrin-mediated inhibition of human tumor cell proliferation: Importance of na, k-atpase alpha subunits as drug targets. *Molecular*

- cancer therapeutics. 2009;8:2319-2328
38. Singh S, Shenoy S, Nehete PN, Yang P, Nehete B, Fontenot D, et al.: Nerium oleander derived cardiac glycoside oleandrin is a novel inhibitor of hiv infectivity. *Fitoterapia*. 2013;84:32-39

Na⁺, K⁺-ATPase Inhibition in Ischemic Brain Injury

Miwa Izutsu, Masaya Kudo, Kaneyuki Kawamae

Department of Anesthesiology, Yamagata University Faculty of Medicine

ABSTRACT

Background and purpose: Na⁺, K⁺-ATPase inhibitor PBI-05204 is the extract of nerium oleander. PBI-05204 decreases neuronal death and increases brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in brain slices exposed to oxygen-glucose deprivation. This study was designed to examine the efficacy of PBI-05204 in treating rats with focal cerebral ischemia.

Methods: Wister rats underwent intraluminal middle cerebral artery occlusion (MCAO) for 70 min. Intraperitoneal or oral PBI-05204 treatment was begun 90 min after reperfusion onset. The post-treatment effects were assessed at 24 hours and 7 days after MCAO. Also, the pre-treatment effect of oral PBI-05204 was evaluated at 24 hours after MCAO. In addition, we investigated whether blood pressure and BDNF were affected by PBI-05204 in normal rat.

Results: Intraperitoneal PBI-05204 induced abdominal inflammation. 100 and 200 mg/kg/day of oral PBI-05204 improved neurological outcome at 24 hours post-MCAO (P = 0.0005, 0.004, respectively). However, the difference between PBI-05204 and control at 7 days did not reach statistical significance. Pre-treatment of PBI-05204 did not alter treatment outcomes. BDNF was slightly increased by PBI-05204, but not significant.

Conclusion: We found small effects of PBI-05204 on 7-day focal ischemic outcome and BDNF. Different results might be obtained from the purified principal component of PBI-05204 that allows currently assessed administrations.

Key words : Na⁺, K⁺-ATPase inhibitor, middle cerebral artery occlusion, BDNF, rat