

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08068

研究課題名(和文) 脳梗塞急性期におけるグリコサミノグリカン損傷機構の解明

研究課題名(英文) Degradation of glycosaminoglycans in cerebral infarction

研究代表者

東 恭平 (Higashi, Kyohei)

千葉大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：10463829

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において私達は、脳梗塞急性期においてヘパラン硫酸(HS)とコンドロイチン硫酸(CS)が分解を受けることを見出した。HS分解にはヘパラーゼ(HPSE)が、CS分解にはヒアルロニダーゼ1(HYAL1)およびHYAL4が関与していた。酸化ストレス除去剤としてN-アセチルシステイン(NAC)、および低分子HSおよびCSを同時投与するとNAC単独投与よりもさらに脳梗塞体積の減少が認められた。従って、脳梗塞急性期では、酸化ストレスの除去の他、脳血管内皮細胞の糖衣の主要成分であるHSとCSを効果的に保護できれば、高い治療効果が期待できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we observed that heparan sulfate (HS) and chondroitin sulfate (CS) were degraded in ischemic brain lesion. In addition, increased level of heparanase 1 (HPSE1), hyaluronidase (HYAL1) and HYAL4 were observed. When low molecular weight of heparin and CS together with N-acetylcysteine (NAC), a free radical scavenger were administrated to photochemically induced thrombosis model mice, infarct area was decreased compared with NAC only group. These results suggest that not only oxidative stress but also degradation of HS and CS in glycocalyx of endothelial cells are important for the ischemic brain infarction.

研究分野：病態分析化学

キーワード：糖衣 ヘパラン硫酸 コンドロイチン硫酸 脳梗塞 酸化ストレス アクロレイン ヘパラーゼ ヒアルロニダーゼ

1. 研究開始当初の背景

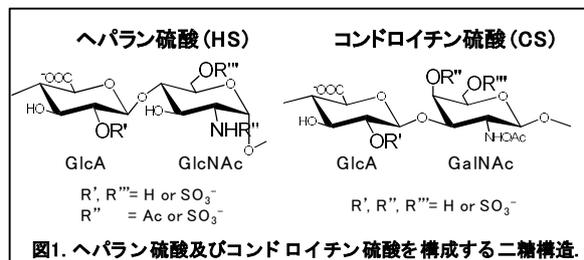
脳梗塞・脳出血に代表される脳血管障害は悪性新生物、心疾患、肺炎に次ぐ死亡率第4位の病因であり、日本全国で123万5000人が罹患していると記されている(厚生労働省「平成23年 患者調査の概要」より)。脳梗塞は極めて予後の悪い疾病であり、治療法は発症直後の血栓溶解療法など依然として限られていることから、梗塞部位における炎症の全容解明が急務である。

研究連携者である五十嵐(アミンファーマ研究所)は、細胞増殖・分化必須因子であるポリアミンの代謝によって産生されるアクロレイン(ACR: $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CHO}$)が蛋白質中のリジンやシステイン残基と結合することで活性酸素に比べて極めて強い毒性を示すことを見出し、以下のことを明らかにした(Igarashi K and Kashiwagi K., *Mol. Nutr. Food Res.*, 2011, 55, 1332-1341)。

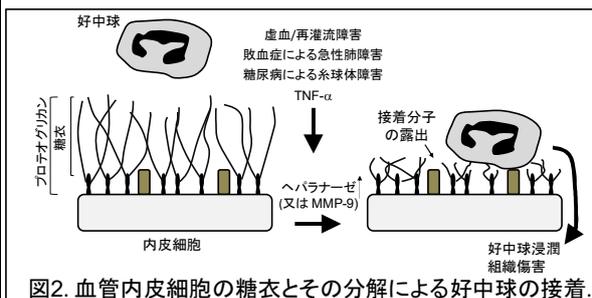
- (1) ポリアミンの代謝産物である ACR が過酸化水素 (H_2O_2) に比べ非常に強い毒性を示すこと。
- (2) ACR と蛋白質中リジン残基との反応物である蛋白質抱合 ACR (PC-Acr) が、脳梗塞患者の血漿中で増加すること、並びに血漿 PC-Acr、IL-6 及び CRP 濃度を組み合わせることで、無症候性脳梗塞を対象にした脳梗塞リスク評価を可能にしたこと。
- (3) 中大脳動脈閉塞モデルマウスを用いて解析を行ったところ、脳梗塞体積と ACR 量に相関があり、ACR 除去剤、活性酸素除去剤及び NMDA 受容体阻害剤などを投与すると脳梗塞体積が約 3~4 割縮小すること。

申請者らの他、一過性脳虚血モデルマウスにペルオキシレドキシンの中和抗体を投与するとマクロファージの活性化が阻害され、梗塞体積が約 4 割縮小したこと (Shichita T. *et al.*, *Nat. Med.*, 2012, 18, 911-917) 等、酸化ストレスと免疫細胞の活性化に関する論文が多数報告されている。

グリコサミノグリカン (GAG) はウロン酸とアミノ糖が交互に結合し、各糖水酸基の一部に硫酸基が付加した直鎖の酸性多糖類であり、代表的な GAG としてヘパラン硫酸 (HS) やコンドロイチン硫酸 (CS) が知られている (図 1)。



GAG はコア蛋白質と共有結合したプロテオグリカンとして、組織の細胞表面や細胞外マトリックスに普遍的に存在し、成長因子等と結合することで、初期胚の細胞質分裂や形態形成・骨格形成など数多くの生命現象に重要な役割を果たす (Bishop JR. *et al.*, *Nature* 2007, 446, 1030-1037)。GAG (特に HS) は血管内腔に存在する糖衣として免疫細胞の接着に対するバリア機能を有するが、近年、虚血/再灌流障害、敗血症及び糖尿病等の炎症時に糖衣損傷が起き、好中球と接着分子との結合が亢進することで重症化することが明らかとなってきた (Schmidt E. *et al.*, *Nat. Med.*, 2012, 18, 1217-1223) (図 2)。



脳梗塞研究では、近年、血管内皮細胞のバリア機能が破綻することで、マクロファージの浸潤を許し、結果的に炎症の増悪化を招くことが報告されているが (Shichita T. *et al.*, *Nat. Med.*, 2012, 18, 911-917)、その詳細なメカニズムは明らかとなっていない。すなわち、酸化ストレスの除去とマクロファージやT細胞の浸潤を同時に阻害できれば極めて高い治療効果が期待できると考えられる。脳毛細

血管における糖衣の存在は報告されているが、脳梗塞時の糖衣損傷に関する論文はほとんど報告されていない。

2. 研究の目的

中大脳動脈血栓モデルマウス (脳梗塞モデルマウス)、およびヒト脳毛細血管を構築する不死化内皮細胞、不死化アストロサイト、不死化ペリサイトを用い、脳梗塞急性期における GAG 損傷機構を分子レベルで解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 脳梗塞モデルマウスの作製および糖衣保護薬を用いた検討

中大脳動脈血栓モデルマウス (PIT 法)は、C57BL/6 マウスにローズベンガル (20 mg/kg) を静脈内投与した後、中大脳動脈に緑色光 (540 nm)を 10 分照射し、血小板を凝集させることで作製した。梗塞誘導 24 時間後に脳を摘出しスライスした後、5%トリフェニルテトラゾリウム塩 (TTC)で染色した。脳保護薬としての *N*-アセチルシステイン (NAC) (250 mg/kg)および糖衣保護薬としての過硫酸化 HS である低分子ヘパリン製剤 (LMWH) (100~150 IU/kg)および低分子 CS (100 mg/kg)を脳梗塞誘導後 10 分以内に腹腔内投与した。

(2) 不死化細胞を用いた検討

不死化内皮細胞用の培地は VasculLife Basal Medium (8 mL/100 mm dish)を用い、1% penicillin, Streptomycin, 10% FBS, 2 mmol/L L-アラニン-L-グルタミン、4 μg/mL blastcidin S となるように調節した。100 mm dish を Type I コラーゲンでコートした後に、 1.7×10^6 細胞を播種し、33°C, 5% CO₂の条件で培養した。継代は 0.1% Trypsin-EDTA phenol-red free を用いて 3 日ごとに行った。

(3) GAG の抽出および二糖分析

GAG の抽出はスピнкаラムを用いて行った。 1×10^7 細胞をアクチナーゼ E で処理した

後、サンプルを 8M 尿素および 2% CHAPS で完全に溶解させた。SAX スピнкаラムにサンプルを供し、0.2M NaCl で洗浄、16% NaCl で溶出した。精製した GAG をヘパラン硫酸特異的分解酵素で完全に二糖にまで分解した後、蛍光ポストカラム HPLC に供した。

HPLC は以下の方法で行った。カラムは Senshu Pak Docosil (4.6 × 150 mm)を用いた。溶離液は A (10 mM tetra-n-butylammonium hydrogen sulfate, 12% methanol)、B (10 mM tetra-n-butylammonium hydrogen sulfate, 12% methanol, 0.2 M NaCl)を調製し、グラジエント条件は 0-10 min (1% B)、10-11 min (1-10% B)、11-30 min (10% B)、30-35 min (10-60% B)、35-40 min (60% B)で行った。二糖を硫酸基の位置、および数で分離した後、塩基性条件下 2-シアノアセトアミドと高温下で反応させて蛍光誘導体化し、励起波長 346 nm、吸収波長 410 nm で検出した。

4. 研究成果

脳梗塞誘導 24 時間後に梗塞巣を摘出し、HS、CS およびヒアルロン酸含量を健常組織と比較した結果、HS および CS は梗塞巣で著しく減少することが明らかとなった (図 3A)。ヒアルロン酸の含量はほとんど変化なかった。梗塞巣で HS や CS が分解されるのであれば、分解してできたオリゴ糖が血中に遊離すると考えた。そこで、梗塞誘導 3、6、24 時間後における血漿中 HS および CS 濃度を測定したところ、誘導 3 時間から遊離 HS および CS 濃度が増加し、その増加は 24 時間ま

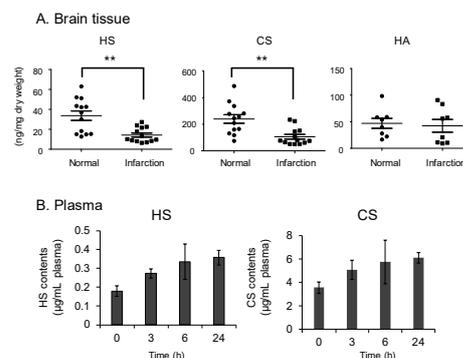


図3. 脳組織 (A)および血漿 (B)に含まれる酸性糖鎖量と脳梗塞による量の変化

で持続した (図 3B)。

HS を特異的に加水分解する酵素としてヘパラーゼ (HPSE)が、CS を加水分解する酵素としてヒアルロニダーゼ (HYAL)が知られている。糖鎖分解酵素の脳梗塞誘導後、3、6、24 時間後にそれぞれ脳梗塞巣を摘出し、梗塞巣における HPSE と HYAL の経時的な発現量の変化をウェスタンブロット法を用いて検討した。その結果、梗塞誘導 3 時間後より、梗塞巣における HYAL1 および HYAL4 の発現量が増加していた (図 4)。HYAL1 は CS と HA を、HYAL4 は CS のみを認識する。一方、HA のみを認識する HYAL2 の発現量は変化が認められなかった。また、HS を切断する HPSE の発現量は、活性型 HPSE を認識する抗体を用いたウェスタンブロット法では検出できなかった。そこで、脳梗塞巣における HPSE 活性を Heparan degrading enzyme assay kit を用いて調べた結果、梗塞誘導 3 および

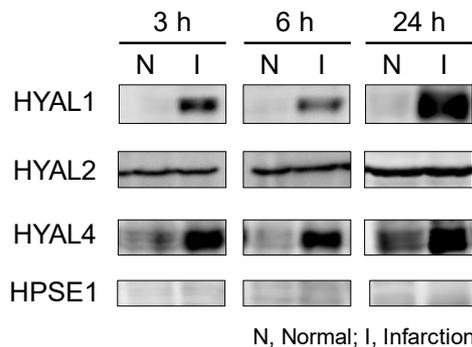


図4. 正常部位および梗塞巣における糖鎖分解酵素の発現量

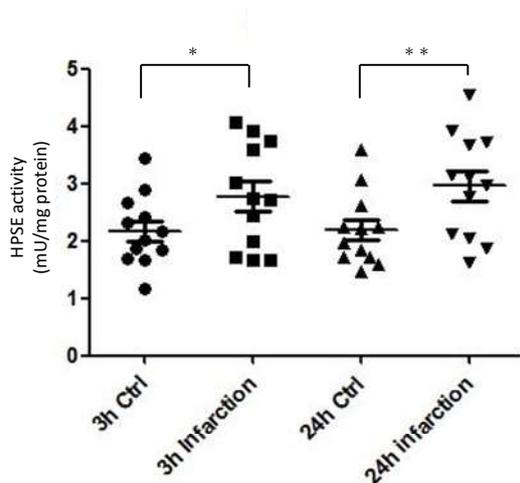


図5. 脳梗塞巣におけるヘパラーゼ活性の増加

24 時間後において、優位な HPSE 活性の増加

が認められた (図 5)。

血管内皮細胞の糖衣損傷と脳梗塞増悪の関係を明確にすることを目的に、脳梗塞モデルマウスに酸化ストレス除去剤である NAC を単独投与した時と、NAC および低分子ヘパリン、低分子 CS を同時投与した際の脳梗塞体積を調べた。その結果、NAC を単独投与すると梗塞体積が約 35%減少したのに対し、LMWH および低分子 CS を同時投与するとさらに梗塞体積が縮小し、相加効果が認められた (図 6)。以上の結果より、脳梗塞時に毛細血管の糖衣を構成する HS と CS が分解されることで、脳組織内へのマクロファージの浸潤を許し、結果的に脳梗塞の増悪化へと進むことが示唆された。

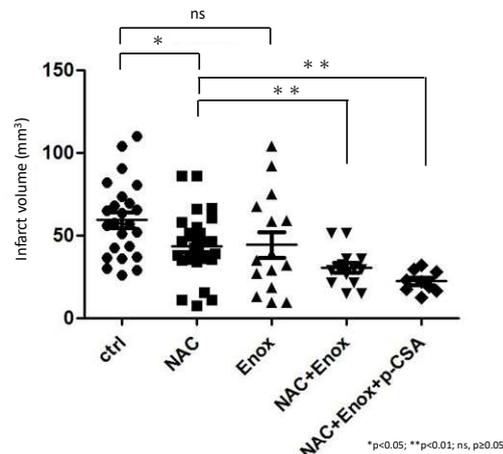


図6. N-アセチルシステイン、エノキサパリンおよび低分子コンドロイチン硫酸を同時投与した時の脳梗塞体積の変化

次に、不死化ヒト脳血管内皮細胞を用いて酸化ストレスによる HS および CS の分解機構を調べた。内皮細胞を H_2O_2 、ACR および虚血再灌流 (H/R)処理したところ、内皮細胞のみ HS 発現量の減少が認められた (図 7B)。CS 発現量の変化は認められなかった。HPSE は MMP9 と同じく不活性型 Pro-HPSE がカテプシン L によって切断を受けると活性型 HPSE になる。内皮細胞における HPSE の発現をウェスタンブロット法で確認すると不活性型 Pro-HPSE は ACR 処理によりその発現量は増加したが、活性型 HPSE の発現量はほとんど変化しなかった (図 7C)。HPSE mRNA の発現量は ACR 処理により増加していたこ

とから、不活性型 Pro-HPSE の増加は mRNA の発現亢進によるものであることが示唆された (図 7D)。

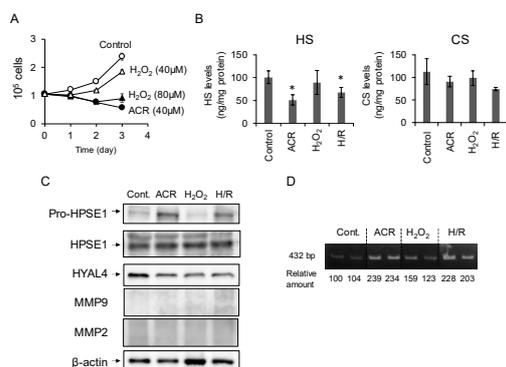


図7. 不死化ヒト脳血管内皮細胞におけるヘパラン硫酸およびコンドロイチン硫酸の発現量と酸化ストレスによる影響

HPSE 遺伝子を形質導入した HEK293 細胞に ACR 処理を施し、HPSE 活性を調べた。その結果、活性型・不活性型の比率に変化なかったものの、HPSE 活性は ACR 処理により微増した。そこで、活性型 HPSE タンパク質を購入し、ACR 処理を施してその活性を調べたが、ほとんど活性に変化は認められなかった。そこで、Pro-HPSE のみを含む培養液を調製し、ACR を処理すると HPSE の活性増加を示唆するデータを得た。

本研究により、脳梗塞時に HYAL1、HYAL4 の発現量、および HPSE1 活性が増加することで糖衣を構成する HS や CS が損傷することが明らかとなった。更に、不死化脳血管内皮細胞および HPSE 遺伝子を形質導入した HEK293 細胞では、ACR 処理により、HPSE1 活性の増加が認められた。一方、HYAL1 および HYAL4 活性の増加は認められなかった。脳血管を構成する細胞は内皮細胞の他、ペリサイトやアストロサイトがあるが、これらの細胞に ACR 処理を施しても CS 発現量の減少は認められなかった。このことから、脳梗塞巣における HYAL1 や HYAL4 の発現量増加は、脳血管系の細胞ではなく、免疫細胞が梗塞巣に集まったことが原因の一つとして考えられる。

HPSE は MMP9 と同じく不活性型 Pro-HPSE がカテプシン L によって切断を受けると活性型

HPSE になる。Deshmukh らは、ACR が Pro-MMP9 および MMP9 の活性を増加させること、および Pro-MMP9 の切断を亢進することを報告している (Deshmukh et al., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2008; 38: 446 – 454)。Pro-HPSE1 の切断は ACR によって亢進しなかったが、Pro-HPSE1 活性が ACR により増加することを示唆するデータを得たので、今後は Pro-HPSE1 タンパク質のどのアミノ酸が ACR 修飾を受けるのか調べていく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 5 件)

1. 服部 奈津子, 東 恭平, 高 健太, 石川 涼太, 梅原 健太, 降幡 知己, 五十嵐 一衛, 戸井田 敏彦 (2018) 脳梗塞急性期におけるグリコサミノグリカン損傷機構の解明 (金沢)
2. 石川 涼太, 東 恭平, 服部 奈津子, 望月 龍, 今村 正隆, 伊藤 大地, 降幡 知己, 五十嵐 一衛, 戸井田 敏彦 (2017) 脳梗塞急性期における糖衣分解機構の解明. 日本薬学会 第 137 年会 (仙台).
3. 渡辺 健太, 植村 武史, 東 恭平, 小暮 紀行, 北島 満里子, 高山 廣光, 高尾 浩一, 杉田 義昭, 西村 和洋, 五十嵐 一衛, 戸井田 敏彦 (2017) 加齢による脳梗塞悪化とアクロレインの関係並びに新規脳保護薬の開発. 日本薬学会 第 137 年年会 (仙台).
4. 石川 涼太, 東 恭平, 服部 奈津子, 降幡 知己, 藤吉 正哉, 石井 伊都子, 五十嵐 一衛, 戸井田 敏彦 (2016) 脳梗塞急性期におけるヘパラン硫酸分解機構の解明. 日本薬学会 第 136 年会 (横浜).
5. 石川 涼太, 東 恭平, 服部 奈津子, 降幡 知己, 藤吉 正哉, 石井 伊都子, 五十嵐 一衛, 戸井田 敏彦 (2016) 急性期脳梗塞時におけるヘパラン硫酸分解機構の

解明. 千葉大学リーディング研究育成プログラム「細胞間クロノ・コミュニケーション」シンポジウム「時間軸から迫る脳機能」(千葉).

[その他]

ホームページ等

<http://www.p.chiba-u.jp/lab/bunseki/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

東 恭平 (HIGASHI Kyohei)
千葉大学・大学院薬学研究院・助教
研究者番号：10463829

(3)連携研究者

戸井田 敏彦 (Toida Toshihiko)
千葉大学・大学院薬学研究院・教授
研究者番号：60163945

五十嵐 一衛 (IGARASHI Kazuei)
千葉大学・大学院薬学研究院・名誉教授
研究者番号：60089597

降幡 知巳 (FURIHATA Tomomi)
千葉大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号：80401008