

平成 30 年 6 月 2 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20021

研究課題名(和文) 脳虚血再灌流後の新規細胞障害経路の探究と治療法開発

研究課題名(英文) Novel apoptosis-inducing ligand ORAIP plays a critical role in cerebral ischemia/reperfusion injury

研究代表者

高瀬 創 (TAKASE, Hajime)

横浜市立大学・医学研究科・共同研究員

研究者番号：00549975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：2015年に細胞質内に存在する翻訳開始因子eIF5Aが心筋虚血再灌流時に細胞外に分泌されアポトーシス誘導リガンドとなって細胞のアポトーシスを誘導することが明らかとなり、この分泌型eIF5A (ORAIP [Oxidative stress-Responsive Apoptosis Inducing Protein]) に対する中和抗体のin vivo投与による心筋保護効果も確認された。今回、中枢神経系においても検討を行い、心筋同様にORAIPは再灌流によって発現誘導され、抗ORAIP中和抗体のin vivo投与も脳梗塞体積を著明に縮小させた。

研究成果の概要(英文)：Oxidative stress plays a critical role in the pathogenesis of ischemia/reperfusion (I/R) injury that leads to apoptosis. We previously identified a novel apoptosis inducing humoral factor in a conditioned medium of cardiac myocytes subjected to hypoxia/reoxygenation (H/R). We named this novel post-translationally modified secreted form of eIF5A as Oxidative stress-Responsive Apoptosis Inducing Protein (ORAIP). We confirmed that rat myocardial I/R injury was significantly suppressed by treatment with neutralizing anti-ORAIP monoclonal antibodies (mAbs). The purpose of this study is to investigate whether the same mechanism is involved in cerebral I/R injury. We found the expression of ORAIP in various types of neural cells in the ischemic penumbra region after cerebral I/R. Anti-ORAIP mAb-treatment also significantly decreased the cerebral infarct volume compared with vehicle-treatment group.

研究分野：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：酸化ストレス アポトーシス 脳虚血 再灌流障害

1. 研究開始当初の背景

1) 虚血性脳卒中治療の現状

脳血管障害の死亡率は、高齢化の中で肺炎が増加して3位から4位に低下したが、高齢者要介護の原因では第1位の疾患であり、その治療成績の向上は国民的課題である。脳血管障害のうち約4分の3を虚血性脳血管障害である脳梗塞が占めている。脳梗塞の急性期治療として、tPAによる血栓溶解療法や脳血管内治療による機械的血栓除去術が行われているが、未だに十分な成績の向上には至っていない。虚血性脳血管障害には、oxygen radical などによる酸化ストレスが重要な役割を担っているとされ、臨床的には free radical scavenger である Edaravone が用いられている。しかし、その効果は限定的であり、急性期再灌流療法が可能となった現在、更に効果的な薬剤の開発が急務となっている。

2) 新たな酸化ストレス応答組織障害因子の発見

酸化ストレスは、直接的に遺伝子や蛋白・脂質などを修飾して細胞死をもたらすとされていたが、2015年に酸化ストレスに応答して細胞死を誘導する新たな経路が発見された。それは、細胞内に生理的に存在する eIF5A (eukaryotic translation initiation factor 5A) が、心筋虚血再灌流後に細胞外に分泌され(この分泌型 eIF5A を ORAIP [Oxidative stress-Responsive Apoptosis Inducing Protein]と命名) autocrine 的に apoptosis を誘導する経路である (Seko, Sci Rep. 2015)。これは、画期的な発見であるが、本経路が脳虚血でも関連しているかは未だ不明であり、脳虚血再灌流治療の新たな治療標的分子となるかの検証が必要である。

3) eIF5A の生理機能と酸化ストレス下での hypusination と細胞外への分泌

eIF5A はリボソームでの mRNA からの蛋白翻訳過程に関与し、その生理機能発現には、Lysine 基の hypusine 化が必須であり、hypusine 化される唯一の蛋白としても知られている (Sievert H, 2014)。Hypusine 化 eIF5A は、細胞の増殖・分化や、癌化との関連も注目され (Mathews M, 2015)、脳においては神経成長因子 (NGF) の作用が eIF5A を介するともされ、様々な臓器で生理的に重要な役割を担っている (Huang Y, 2007)。共同研究者である世古は、心筋虚血再灌流後の細胞障害で、eIF5A がその原因遺伝子であることを突き止めた。その機序として、eIF5A が酸化ストレス刺激によって 69 番目のチロシン残基の硫酸化を受けてリガンドとしての機能を獲得して細胞外に分泌され、autocrine・paracrine 的に細胞膜表面の受容体に作用して apoptosis を誘導することが分かった。本発見は、酸化ストレス時の酸素

radical による直接的な遺伝子・蛋白修飾とは全く異なる alternative pathway であり、従来の free radical scavenger 単独では細胞保護効果が少ないことをある程度説明可能である。eIF5A が脳にも発現していることを考慮すると、脳保護の新たな治療ターゲットを提示する画期的な発見と思われる。脳梗塞治療に対しても新たな視点からの治療法開発につながるものと考えられる。

4) 心筋虚血再灌流障害に対する抗 eIF5A 抗体の効果

世古らは、ラット心筋虚血再灌流モデルの再灌流 10 分前に抗 eIF5A 抗体 (YSP5-45-36) を投与 (3mg/kg, 静注) すると、心筋梗塞が対照群と比較して有意に減少することを示し、in vivo 心筋における分泌型 eIF5A 誘導系細胞死経路の存在を証明した (Seko, Sci Rep. 2015)。

2. 研究の目的

分泌型 eIF5A が誘導する細胞死経路が中枢神経系に存在するか、脳虚血再灌流時にも作用しているかは未だ不明である。本研究では、(1) ORAIP が脳虚血後にも分泌されて神経細胞死を誘導するか、(2) その経路の遮断が神経保護的に作用するか、を検証し、将来の治療ターゲットとしての可能性を検討した。

3. 研究の方法

1) in vitro 実験

ラット初代培養 neuron を用い、低酸素負荷後の ORAIP 発現を免疫染色により経時的に観察した。また、AIF、Annexin-V 染色を用いて、recombinant-ORAIP のアポトーシス誘導効果を評価した。さらに、抗 ORAIP 中和抗体と対照 IgG を上記培養系に添加し、低酸素負荷後のアポトーシス抑制効果を検証した。

2) in vivo 実験

ラット一過性脳虚血再灌流モデル
再現性の高い脳梗塞を作成する目的で、雄性高血圧自然発症ラット (11-14 週齢) を用いて、開頭法による左中大脳動脈遠位部と同側総頸動脈の 60 分間同時閉塞後の再灌流モデルを作成した。手術中は、フィードバック機能付き温熱床と加温ランプを用いて直腸温と頭蓋部を 37 ± 0.5 に保った。また、尾動脈の圧モニタにより収縮期血圧を 100mmHg 以上に保ち、さらに、動脈閉塞前後と閉塞中の動脈血ガス検査、レーザードップラー血流計を用いた脳血流量測定、血管閉塞解除後の閉塞部遠位血管の肉眼的所見により、除外個体の検討も行い、脳虚血侵襲に影響する因子を徹底して管理した。

対照 IgG または抗 ORAIP 中和抗体を以下の 2 方法で投与した。

() 浸透圧性ポンプ (ALZET 1003D (1.0 μ l/hr)) を用いて脳虚血 48 時間前から (pre-treatment)

() 再灌流開始直後より 30 分間 (post-treatment)

上記は、左側脳室に投与し、再灌流 24 時間後に TTC 染色を用いて脳梗塞体積を比較した。次に、再灌流前後にラットの大槽を直接穿刺して脳脊髄液を採取し、ELISA 法を用いて髄液中 ORAIP 濃度を定量した。そして、虚血再灌流前後の脳凍結切片を用いて中枢神経系内の ORAIP 発現を免疫染色にて経時的に追跡した。さらに、各種中枢神経系細胞種における ORAIP の発現についても検討を行った。

4. 研究成果

1) in vitro 実験

低酸素負荷後再酸素化した培養細胞辺縁部において、再酸素化 15 分後をピークとして ORAIP が発現誘導された。培養 neuron のアポトーシス誘導は recombinant-ORAIP 負荷により再現された。さらに、ORAIP 中和抗体は低酸素負荷後の上記培養系に対してアポトーシス抑制効果を認めた ($p < 0.001$)。

2) in vivo 実験

ORAIP 中和抗体投与によりペナンプラ領域の TUNEL 染色陽性細胞数が減少し、同様に脳梗塞体積も用量依存的に有意に減少した。中和抗体投与は、再灌流直後の投与においても有意に脳梗塞体積を縮小させた。髄液中 ORAIP 濃度は、虚血再灌流後 30 分で上昇を認めた。免疫組織染色においても、neuron, astrocyte, oligodendrocyte で ORAIP の発現が確認され、虚血再灌流後 15 分でピークを認めた。心筋同様 (Seko, Sci Rep. 2015)、今回、中枢神経系においても、ORAIP は虚血再灌流によって発現し、抗 ORAIP 中和抗体の in vivo 投与は脳梗塞体積を著明に縮小させた。この効果は、再灌流後の投与においても有効であった。このことから虚血再灌流障害においては ORAIP が重要な役割を果たし、その作用は臓器間に共通の普遍的な機序であることが強く示唆された。今後、実臨床において、脳梗塞急性期における再灌流療法 (tPA や血栓回収) 施行時の障害抑制治療として大きな効果が期待される。

(現在、論文投稿準備中)

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)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 5 件)

岸本真雄, 高瀬創, 末永潤, 荒木孝太, 八尾貴子, 山本哲哉, 世古義規: 脳虚血再灌流障害における酸化ストレス応答性アポトーシス誘導因子(ORAIP)の意義, 第43回日本脳卒中学会学術集会, 福岡, 2018年3月

岸本真雄, 末永潤, 高瀬創, 荒木孝太, 八尾貴子, 世古義規: 脳虚血再灌流障害における酸化ストレス応答性アポトーシス誘導因子(ORAIP)の役割およびその機序の解析, 日本脳神経外科学会第76回学術総会, 名古屋, 2017年10月

Kishimoto M, Suenaga J, Takase H, Araki K, Yao T, Seko Y: Oxidative stress-Responsive Apoptosis inducing Protein (ORAIP) Plays a Critical Role in Cerebral Ischemia/Reperfusion injury. EANS2017, Venice, Italy, Oct. 2017

Kishimoto M, Suenaga J, Takase H, Araki K, Yao T, Seko Y: Oxidative stress-Responsive Apoptosis inducing Protein (ORAIP) Plays a Critical Role in Cerebral Ischemia/Reperfusion injury. BRAIN & BRAIN PET 2017, Berlin, Germany, Apr. 2017

岸本真雄, 末永潤, 高瀬創, 荒木孝太, 八尾貴子, 世古義規: 酸化ストレス応答性新規アポトーシス誘導因子(ORIAP)が脳虚血再灌流障害において重要な働きをする, 第42回日本脳卒中学会学術集会, 大阪, 2017年3月

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高瀬 創 (TAKASE Hajime)
横浜市立大学・医学研究科・共同研究員
研究者番号：00549975

(2) 研究分担者

()
研究者番号：

(3) 連携研究者

()
研究者番号：

(4) 研究協力者

未永潤 (SUENAGA Jun)
岸本真雄 (KISHIMOTO Masao)