

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2017～2019
課題番号：17K10820
研究課題名(和文) 主幹動脈閉塞性脳梗塞に対する血管内治療を利用した新しい側副血行賦活化治療の開発
研究課題名(英文) S1P1 activation enhances leptomeningeal collateral development and improves outcome after stroke
研究代表者
三木 一徳 (Miki, Kazunori)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教
研究者番号：00536823
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：内皮細胞に発現するスフィンゴシン1リン酸受容体1(S1P1)がシアストレスを感じ、その下流のシグナリングを誘導することが報告された。本研究ではS1P1選択的作動薬であるSEW2871を中大脳動脈永久閉塞モデルのマウスに投与するとマウスの脳軟膜動脈は有意に発達し、脳血流の改善、脳梗塞体積の減少、神経所見の改善が認められ、Endothelial nitric oxide synthase (eNOS)リン酸化の亢進し、血管新生の促進、脳血液関門(blood-brain barrier; BBB)の強化も認められ、こうした効果も相乗して脳梗塞の予後が改善することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
脳梗塞治療として再開通療法と同時に、脳血流の低下を防ぎ、いかに梗塞に陥らせないかという治療戦略が非常に重要であり、実現すれば非常に多くの脳梗塞症例に適応しうる。実際に成体脳であっても脳梗塞後に新たな血管が形成される現象が認められ、特に血管内皮細胞だけでなく平滑筋、基底膜よりなる口径の大きな新たな機能する動脈の発達を意味するArteriogenesis(動脈新生)は、脳の主幹動脈が閉塞した場合に側副血行路として機能し、脳血流の保持が可能となる。今回脳梗塞齧歯類モデルにおいて、脳表の動脈新生の発達した症例では脳梗塞の梗塞体積が減少し、機能予後が良好であること確認した。

研究成果の概要(英文)：Collateral development after acute ischemic stroke is triggered by shear stress, and sphingosine-1-phosphate receptor 1 (S1P1) on endothelial cells was reported to sense shear stress and transduce its signalling pathways. We investigated the effect of an S1P1-selective agonist (SEW2871) on leptomeningeal collateral arteries in acute stroke model. Neurological functions, leptomeningeal arteries, and infarct volume were compared after treatment. S1P1 expression in endothelial cells was increased after pMCAO. The number of leptomeningeal collateral arteries was significantly increased and neurological outcome improved. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) phosphorylation and the expression of tight junction proteins was increased in the SEW2871 group. S1P1-selective agonist enhanced leptomeningeal collateral circulation via eNOS phosphorylation and reinforced BBB integrity in acute ischemic stroke mice, leading to smaller infarct volume and better neurological outcome.

研究分野：脳血管障害

キーワード：脳動脈新生 側副血行 脳血管障害 スフィンゴシン1-リン酸受容体 齧歯類モデル

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞による身体的・社会的損失は甚大であり、効果的な治療の開発が急務である。特に重篤な後遺症を残す中大脳動脈近位部閉塞時には、脳軟膜動脈の既存の吻合を介した前および後大脳動脈からの側副結構路の発達が知られている。側副血行路の良好な発達は梗塞体積の減少や予後改善につながるがヒトにおいて報告されているが、発達させるための有効な治療介入はまだ開発されていない。動脈の閉塞や高度狭窄が起ると、既存の細動脈が血流を再分布させようとし、血流豊富な部位と血流が低下した部位をつなぐ細動脈にシアストレスが生じる。脳梗塞急性期においてはこのシアストレスがトリガーとなって側副血行路の発達につながる。

2. 研究の目的

スフィンゴ脂質の一種である S1P は S1P1~S1P5 までの 5 つの受容体に結合することで様々な生理作用を発揮する。S1P1 は細胞の増加や遊走、血管の拡張につながるが知られている。S1P1 は神経細胞、グリア細胞、血管内皮細胞に存在するがその発現レベルは病態により変化する。脳梗塞においては S1P1 制御薬である FTY720 が神経細胞に対し保護的であることが報告されたが、血管内皮細胞に対する効果については知られていない。一方近年、血管内皮細胞に存在する S1P1 がシアストレスを感知しその下流のシグナリングを誘導することが報告された。我々は、脳梗塞急性期における S1P1 の発現の変化、および S1P1 選択的作動薬 SEW2871 投与による脳軟膜動脈への作用について検証した。

3. 研究の方法

8~10 週齢の BALB/c マウス雄(20-24g)を使用した。脳梗塞モデルはイソフルランにて麻酔導入後、左側頭骨に 2mm 大の穴を作成しその直下にある中大脳動脈の第一分岐部より近位を焼灼する中大脳動脈永久閉塞モデル(pMCAO)とした。Sham 手術は頭蓋骨の穴作成後に動脈を焼灼せずに閉鎖した。

薬剤として①SEW2871 5mg/kg/day、②SEW2871 1.5mg/kg/day、③SEW2871 5mg/kg/day + S1P1 拮抗薬 VPC23019 0.5mg/kg/day、あるいは溶媒である④dimethyl sulfoxide(DMSO)のみ、のいずれかを pMCAO 処置後に連日腹腔内投与した。

細胞はマウス脳神経細胞(Neuro-2a)およびマウス脳血管内皮細胞(b End.3)を用いて、in vitro における虚血モデルである oxygen-and-glucose-deprived (OGD)負荷を行った。

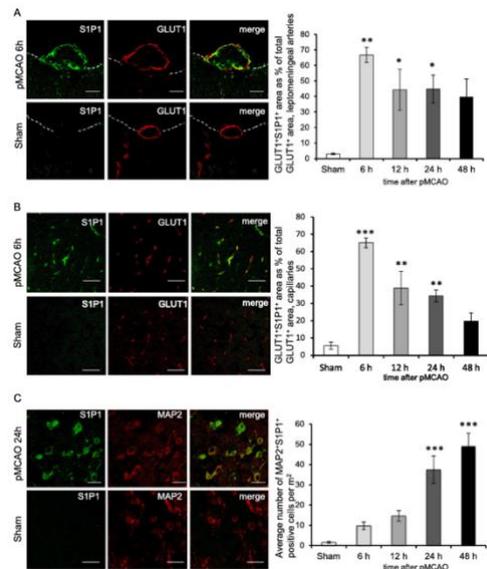
細胞または脳虚血組織から Isogen II により RNA を抽出し taqman 法により RT-PCR を行った。採血は下大静脈から行い、脳虚血組織から抽出した蛋白は 10%または 5-20%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、PVDF 膜へ転写して Western blot を行った。

脳軟膜動脈は PILOT 社の市販品であるインクを用いて pMCAO 後、薬剤投与後のマウスを左室より灌流し、インクによりラベルされた脳軟膜動脈を評価した。組織学的検討では pMCAO 後、または pMCAO および薬剤投与後のマウスを 4% paraformaldehyde で灌流、脳を浸透固定し、包埋後に 20 μ m ごとに切片を作成した。神経学的所見は neurological deficit score および Adhesive removal test を実施して評価した。統計には多群間比較では one-way analysis of variance (ANOVA)、post-hoc Tukey-Kramer または Dunnet 検定を、2 群間では Students' *t* 検定を行った。

4. 研究成果

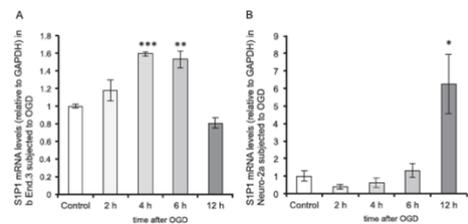
1. pMCAO 後の S1P1 の発現推移

組織学的検討において、pMCAO では sham と比較し、S1P1 は脳軟膜動脈の血管内皮細胞での発現が有意に増加し、6時間後をピークに24時間後まで有意な上昇が認められた。一方、神経細胞において有意な増加が認められたのは24時間後以降であった。グリア細胞では発症48時間後まで有意な発現増加は認められなかった。



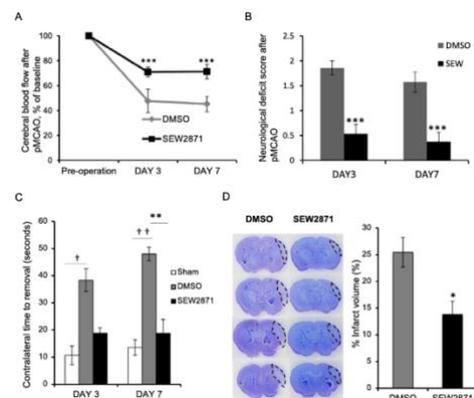
2. *In vitro* 虚血モデルにおける S1P1 発現

OGD 負荷後、b End.3 では S1P1 mRNA の有意な発現増加は虚血早期である 4、6 時間後に見られた一方、Neuro-2A では 12 時間後でのみ見られた。



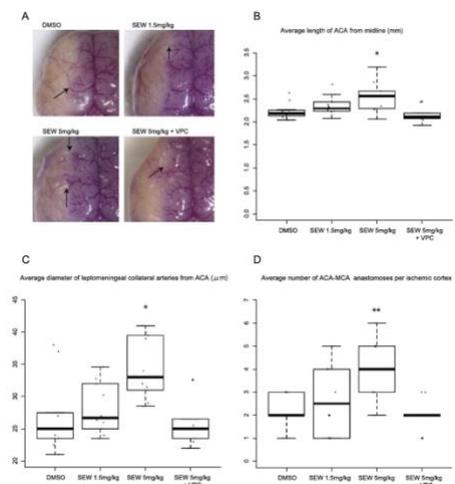
3. S1P1 選択的アゴニスト SEW2871 投与による pMCAO マウスの予後改善効果

pMCAO 後、SEW2871 5mg/kg/day を連日投与したマウスでは vehicle 群と比較し前および中大脳動脈灌流境界域における脳血流は有意に増加し、神経学的所見の改善、7 日後の梗塞体積の縮小が認められた。

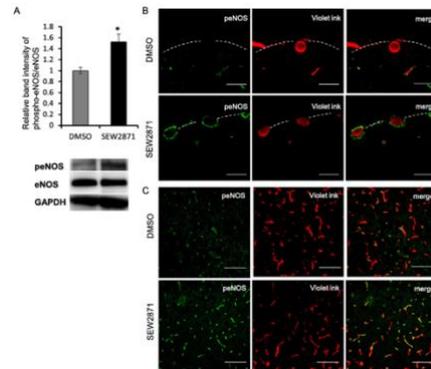


4. SEW2871 投与の脳軟膜動脈を介した側副血行路への影響

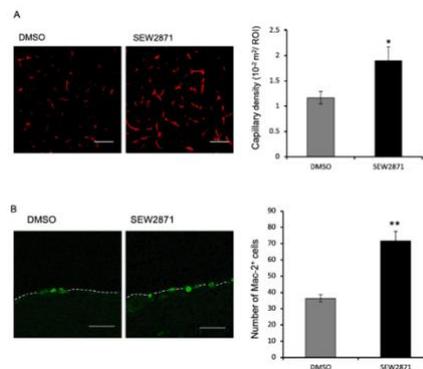
pMCAO マウスを 7 日後インク灌流し、脳軟膜動脈を評価すると、SEW2871 5mg/kg/day 投与群では前および中大脳動脈吻合の数、径、前大脳動脈から虚血領域までの長さが有意に上昇していた。SEW 1.5mg/kg/day では有意な増加は認められず、VPC 投与群では SEW5mg/kg の効果は完全に相殺されていた。以後の検討は SEW 5mg/kg/day で行った。



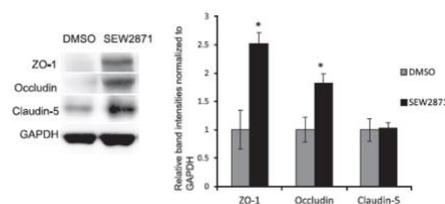
5. SEW2871 の eNOS リン酸化への作用
pMCAO および薬剤投与 6 時間後の虚血脳から抽出した蛋白で western blot を行うと、phospho-eNOS / eNOS 比は SEW2871 投与により有意に増加した。



6. SEW2871 の血管新生への作用
pMCAO7 日後、梗塞周辺領域の毛細血管密度を蛍光ラベルした毛細血管の定量により評価したところ、SEW2871 投与群で有意に血管密度が増加していた。さらに虚血脳表面の動脈周囲へ遊走するマクロファージ(Mac-2 陽性細胞)の数を定量化したところ、SEW2871 群で有意に増加していた。



7. SEW2871 の BBB への作用
BBB の破綻が最も顕著となる pMCAO 3 日後の虚血脳から抽出した蛋白で western blot を行うと、BBB の tight junction を構成する蛋白 (ZO-1 および Occludin) の発現は SEW2871 投与群で有意に高かった。



8. SEW2871 の脳梗塞後の炎症反応への作用
pMCAO3 および 7 日後の末梢血ではリンパ球数は DMSO 群と SEW2871 群で有意差はなかった。組織学的検討では pMCAO7 日後、梗塞周辺へ集簇するミクログリア(Iba-1 陽性細胞)の数は両群で有意差はなかったものの、T 細胞(CD3 陽性細胞)の脳実質への侵入は SEW2871 群で有意に低下していた。

< 考察 >

脳梗塞発症後、S1P1 の発現は早期 6 時間をピークとして脳軟膜動脈を含む脳血管内皮細胞で増加し、神経細胞での増加は 24 時間後からであった。S1P1 制御による脳梗塞改善効果については直接的な神経保護効果が唱えられてきたが、今回の我々の検討では S1P1 作動薬 SEW2871 の投与により eNOS のリン酸化といった S1P1 の下流シグナルの亢進を介して血管の拡張が得られ、脳軟膜動脈を介した側副血行血流が保たれ、梗塞縮小、神経所見改善につながった可能性を示唆した。動脈の発達(arteriogenesis)に必要とされる、梗塞脳表面の動脈周囲へのマクロファージの遊走は SEW2871 群で増加すると同時に、梗塞周囲の毛細血管密度も増加(angiogenesis)し、この 2 つの血管新生メカニズムにより S1P1 の効果はさらに発揮されたと考えられる。S1P1 は BBB を制御する tight junction 蛋白を維持していることが知ら

れており、今回 SEW2871 投与により tight junction 蛋白が保たれたことも予後改善につながった可能性がある。

また、S1P1 はリンパ球、特に T 細胞の遊走抑制等の免疫抑制効果が知られるが、今回の検討では重篤な末梢血リンパ球減少を引き起こすことなく、T 細胞の脳実質内への侵入を抑制しており、脳梗塞後の免疫反応抑制を介した予後改善効果も想定された。

側副血行路の発達した脳梗塞患者ではその後に閉塞血管の再開通が得られるか否かに関わらず予後良好であることがヒトで報告されており、側副血行路は主動脈の血流再開までの血流維持のみでなく神経保護因子や内因性の血栓溶解物質の送達にも寄与していると考えられており、S1P1 による側副血行路への介入は有効な治療戦略となり得る。

<結論>

我々は脳梗塞マウスへの S1P1 作動薬投与により、脳軟膜動脈を介した側副血行路が発達し、脳梗塞の予後が改善することを報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 石橋智子、遠山悟史、三木一徳、唐鎌淳、吉野義一、石橋哲、富田誠、横田浩史、根本繁.	4. 巻 40
2. 論文標題 全身麻酔薬の種類による前方循環の各分枝の循環時間の比較.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床薬理の進歩	6. 最初と最後の頁 199-206
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ishibashi Tomoko, Toyama Satoshi, Miki Kazunori, Karakama Jun, Yoshino Yoshikazu, Ishibashi Satoru, Tomita Makoto, Nemoto Shigeru	4. 巻 5
2. 論文標題 Effects of propofol versus sevoflurane on cerebral circulation time in patients undergoing coiling for cerebral artery aneurysm: a prospective randomized crossover study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Monitoring and Computing	6. 最初と最後の頁 987-998
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10877-018-00251-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Iwasawa E, Ishibashi S, Suzuki M, Li F, Ichijo M, Miki K, Yokota T.	4. 巻 5
2. 論文標題 Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1 Activation Enhances Leptomeningeal Collateral Development and Improves Outcome after Stroke in Mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Stroke Cerebrovasc Dis.	6. 最初と最後の頁 1237 - 1251
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2017.11.040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Li FY, Ishibashi S, Iwasawa E, Suzuki M, Ichinose K, Yokota T.	4. 巻 65
2. 論文標題 Upregulation of lipoprotein receptors on brain endothelial cells and neurons at the early phase of ischemic stroke in mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Med Dent Sci.	6. 最初と最後の頁 59-71
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 石橋哲
2. 発表標題 脳側副血行路とS1P受容体.
3. 学会等名 第44回日本脳卒中学会学術集会. 横浜. 2019.3.22. (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石橋 哲1, 岩澤 絵梨1, 鈴木 基弘1, 李 富宝1, 一條 真彦2, 三木 一徳3, 横田 隆徳1
2. 発表標題 S1P1 activation enhances leptomeningeal collateral development and improves outcome after stroke
3. 学会等名 第59回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 E. Iwasawa, F. Li, S. Ishibashi, M. Ichijo, K. Miki, T. Yokota
2. 発表標題 EXPRESSION OF SPHINGOSINE-1-PHOSPHATE RECEPTOR 1 IN LEPTOMENINGEAL ARTERIES IS UPREGULATED AND ITS AGONIST IMPROVES NEUROLOGICAL OUTCOME IN ISCHEMIC STROKE IN MICE
3. 学会等名 WCN 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Satoru Ishibashi, Eri Iwasawa, Motohiro Suzuki, Li Fuying, Masahiko Ichijo, Kazunori Miki, Takanori Yokota.
2. 発表標題 S1P1 activation enhances leptomeningeal collateral development and improves outcome after stroke.
3. 学会等名 第43回日本脳卒中学会総会 2018年3月16日 (福岡)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 石橋哲	4. 発行年 2019年
2. 出版社 日本臨床社	5. 総ページ数 938-944
3. 書名 脳卒中 -側副血行路-	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----