

令和 3 年 6 月 20 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07538

研究課題名(和文)脳梗塞における中性糖脂質と炎症関連分子とのクロストーク

研究課題名(英文) Crosstalk between neutral glycolipids and inflammatory molecules in cerebral infarction

研究代表者

伊藤 信二 (Ito, Shinji)

藤田医科大学・医学部・教授

研究者番号：40572079

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：近年動脈硬化の進展における炎症性機序の関与が注目されているが、本研究では中性糖脂質の多面性に着目し、アテローム血栓性脳梗塞の病態における炎症促進因子としての作用の解明を試みた。発症機序が動脈硬化と全く異なる心原性脳塞栓症との間で、急性期における炎症関連分子および中性糖脂質の発現、糖脂質代謝にかかわるライソゾーム水解酵素活性を比較したが、今回の研究ではこれらの因子のアテローム血栓性脳梗塞発症機序への関与は証明できなかった。炎症関連分子や糖脂質代謝は発症からの時間、基礎疾患、感染症や悪性腫瘍合併の有無など、症例毎の臨床的背景にも大きく左右されるため、症例を蓄積して多変量解析を進める必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的には炎症と糖脂質代謝という、各々生体におけるきわめて普遍的なプロセス間のクロストークを、脳梗塞発症における動脈硬化の機序からできるだけ広範に捉えることで、さらに虚血性心疾患や種々の血管炎症候群などへの展開を意図したが、成果が得られなかった。社会的意義としては、血中の糖脂質と関連分子の発現パターンの解析や、ライソゾーム水解酵素活性測定など、血液検査のみで簡便に脳梗塞の病型診断を行い、早期治療・再発予防の精度向上や、急性期における積極的な免疫療法や糖脂質を利用した新たな治療法の開発につながることを目指した。

研究成果の概要(英文)：In recent years, the involvement of inflammatory mechanisms in the development of arteriosclerosis has attracted attention. We focused on the multifunction of neutral glycolipids and tried to elucidate their action as proinflammatory factors in the pathophysiology of atherothrombotic infarction. We compared the expression of inflammatory molecules and neutral glycolipids, and the activity of lysosome hydrolytic enzymes involved in glycolipid metabolism between atherothrombotic infarction and cardiogenic embolism whose pathogenic mechanism is remarkably different, but could not demonstrate the involvement of these factors in the pathogenesis. The expression of inflammatory molecules and glycolipid metabolism were influenced by the clinical background of each case, such as the time after onset, underlying diseases, and the presence of infectious diseases and malignancies. In the future, it will be necessary to further analyze many more cases for which multivariate analysis is possible.

研究分野：神経内科学

キーワード：脳梗塞 脳血管障害 炎症 糖脂質 炎症関連分子 血管内皮 ライソゾーム水解酵素 Trousseau症候群

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

近年脳血管障害、ことにアテローム血栓性脳梗塞で、動脈硬化の進展過程における炎症関連分子の関与が注目されてきた。代表的な分子として、血小板や白血球と血管内皮細胞の接着に関与する **ICAM-1**、白血球の内皮下への侵入やマクロファージの活性化に関与する **MCP-1**、プラーク肥厚を促進する炎症性サイトカインである **TNF- α** 、**IL-6**、**MMP-9** などがあり、例えば炎症性サイトカインの **TNF- α** が急性期梗塞巣の大きさと相関、**IL-6** の経時的増加が頸動脈のプラーク肥厚と相関、急性期 **IL-6** と高感度 **CRP** が一過性脳虚血発作 (**TIA**) および **NIHSS 3** 点以下の軽症脳梗塞患者における発症後 **90** 日以内の再発・死亡率と相関したという報告がある。

一方、本研究室ではこれまで中性糖脂質の神経疾患における役割について研究してきたが、我々は従来の基礎研究において、様々な炎症惹起物質に対する、中性糖脂質の促進的なクロストークが捉えられていることに着目した。即ち **TNF-** が血管内皮細胞における **lactosylceramide (LacCer)** 合成を介して、血小板や白血球と血管内皮の接着に関与する分子である **ICAM-1** 発現を刺激する (**Bhunja AK et al. J Biol Chem. 1998**)、動脈硬化モデルマウスにおいて、**glucosylceramide (GluCer)** 合成酵素阻害薬である **AMP-DSM** が **TNF- α** の発現を減少させ、アテローム性動脈硬化を阻害する (**Bietrix F et al. Atheroscler Thromb Vasc Biol. 2010**)、あるいはプラーク内では **GluCer**、**LacCer**、**ceramide** などの発現が増加し、一部は **caspase-3** 活性化を介して血管内皮細胞の **apoptosis** を誘導する (**Edsfeldt A et al, Atheroscler Thromb Vasc Biol. 2016**) ことが示されている。

しかしながら、これらの糖脂質の生体内での発現や、糖脂質代謝に関わるライソゾーム水解酵素の活性を、脳血管障害の臨床像との関連～病型、病期、再発の有無など～において解析した報告はなく、また **Fabry** 病や **Gaucher** 病などのライソゾーム病における脳梗塞においては、ライソゾーム水解酵素活性低下が、炎症促進や神経保護機転に作用している可能性があるが、アテローム血栓性脳梗塞でこの酵素活性を積極的・包括的に検討した報告はない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、これまで当教室で独自に進めてきた、中性糖脂質をターゲットとした神経疾患の病態解明の試みに根ざして、脳血管障害における、中性糖脂質およびライソゾーム水解酵素活性の変動を介した炎症機転や神経保護機転を基礎的・臨床的両側面から明らかにすることにある。脳血管障害の病態における炎症促進因子としての中性糖脂質の関与を明らかにできれば、中性糖脂質をターゲットとした早期の病型診断・治療の精度向上や、積極的な免疫療法や糖脂質を利用した新たな治療法の開発につながると考えた。

3. 研究の方法

藤田医科大学病院脳神経内科に入院した急性期脳梗塞患者の病型を **TOAST** 分類に基づき臨床的に分類し、臨床症候、一般血液・凝固・生化学・免疫学的所見、画像所見(頭部 **MRI**、頭頸部 **MR angiography**、脳血流 **SPECT**)、治療薬(急性期治療およびスタチンを含む二次予防)につきデータベースを作成した。

同時に脳梗塞急性期(入院当日)・回復期(発症 **7~30** 日)に採取した血清を用いて、血

清中の高感度 **CRP**、**IL-6**、**IL-10**、**IL-23**、**ICAM-1**、**VCAM-1**、**MCP-1**、**MMP-2**、**MMP-9**、**TNF- α** 、**TNF-receptor 1 and 2** の定量 (**ELISA** 法) を試みた。また **FACS** を用いて、主に **T** リンパ球の表面抗原解析も行った。

また糖脂質代謝に関わるライソゾーム水解酵素である、血清中の **glucocerebrosidase-1**、**glucocerebrosidase-2**、 α - & β -**galactosidase**、 β -**glucosidase**、 β -**hexosaminidase** の活性を、**4-methylumbelliferone** を用いた蛍光法により測定した。

さらに **neurovascular unit** のモデルであるアストロサイト - 血管内皮細胞を共培養し、ここに **lactosylceramide**、**glucosylceramide**、**galactosylceramide**、**ceramide** 等を作用させ、経時的な形態的变化を観察するとともに、炎症関連分子や **apoptosis** 関連分子の発現を **Western blot** 法や、**real time PCR** 法で解析する実験系を検討した (未着手)。

4 . 研究成果

特に病態、患者背景が大きく異なるアテローム硬化性脳梗塞と心原性塞栓症の間で、入院当日の血清中の炎症関連分子の量や発現パターンが異なる可能性を予測したが、有意差は得られなかった。また、急性期と回復期、脂質異常症の有無、スタチン投与前後においても有意な変化は認めなかった。

本研究を進める過程で、アテローム性動脈硬化に対し、制御性 **T** 細胞が抑制的に作用 (**Lekie A et al. Scand J Immunology. 2017**) あるいは脳血管内皮細胞に保護的に作用 (**Mao L et al. Brain. 2017**) する可能性を示す報告がなされたことに基づき、急性期の患者リンパ球の表面抗原解析を試みた。アテローム血栓性梗塞、ラクナ梗塞、心原性塞栓症いづれも、グループ内でのばらつきが大きく、病型毎の傾向は認められなかった。

血清中のライソゾーム水解酵素活性については、 α - & β -**galactosidase**、 β -**glucosidase**、 β -**hexosaminidase** とともに、アテローム血栓性梗塞、ラクナ梗塞、心原性塞栓症の **3** 病型間では有意差を認めなかった。但し他の病型 (**branch atheromatous disease**、**Trousseau** 症候群、その他の病因不明の塞栓症など) を含む解析において、**Trousseau** 症候群では心原性塞栓症に比し α -**galactosidase**、 β -**galactosidase** の両者の活性が低い傾向がみられた。また、この研究期間中に当研究室で **Trousseau** 症候群の診断・予後予測における重要性を明らかにした分子である **D-dimer** について、患者の β -**galactosidase** 活性と **D-dimer** 値に逆相関がみられた。多発/単発梗塞、梗塞巣のサイズとこれらのライソゾーム水解酵素活性との相関は認めなかった。

急性期脳梗塞においては病型のみならず、発症からの時間、梗塞巣のサイズ、陳旧性梗塞の有無、基礎疾患や内服中の薬剤、肺炎など感染症の合併の有無など、病態を左右するパラメーターが非常に多く、実験結果がこれらに左右され、有効な解析が非常に困難であった。また病状が安定する回復期～慢性期の患者の解析については、退院あるいは回復期リハ病院転院時期が早まっており、検体の収集が困難であった。

分子レベル、動物モデルにおける既報告や、共同研究者の武藤が現在進めている神経変性疾患におけるリポドミクス解析の結果からは、糖脂質解析は炎症関連分子とのクロストークを司る重要な分子として、今後脳梗塞においても病態解析・制御における有用なツールとなりうると思われ、今後は解析項目・方法をブラッシュアップし、関連施設を含む症例を蓄積し、研究を進める方針である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Niimi Yoshiki, Ito Shinji, Mizutani Yasuaki, Murate Kenichiro, Shima Sayuri, Ueda Akihiro, Satake Wataru, Hattori Nobutaka, Toda Tatsushi, Mutoh Tatsuro	4. 巻 61
2. 論文標題 Altered regulation of serum lysosomal acid hydrolase activities in Parkinson's disease: A potential peripheral biomarker?	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Parkinsonism & Related Disorders	6. 最初と最後の頁 132 ~ 137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parkreldis.2018.10.032	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 Ito Shinji, Kikuchi Koichi, Ueda Akihiro, Nagao Ryunosuke, Maeda Toshiki, Murate Kenichiro, Shima Sayuri, Mizutani Yasuaki, Niimi Yoshiki, Mutoh Tatsuro	4. 巻 9
2. 論文標題 Changes in Serial D-Dimer Levels Predict the Prognoses of Trousseau's Syndrome Patients	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Neurology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fneur.2018.00528	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yoshiki Niimi, Toshiki Maeda, Kouichi Kikuchi, Ryunosuke Nagao, Kenichiro Murate, Seiko Hirota, Chika Hikichi, Tomomasa Ishikawa, Yasuaki Mizutani, Sayuri Shima, Akihiro Ueda, Shinji Ito, Wataru Satake, Nobutaka Hattori, Tatsushi Toda and Tatsuro Mutoh.
2. 発表標題 Altered regulation of serum lysosomal hydrolase activity in Parkinson's disease.
3. 学会等名 第59回日本神経学会学術集会
4. 発表年 2018年 ~ 2019年

〔図書〕 計0件

〔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
研究分担者	武藤 多津郎 (Mutoh Tatsuro) (60190857)	藤田医科大学・医学部・教授 (33916)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------