

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08994

研究課題名(和文)脳虚血再灌流障害におけるATMキナーゼ経路の役割解明と新たな脳梗塞治療への応用

研究課題名(英文)Elucidation of the role of ATM kinase pathway in cerebral ischemia-reperfusion injury and its application to new cerebral infarction therapy

研究代表者

細田 弘吉 (Hosoda, Kohkichi)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：90403261

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ラット中大脳動脈閉塞モデルを用いて脳虚血再灌流、heat shock protein 27 (HSP27)リン酸化亢進、G6PD活性亢進を確認し、ATMキナーゼによるHSP27リン酸化を介して活性酸素種に対処するという内因性抗酸化システムの存在が示された。次に、HSP27誘導薬のGGAをratに脳室内投与し虚血再灌流モデルを作成し神経保護作用を調べた。GGAの投与は虚血のみよりもHSP27リン酸化やG6PD活性を増加させ酸化ストレスの指標となるカルボニル化蛋白及び脳梗塞体積を有意に減少させた。GGAが虚血再灌流障害治療に応用できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者らはオミクス手法による包括的解析により、脳虚血再灌流時のATMKからHSP27リン酸化を介したG6PD活性化という内因性抗酸化機構とMAPK経路の亢進を見出した。オミクスによる脳虚血再灌流障害の包括的解析に基づいて特定したATMKの下流経路を新たな脳梗塞治療の標的としたことが本研究の特色であり、この点に着目した研究は国際的に見てもほとんど行われていないのが現状である。ATMKの下流経路は短期的ならびに長期的に神経組織に影響を与えるため脳梗塞治療の時間軸を広げる可能性がある点も重要である。

研究成果の概要(英文)：Using a rat middle cerebral artery occlusion model, we confirmed that cerebral ischemia-reperfusion increased heat shock protein 27 (HSP27) phosphorylation, increased G6PD activity, increased NADPH/NADP+ ratio during cerebral ischemia-reperfusion, indicating the existence of an endogenous antioxidant system that deals with reactive oxygen species via HSP27 phosphorylation by Ataxia telangiectasia mutated(ATM) kinase (HSP27 phosphatase). Next, we investigated the neuroprotective effects of Geranylgeranylacetone (GGA), an HSP27 inducer, in rat ischemia-reperfusion model by intracerebroventricular administration of GGA. The results suggest that GGA may be applicable to the treatment of ischemia-reperfusion injury.

研究分野：脳神経外科

キーワード：脳虚血 メタボロミクス ペントースリン酸 熱ショック蛋白 虚血再灌流障害

## 1. 研究開始当初の背景

最近、脳梗塞に対して、血栓溶解療法や機械的血栓除去療法が確立されてきたが、発症後8時間以内の適応制限のため未だ3-5%程度の患者が恩恵に預かるに過ぎない。より長い適応時間を有する新たな治療法の開発が喫緊の課題であり、その為には脳梗塞の病態解明は極めて重要である。

近年のオミクス手法の発達により、低分子代謝物の変化や組織中の遺伝子発現の変化を網羅的に調べることが可能となった。脳梗塞の病態解明においてオミクスによる包括的解析は多くの代謝物の変化から脳虚血に特異的なものを見出す非常に有効な手段と考えられるが、そのような研究は本手法の新しさから未だ少ない。

このような背景のもと、申請者は、メタボローム解析やトランスクリプトーム解析を用いて脳虚血の際に特異的に変化する代謝経路を網羅的に探索し、ATMKによるHSP27リン酸化を介してのglucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD)活性亢進、即ちペントースリン酸経路(PPP)の亢進がNADPHを増加させ、脳虚血時の内因性抗酸化機構として働いていることや、MAPK経路が活性化していることを見出し、報告してきた。

ATMKは、DNA損傷応答における中心的なタンパク質であり、DNA損傷応答下流シグナルとしてはヒストンH2AXやp53のリン酸化がよく知られている。しかし、最近、reactive oxygen species (ROS)の直接的酸化によりATMKが活性化されるという報告がなされた。酸化ストレスに対してATMKが関与する反応の下流は主として、炭水化物代謝を解糖系からPPPにシフトさせPPPを亢進させる経路、c-jun N-terminal kinase (JNK)亢進やextracellular signal-regulated protein kinase 1 and 2 (ERK1/2)抑制などのMAPK経路、liver kinase B1 (LKB1)からtuberous sclerosis complex (TSC) 2を経てmechanistic target of rapamycin (mTOR)を抑制しミトコンドリアの活動抑制に至る経路、の3つの経路から成る。申請者の見出した脳虚血再灌流の際のATMKによるHSP27リン酸化亢進は、まさに虚血再灌流による酸化ストレスにより活性化されたATMK下流の炭水化物代謝における内因性抗酸化機構のひとつと考えられる。このようにATMKの下流経路は脳梗塞の新たな治療ターゲットとしてその病態生理学的な役割解明が待たれるところである。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、HSP27誘導及びHSP27リン酸化の脳虚血再灌流障害に対する保護効果の検証、ATMKからHSP27リン酸化に至る経路の脳虚血再灌流障害における役割解明、脳虚血再灌流障害の際のATMKからMAPKに至る経路の役割の解明、脳虚血再灌流障害の際のATMKからmTORに至る経路の役割の解明、以上の結果をもとに新たな脳梗塞治療薬の開発を目指す、の5つである。

## 3. 研究の方法

### I. HSP27誘導及びHSP27リン酸化の脳虚血再灌流障害に対する保護効果の検証

#### (1)ラット中大脳動脈閉塞モデルの作成

麻酔下にWistar rat (220-260 g)の内頸動脈からnylon糸を挿入、中大脳動脈を一定時間(1時間、2時間など)閉塞後に再灌流(1~48時間)して脳梗塞を作成し、経時的に大脳皮質の虚血部位を採取する。対照群は中大脳動脈閉塞以外は同じ処置を行う。

#### (2)脳室穿刺による薬剤の注入

麻酔下にラットを定位脳手術装置に固定し、解剖アトラスに基づいて側脳室を穿刺、薬剤を注入した後、上述の如く中大脳動脈閉塞モデルを作成し虚血脳組織サンプルを採取して、薬剤の脳梗塞への影響を検証する。

#### (3)虚血脳組織のメタボローム解析

虚血脳組織から水溶性代謝物・脂溶性代謝物を抽出し、ガスクロマトグラフ質量分析装置(GC-MS)によりメタボローム解析を行う。

#### (4)HSP27誘導薬の効果の検証

上述の脳室穿刺により、HSP27の誘導薬(geranylgeranylacetoneなど)を脳室内投与した後、虚血後再灌流モデルを作製し、GC-MSによりメタボローム解析を行うとともに、HSP27、リン酸化HSP27やG6PDの発現をRT-PCR法と免疫プロットを用いて調べる。さらにG6PDの活性測定、NADPH、dihydroethidiumによるROSの測定を実施するとともに、虚血後再灌流による神経症候の軽減や脳梗塞サイズの縮小の有無をしらべる。

### II. 脳虚血再灌流時のATMK下流におけるHSP27リン酸化機構の詳細を解明

#### (1)DNA損傷応答におけるATMK下流シグナル関与の有無の検証

DNA損傷応答におけるATMKの下流シグナルとしてp53とヒストンH2AXのリン酸化による活性化が知られている。虚血後再灌流モデルを作製し、これらのリン酸化の有無を免疫プロットや免疫染色で調べ、DNA損傷応答経路関与の有無を検証する。

#### (2)脳虚血再灌流におけるATMK下流経路の酵素の関与の検証

ATMK 下流経路のうち、HSP27 をリン酸化することが知られているのは p38 MAPK, MAPKAPK2 の経路であり、これらの阻害薬 (SB203580, sc-3091 など) を脳室内注入した中大脳動脈閉塞モデルで、メタボローム解析にて包括的代謝変化を調べるとともに、HSP27, リン酸化 HSP27 の発現を RT-PCR 法と免疫プロットを用いて調べる。さらに G6PD の活性測定, NADPH, 虚血後再灌流による神経症候の軽減や脳梗塞サイズの縮小の有無を調べ、この経路の関与の有無を検証する。

#### III. 頸動脈プラークの脆弱性と小胞体ストレス応答の関連性を探求

COVID-19 が猖獗を極め本来予定していた実験が困難となったために、隔離下でも実行が容易な実験系として脳梗塞を来す脆弱プラークの形成・破綻の機構を解明するために小胞体ストレスマーカーを用いて頸動脈狭窄症患者の頸動脈プラークを用いて免疫組織学的実験を行った。

## 4. 研究成果

### I. ラット中大脳動脈閉塞モデルを用いた虚血再灌流時の脳組織における代謝変化と geranylgeranylacetone の効果

ラット中大脳動脈閉塞モデルを用いて、脳虚血再灌流時の脳組織をガスクロマトグラフ質量分析装置(GC-MS)により網羅的に分析しメタボローム解析を行った。この結果を経路活性プロファイリングにより分析すると、代謝状態の変化は再灌流時間に依存し、137 の代謝経路のうちペントースリン酸経路とタウリン-ヒポタウリン代謝経路が再灌流と最も強く関連していることが示された。

RT-PCR では、geranylgeranylacetone は虚血再灌流後の HSP27 転写レベルの上昇に有意な影響を与えないことが示された。

immunoblotting では、HSP27 の誘導薬である geranylgeranylacetone は、HSP27 タンパク質レベルの上昇に有意な影響を及ぼさなかったことが示された。しかし、geranylgeranylacetone は、虚血再灌流後の HSP27 のリン酸化の上昇を有意に増加させた。また、geranylgeranylacetone は、虚血再灌流後の G6PD 活性の上昇を有意に抑制し、タンパク質のカルボニル化の上昇を抑制した。したがって、geranylgeranylacetone は、梗塞サイズを有意に縮小した。

これらの知見は、geranylgeranylacetone が虚血性脳卒中の治療薬として有望であることを示唆しており、さらなる研究の価値があると思われる。

以上の結果をまとめ、論文として報告した(BMC Neurosci (2021) 22:9)。

### II. 頸動脈プラークの脆弱性と小胞体ストレス応答の関連性

11 年間に頸動脈内膜剥離術を施行した 193 人の患者の頸動脈プラークが対象。臨床的不安定性の順に cTIA/SIE 群 (crescend TIA + Stroke in evolution) 群 7, それ以外の症候群 80, 無症候群 106 の 3 群に分類した。

小胞体ストレスマーカー( GRP78, CHOP )発現細胞数はプラークの不安定性と有意な相関あり。二重蛍光染色では CD68 陽性細胞(マクロファージ)と平滑筋アクチン(SMA)陽性細胞に小胞体ストレスマーカーが検出され共発現率は臨床的不安定性と有意な相関あり。しかし CHOP と cleaved caspase-3(アポトーシスマーカー)の共局在は不安定性と相関なく CHOP 発現により即アポトーシスとなることが示唆された。CHOP 発現がアポトーシスと直結しており proapoptotic CHOP 経路が将来の治療標的となり得る。

これらの結果をまとめ、論文として報告した(Transl Stroke Res, 13(3):420-431, 2022.)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 Hosoda Kohkichi, Imahori Taichiro, Tanaka Kazuhiro, Uno Takiko, Nakai Tomoaki, Kohta Masaaki, Fujita Atsushi, Sasayama Takashi	4. 巻 13
2. 論文標題 Contribution of Endoplasmic Reticulum Stress to the Clinical Instability of Carotid Plaques in Human Carotid Stenosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Translational Stroke Research	6. 最初と最後の頁 420 ~ 431
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12975-021-00968-4	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 Matsuo, Kazuya and Hosoda, Kohkichi and Tanaka, Jun and Yamamoto, Yusuke and Imahori, Taichiro and Nakai, Tomoaki and Irino, Yasuhiro and Shinohara, Masakazu and Sasayama, Takashi and Kohmura, Eiji	4. 巻 22
2. 論文標題 Geranylgeranylacetone attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury in rats through the augmentation of HSP 27 phosphorylation: a preliminary study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Neuroscience	6. 最初と最後の頁 9-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12868-021-00614-7	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 Tanaka Jun, Hosoda Kohkichi, Matsuo Kazuya, Kyotani Katsusuke, Takemoto Youta, Yamamoto Yusuke, Fujita Atsushi, Kohta Masaaki, Kimura Hidehito, Sasayama Takashi, Kohmura Eiji	4. 巻 130
2. 論文標題 Pencil Beam Presaturation Magnetic Resonance Imaging Helps to Identify Patients at Risk for Intolerance to Temporary Internal Carotid Artery Occlusion During Carotid Endarterectomy and Carotid Artery Stenting	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 World Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 e899 ~ e907
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.wneu.2019.07.033	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12件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Kohkichi Hosoda, Atsushi Fujita, Masaaki Kohta, Hidehito Kimura, Kazuya Matsuo, Taichiro Imahori, Tomoaki Nakai, Yoichi Uozumi, Eiji Kohmura.
2. 発表標題 Characteristics and Surgical Outcome of Patients with Carotid Stenosis Resistant to Medical Therapy.
3. 学会等名 International Stroke Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 細田弘吉 中井友昭 今堀太一郎 山本祐輔 田中潤 松尾和哉 甲田将章 藤田敦史 田中一寛 篠山隆司 甲村英二
2. 発表標題 脳虚血再灌流障害におけるオミクス解析
3. 学会等名 日本脳神経外科学会 第80回学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 細田弘吉, 中井友昭, 今堀太一郎, 山本祐輔, 田中潤, 松尾和哉, 甲田将章, 藤田敦史, 田中一寛, 篠山隆司, 甲村英二
2. 発表標題 脳虚血再灌流障害のオミクス解析
3. 学会等名 第46回日本脳卒中学会学術集会 2021年3月13日 福岡国際会議場 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 3. Matsuo K, Hosoda K, Tanaka J, Yamamoto Y, Imahori T, Nakai T, Irino Y, Shinohara M, Sasayama T, Kohmura E
2. 発表標題 Phosphorylation of Heat Shock Protein 27 Leads to Activation of Pentose Phosphate Pathway and Protection from Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury
3. 学会等名 Brain & Brain PET 2019, Yokohama (Japan) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 7. 松尾和哉, 細田弘吉, 田中潤, 山本祐輔, 今堀太一郎, 中井友昭, 入野康宏, 篠原正和, 篠山隆司, 甲村英二.
2. 発表標題 Heat shock protein 27リン酸化誘導による脳虚血再灌流時の神経保護:オミクス研究 から臨床応用へ
3. 学会等名 第20回日本分子脳神経外科学会 2019年8月9日 秋葉原コンベンションホール(東京)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 9. 松尾和哉, 細田弘吉, 田中潤, 山本祐輔, 今堀太一郎, 中井友昭, 入野康宏, 篠原正和, 篠山隆司, 甲村英二.
2. 発表標題 脳虚血再灌流障害に対する Heat shock protein 27リン酸化誘導による神経保護治療:メタボロミクス研究から治療応用へ.
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第78回学術総会 2019年10月9日 大阪国際会議場(グランキューブ大阪)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 13. 松尾和哉, 細田弘吉, 田中潤, 山本祐輔, 今堀太一郎, 中井友昭, 入野康宏, 篠原正和, 篠山隆司, 甲村英二.
2. 発表標題 脳虚血再灌流障害に対する Heat shock protein 27リン酸化誘導による神経保護治療:オミクス研究から治療へ. 特別シンポジウム1『時間で追う脳虚血の病態と治療:1急性期』
3. 学会等名 第62回日本脳循環代謝学会学術集会2019年11月29日 江陽グランドホテル(仙台)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuya Matsuo, Kohkichi Hosoda, Jun Tanaka, Yusuke Yamamoto, Taichiro Imahori, Tomoaki Nakai, Yasuhiro Irino, Masakazu Shinohara, Takashi Sasayama, Eiji Kohmura
2. 発表標題 Activate the Pentose Phosphate Pathway to Reduce the Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury: The Impact of Heat Shock Protein 27 Phosphorylation
3. 学会等名 International Stroke Conference 2019(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松尾和哉、細田弘吉、田中 潤、山本祐輔、今堀太一郎、中井友昭、入野康宏、 篠原正和、篠山隆司、甲村英二
2. 発表標題 虚血後再灌流による脳皮質でのペントースリン酸経路の賦活化 -オミクス解析による分析とHeat shock protein 27の関与-
3. 学会等名 第19回日本分子脳神経外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松尾和哉、細田弘吉、田中 潤、山本祐輔、今堀太一郎、中井友昭、入野康宏、 篠原正和、篠山隆司、甲村英二
2. 発表標題 虚血再灌流による脳皮質でのペントースリン酸経路 の賦活化 オミクス解析による分析と Heat shock protein 27 の役割
3. 学会等名 日本脳神経外科学会 第77回学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松尾和哉、細田弘吉、田中 潤、山本祐輔、今堀太一郎、中井友昭、入野康宏、 篠原正和、篠山隆司、甲村英二
2. 発表標題 虚血再灌流による脳皮質ペントースリン酸経路の亢進 オミクス研究を基に探るHeat shock protein 27 の役割
3. 学会等名 第62回日本脳循環代謝学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松尾和哉、細田弘吉、田中 潤、山本祐輔、今堀太一郎、中井友昭、入野康宏、 篠原正和、篠山隆司、甲村英二
2. 発表標題 虚血再灌流時のHeat shock protein 27リン酸化によるペントースリン酸経路亢進: オミクス研究から治療応用へ
3. 学会等名 第44回日本脳卒中学会学術集会
4. 発表年 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	篠山 隆司  (Sasayama Takashi)  (10379399)	神戸大学・医学部附属病院・教授   (14501)	
研究分担者	甲村 英二  (Komura Eiji)  (30225388)	神戸大学・医学研究科・名誉教授   (14501)	
研究分担者	篠原 正和  (Shinohara Masakazu)  (80437483)	神戸大学・医学研究科・准教授   (14501)	

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
---------	---------