

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16588

研究課題名(和文)ペリサイトを標的としたナノカプセルによる脳梗塞新規治療の開発

研究課題名(英文)Novel therapy for ischemic stroke with nanoparticle targeting pericytes

研究代表者

有村 公一(Arimura, Koichi)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：00638025

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：PDGF-B結合ナノ粒子(PDGF-B NP)を作成し脳梗塞における治療効果について検討した。マウス一過性中大脳動脈閉塞モデルにおいて、脳梗塞作成24時間後にPDGF-B NPを尾静脈より経静脈的投与すると、コントロール群と比較して3,7日後で脳梗塞巣の有意な縮小を認めた。またシリンダーテストでも神経機能の改善を認めた。免疫染色・ウエスタンブロットでPDGF-B NPにより脳梗塞でAktのリン酸化が増強されていた。各細胞マーカーとの二重染色で、特にペリサイトにおいてAktリン酸化が増強されており、梗塞巣改善に寄与していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳梗塞に対する治療はtPA静注療法や血管内治療による急性再開通療法が行われているが、time windowが狭く適用できる患者の割合は多くないため、より多くの脳梗塞患者に施行できる新規治療の開発が望まれている。本研究ではPDGF-B NPによりペリサイトにおけるAktリン酸化が賦活され、脳梗塞改善に寄与している可能性が明らかになった。このPDGF-B NPは容易に作成でき、また24時間後投与で効果を発揮することから、急性再開通療法が適用できない場合も含めた多くの脳梗塞患者の新たな治療法となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We investigated the treatment effect of PDGF-B conjugated nanoparticle (PDGF-B NP) for ischemic stroke. Infarction volume was significantly decreased with intravenous administration of PDGF-B NP via tail vein 24 hours after transient middle cerebral artery occlusion in a mouse model. It has been revealed that neurological function was improved with PDGF-B NP with cylinder test. Immunostaining and Western blot analysis showed that PDGF-B NP enhanced Akt phosphorylation in infarction area, especially in pericytes. In conclusion, phosphorylation of Akt in pericytes in infarction area by PDGF-B NP may contribute to the decrease of infarction volume and improvement of neurological function.

研究分野：脳神経外科

キーワード：脳梗塞 ナノ粒子 ペリサイト PDGF-B

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳卒中のうち最も大きな割合を占める脳梗塞に対する治療においては血栓溶解療法や血管内治療がめざましく発展しているが、これらは時間的制約が厳しく新規治療の開発が望まれている。我々はこれまでにneurovascular unit構成細胞の一つであるペリサイトに注目し研究を行っており、脳梗塞においてペリサイトがPDGF-Bシグナルを介して神経保護作用、創傷治癒作用、酸化ストレス制御に深く関わっていることを明らかにし、さらにペリサイトが脳梗塞発症後急性期から慢性期にわたって持続的に活性化されていることを明らかにしてきた。そこで脳梗塞巣におけるペリサイトを効率的に活性化させる手段としてPDGF-BBを内包したナノ粒子を用いたdrug delivery systemに着目し、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

PDGF-BB 内包ナノ粒子を用いて、ペリサイトを標的とした therapeutic time window の広い脳梗塞新規治療を開発する。

3. 研究の方法

Small heat shock protein 16.5 を用いたナノ粒子を作成し、標的蛋白 (PDGF-BB) をリンカーを介して化学的に conjugate した。細胞実験には市販されている正常成人ヒト脳ペリサイトを使用した。動物モデルは CB-17 系統マウスの一過性中大脳動脈閉塞モデルを用いた。7~19 週齢、体重 25~30 g の雄マウスを使用し、左側頭骨にマイクロドリルで穴を穿ち中大脳動脈を露出して、6-0 ナイロン糸を用いて 2 時間閉塞し脳梗塞を完成させた。

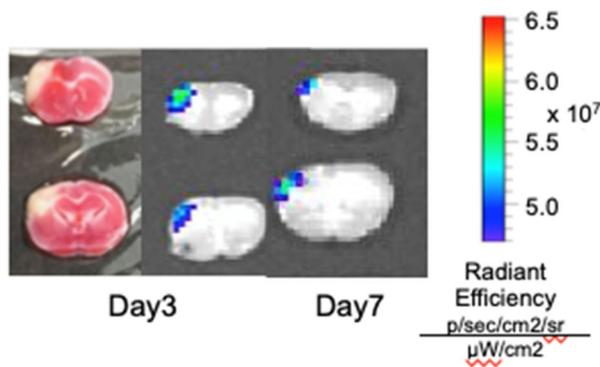
脳梗塞は MRI および TTC・MAP2 染色で確認し、神経機能評価にはシリンダーテストを用いて、ビデオ撮影にて 20 セットの運動を計測した。また免疫染色やウエスタンブロットにより、脳梗塞改善の詳細なメカニズムを検討した。

4. 研究成果

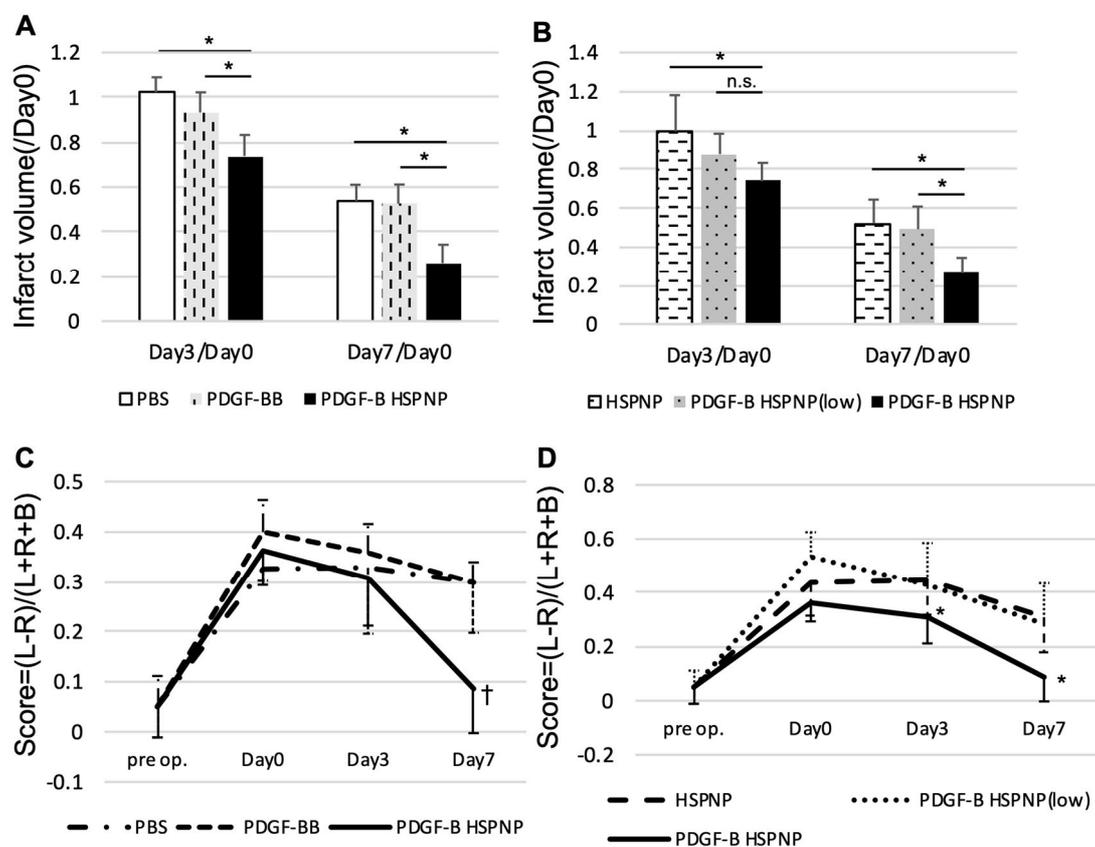
まずナノ粒子の梗塞巣への分布を検討した。ナノ粒子に Alexa488 を結合させ蛍光標識して脳梗塞マウスの尾静脈より経静脈的に投与し in vivo imaging system により評価したところ、脳梗塞 3 日後に梗塞巣への特異的な分布を認め、脳梗塞 7 日後にも梗塞巣にナノ粒子の集積残存が確認された (図 1)。

ナノ粒子に PDGF-BB を結合させて培養ヒトペリサイトに反応させたところ、Akt のリン酸化が認められた。PDGF-B 結合ナノ粒子 (PDGF-B NP) を脳梗塞作成 24 時間後にマウスに経静脈的に投与したところ、野生型ナノ粒子 (wNP) や PDGF-BB を直接尾静脈より投与した群と比較して PDGF-B NP 群で、3 日後・7 日後ともに脳梗塞巣の縮小が認められた。またシリンダーテストで神経機能を評価すると、PDGF-B NP 群で麻痺の有意な改善を認めた (図 2)。

PDGF-B NP による脳梗塞改善効果のメカニズムについて調べたところ、免疫染色で脳梗塞コア領域ならびに脳梗塞周辺領域において投与 3 日後に有意な Akt リン酸化を認めた (図 3)。梗塞巣の組織を lysate して Western blot により解析しても同様の結果であった。内皮細胞・ペリサイト・アストロサイト・ニューロンのそれぞれの細胞マーカーを用いて二重染色により Akt がリン酸化されている細胞を検討したところ、ペリサイトにて Akt リン酸化が多いことが判明した。以上の結果より脳梗塞において PDGF-B NP によりペリサイトの Akt リン酸化が増強され梗塞巣の縮小につながっている可能性が示唆された。



(図1) ナノ粒子の脳梗塞巣への分布

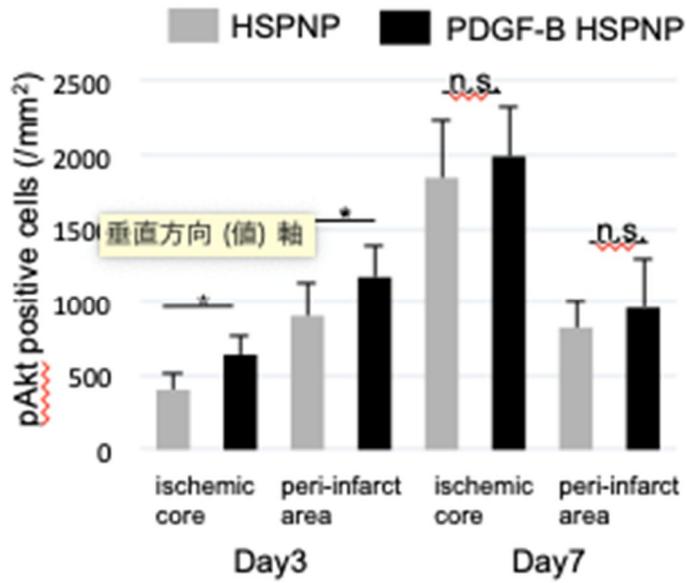


(図2) PDGF-B 結合ナノ粒子による脳梗塞巣体積評価 (MRI) および神経機能評価 (シリンダーテスト)

- A : PDGF-B 結合ナノ粒子投与群と PDGF-BB 経静脈的投与群、PBS 投与群との脳梗塞体積比較。
 PBS : PBS のみを経静脈的投与した群、PDGF-BB : PDGF-BB を直接経静脈的投与した群、PDGF-B HSPNP : PDGF-BB 1.04 $\mu\text{mol/L}$ を結合した heat shock protein nanoparticle 群
- B : PDGF-B 結合ナノ粒子高用量・低用量投与群と野生型ナノ粒子投与群の脳梗塞体積比較。
 HSPNP : 野生型ナノ粒子群、PDGF-B HSPNP (low) : PDGF-BB 0.104 $\mu\text{mol/L}$ を結合したナノ粒子群、PDGF-B HSPNP : PDGF-BB 1.04 $\mu\text{mol/L}$ を結合したナノ粒子群
- C : PDGF-B 結合ナノ粒子投与群と PDGF-BB 経静脈的投与群、PBS 投与群との神経機能比較。
 PBS : PBS のみを経静脈的投与した群、PDGF-BB : PDGF-BB を直接経静脈的投与した群、PDGF-B HSPNP : PDGF-BB 1.04 $\mu\text{mol/L}$ を結合した heat shock protein nanoparticle 群

D : PDGF-B 結合ナノ粒子高用量・低用量投与群と野生型ナノ粒子投与群の神経機能比較。

HSPNP : 野生型ナノ粒子群、PDGF-B HSPNP (low) : PDGF-BB 0.104 $\mu\text{mol/L}$ を結合したナノ粒子群、PDGF-B HSPNP : PDGF-BB 1.04 $\mu\text{mol/L}$ を結合したナノ粒子群



(図 3) 脳梗塞巣における Akt リン酸化陽性細胞数

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 高岸創、有村公一、榎原佐由子、村田正治、飯原弘二 |
| 2. 発表標題 ナノ粒子を用いた脳梗塞に対する新規治療法の探索 |
| 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 |

| |
|-----------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 高岸 創、有村 公一、岩城 克馬、西村 中、榎原 佐由子、村田 正治、飯原 弘二 |
| 2. 発表標題 PDGF-Bナノ粒子を用いた急性期後脳梗塞の新規治療 |
| 3. 学会等名 一般社団法人日本脳神経外科学会第78回学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|-----------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 高岸 創、有村 公一、岩城 克馬、西村 中、榎原 佐由子、村田 正治、飯原 弘二 |
| 2. 発表標題 PDGF-Bナノ粒子を用いた急性期後脳梗塞の新規治療 |
| 3. 学会等名 第62回日本脳循環代謝学会学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 Soh Takagishi, Koichi Arimura, Katsuma Iwaki, Ataru Nishimura, Sayoko Narahara, Masaharu Murata, Koji Iihara |
| 2. 発表標題 Novel therapy with PDGF-B nanoparticles for cerebral infarction |
| 3. 学会等名 International stroke conference 2020 (国際学会) |
| 4. 発表年 2020年 |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

| | | |
|-------------------------------|---------------------------------|---------------|
| 産業財産権の名称 脳梗塞治療用組成物 | 発明者 村田正治、有村公一、高岸創、榎原佐由子、飯原弘二 | 権利者 同左 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、2020-074179 | 出願年 2020年 | 国内・外国の別 国内 |

〔取得〕 計0件

〔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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|