

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09472

研究課題名(和文) 抗酸化作用を付与した人工酸素運搬体による脳梗塞治療法の開発

研究課題名(英文) Development of neuroprotective therapy by artificial oxygen carrier with antioxidant function

研究代表者

鏡谷 武雄 (Abumiya, Takeo)

北海道大学・医学研究院・客員研究員

研究者番号：80270726

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：異なる形態の抗酸化付加工酸素運搬体、(1)白金ナノ粒子(PtNP)とHemoActの結合体：PtNP-HemoAct、(2)Catalaseとアルブミンを結合したCluster(C-Act)とHemoActの混合物：C-Act+HemoAct、(3)抗酸化剤EdaravoneとHemoActの混合物：Edaravone+HemoAct、(4)ヘモグロビンを球状に重合させた表面にアルブミンを結合したHemoglobin nanoparticle:HbNPを用い、脳保護効果を比較した。ラット虚血再灌流モデルで各薬剤を投与し、脳梗塞体積は治療群で縮小傾向を認め、HbNPで最も縮小していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦においても脳主幹動脈閉塞による脳虚血状態に対して、血栓回収療法が標準療法として確立しつつある。再開通により予後良好となる症例が増えているが、治療例の中には再開通が得られても虚血再灌流傷害のために再梗塞化、脳浮腫/出血性梗塞を来し、予後不良となる場合もある。このような状況を打破するために脳保護療法は重要な手立てとなりうる。人工酸素運搬体に抗酸化作用を付加した今回の治療薬は、脳梗塞に対してより強力な保護効果をもたらす可能性を期待させるものとなった。

研究成果の概要(英文)：Different forms of artificial oxygen carriers with antioxidant function, (1) complex of platinum nanoparticle (Pt-NP) and HemoAct: PtNP-HemoAct, (2) mixture of complex cluster of catalase and albumin (C-Act) and HemoAct: C-Act+HemoAct, (3) mixture of antioxidant drug Edaravone and HemoAct: Edaravone+HemoAct, and (4) spherically polymerized hemoglobin particles covered with albumin, Hemoglobin nanoparticle, were used to compare neuroprotective effects. We administrated these drugs in rat ischemia/reperfusion model and compared infarction volumes. Treatment groups had a tendency of showing smaller infarction volumes and HbNP group showed the smallest volume.

研究分野：脳神経外科

キーワード：人工酸素運搬体 虚血再灌流傷害 脳梗塞 抗酸化物質 脳保護作用

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

本邦においても脳主幹動脈閉塞による脳虚血状態に対して、血栓回収療法が標準療法として確立しつつあり、再開通により予後良好となる症例が増えている。しかしその一方、治療例の中には再開通が得られても虚血再灌流傷害のため、虚血の再燃化、脳浮腫、出血性梗塞を引き起こし、予後悪化を示す症例が少なからず存在する。虚血の再燃化は微小血管の灌流障害により引き起こされる 2 次的な虚血であり、再灌流の早期に微小血管周囲を取り囲んでいるアストロサイト終足の膨化が生じ、その結果として、微小血管の狭小化が起き、微小血管内での赤血球の通過が滞り、微小血管循環不全による虚血の再燃が生じる可能性が報告されている (図 1)。

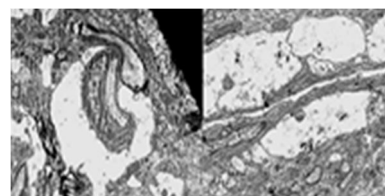


図 1 狭小化が生じた微小血管

赤血球より粒径の小さい人工酸素運搬体は、赤血球の通過障害を来すような狭小化した微小血管において、良好な灌流を維持し酸素を運搬することが期待される。我々も先行研究でヘモグロビンとアルブミンの重合体である人工酸素運搬体 HemoAct を用い、ラット虚血再灌流モデルにおいて神経症状の改善、梗塞の縮小化に寄与することを明らかにしてきた。HemoAct はこの良好な酸素運搬能の他に、重合しているアルブミンにより抗酸化作用も発揮することが培養血管内皮細胞を用いた実験では明らかになっている。しかし、アルブミンはもとより血中に存在する蛋白であり、抗酸化作用の追加はあると思われるが、大きな抗酸化作用は望めない可能性がある。そこで、抗酸化作用を増強させることで治療効果を高められるか検討することは大きな意義があると考えられた。

2. 研究の目的

前述のようにアルブミン由来の抗酸化作用を併せ持つ HemoAct ではあるが、本研究では抗酸化作用をさらに強化した製剤に深化させ、高い酸素運搬能を維持したまま、より強力な脳保護効果を持つ薬剤となるかを検証することを目的とする。今回は、白金ナノ粒子 (PtNP)、カタラーゼといった抗酸化物質を結合あるいは共存させた 2 製剤を当初作成して実験の準備をした。その後、ヘモグロビンを球状に重合させた粒子の表面にアルブミンを結合して作成した 90nm の粒径を有しカタラーゼの抗酸化能を保持している新規の人工酸素運搬体である Hemoglobin nanoparticle : HbNP が開発され、実験に使用できる状態となったため、この製剤も用いて最も脳保護効果を発揮する製剤を用いて、その保護効果の全容を明らかにしたいと考えている。

3. 研究の方法

予備実験として、異なる形態の抗酸化付加人工酸素運搬体の 4 候補、(1)白金ナノ粒子 (PtNP) を HemoAct に結合させたもの : HemoAct - PtNP、(2) Catalase にアルブミンを 4 つ結合させた Catalase - Albumin Cluster (C - Act) と HemoAct を混合したもの : HemoAct + C - Act、(3)抗酸化剤として既に市販されている Edaravone と HemoAct を混合したもの : HemoAct + Edaravone、(4)ヘモグロビンを球状に重合させた粒子の表面にアルブミンを結合して作成した 90nm の粒径を有しカタラーゼの抗酸化能を保持している新規の人工酸素運搬体である Hemoglobin nanoparticle : HbNP を用いて検討する。これら 4 群と HemoAct 単体、溶媒 PBS のみ (未治療コントロール) の 2 群も含めて、脳保護効果を比較する (図 2)。

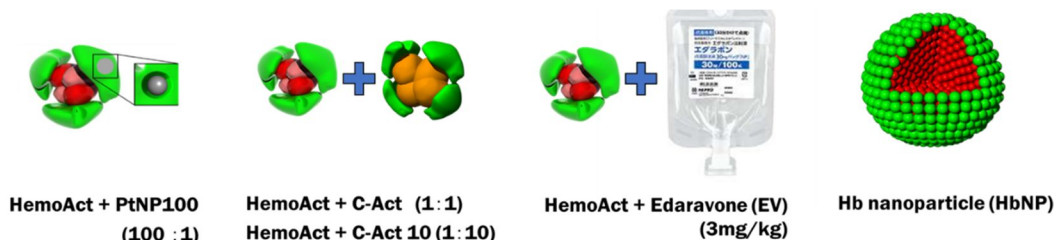


図 2 各製剤の構造模式図

この中で最も保護効果の強い製剤を選んで、n 数を増やして本実験を行う。本実験では、再灌流 24 時間後の神経症状の改善度、梗塞/浮腫体積の縮小効果をまず検討する。さらに、病理組織学的検討により、虚血再灌流傷害で見られる炎症反応、血管構造/機能障害を検討するため、摘出した脳組織より蛋白を抽出して Western blotting を、またパラフィン切片を作成して免疫染色を施行する。検討する分子は myeloperoxidase (白血球浸潤)、MMP-9 (炎症/血管)、ICAM-1 (炎症/血管)、IgG (血漿漏出)、等で、炎症、血管障害がどの程度抑制されているか検討する。また、活性酸素産生とその消去効果についての検討として、前述の抽出蛋白、パラフィン切片を使って、活性酸素産生のマーカーである 80HdG、4-HNE の Western blotting もしくは免疫染色を行って、

活性酸素産生状態を評価し、各製剤投与による活性酸素消去効果について比較する。

4. 研究成果

予備実験において、脳梗塞体積は HemoAct 単体を含め、治療群はコントロール群と比較して縮小傾向を認めたが、特に HbNP において梗塞体積が最も縮小していた。

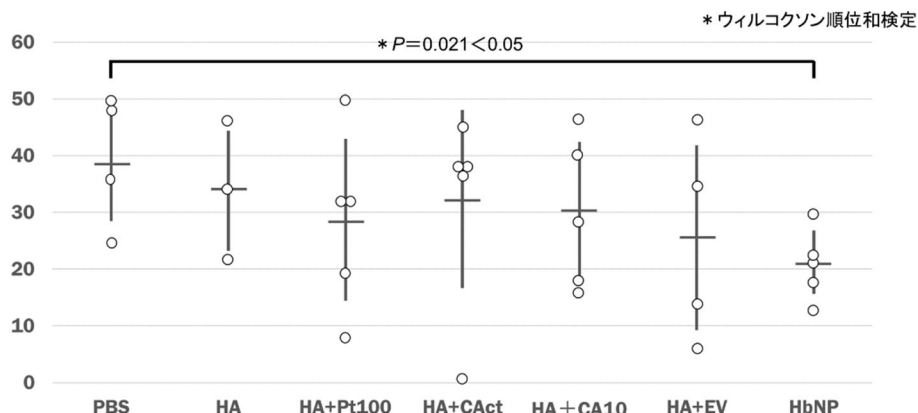


図2 各製剤の梗塞体積縮小効果

これを以て、以後の検討は HbNP を用いて検討することとした。現在、HbNP、HemoAct、溶媒のみの3群比較でn数を増やして本実験を施行している段階である。

当該研究の3年間において、初年度は PtNP-HemoAct の合成において、PtNP と HemoAct の混合比を調整し、至適の混合比を得るまでに時間を要して、研究の進捗が遅れ気味となったが、さらに次年度に新型コロナウイルスの市中感染拡大により大学施設の行動指針がレベル3の制限がかかり、動物実験室が使えなくなる事態となってしまった。このため、予備実験の進行がさらに遅れてしまい、同年度の終盤にやっと予備実験が施行できる状況であった。最終年度になり、予備実験の結果が上記のようにまとめられ、本実験への移行が可能となった。予定より1年以上遅れてしまったが、さらに実験を続けて、研究成果をまとめたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	小松 晃之 (Komatsu Teruyuki) (30298187)	中央大学・理工学部・教授 (32641)	
研究分担者	中山 若樹 (Nakayama Haoki) (40421961)	北海道大学・医学研究院・講師 (10101)	
研究分担者	川堀 真人 (Kawabori Masahito) (50399870)	北海道大学・大学病院・特任准教授 (10101)	
研究分担者	数又 研 (Kazumata Ken) (60634144)	北海道大学・大学病院・講師 (10101)	
研究分担者	竇金 清博 (Houkin Kiyohiro) (90229146)	北海道大学・ - ・総長 (10101)	
研究分担者	長内 俊也 (Osanai Toshiya) (90622788)	北海道大学・医学研究院・助教 (10101)	

6. 研究組織（つづき）

	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	杉山 拓 (Sugiyama Taku) (70748863)	北海道大学・大学病院・助教 (10101)	
研究分担者	伊東 雅基 (Ito Masaki) (10399850)	北海道大学・医学研究院・客員研究員 (10101)	

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