

令和 5 年 4 月 12 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16432

研究課題名(和文)脳梗塞から生還するためのタイムリミット拡大を目的とした血栓溶解薬の応用法

研究課題名(英文)A new attempt to extend the therapeutic time window of ischemic stroke by thrombolytic therapy

研究代表者

中野 貴文(Nakano, Takafumi)

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号：40804539

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、組織プラスミノゲンアクチベータ(tPA)とマイクロバブル化したtPA(micro-tPA)の脳梗塞治療可能時間を4時間中大脳動脈閉塞モデルマウスを用いて評価した。その結果、micro-tPA(2.0 mg/kg)は脳出血の誘発をすることなく、梗塞巣体積を減少させた。対照的に、tPA(10 mg/kg)は治療効果を示すことなく、大量の脳出血を併発させた。この結果より、micro-tPAはtPAと比べて長い治療可能時間を持ち、新しい脳梗塞治療法になる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

tPAは発症から遅れて投与すると脳梗塞で脆くなった血管から出血を引き起こすため、脳梗塞発症から4.5時間以上経過した患者には投与することができない。そのため、tPAが適応となる患者は脳梗塞患者全体の10%程度しかおらず、このことが脳梗塞による後遺症患者の増加の要因となっている。本研究では、マイクロバブル化させたtPAは、通常のtPA治療よりも出血リスクが少ないことが明らかになった。本研究成果を更に発展させることで、脳梗塞治療のタイムリミットである発症から4.5時間を拡大できる可能性があることを示した。

研究成果の概要(英文): In this study, we evaluated the therapeutic time window of ischemic stroke for tissue plasminogen activator (tPA) and microbubble-tPA (micro-tPA) using 4 hours middle cerebral artery occlusion (4h MCAO) mice. As a result, micro-tPA reduced the infarct volume without hemorrhagic complications in 4h MCAO mice, but tPA was not effective and these animals showed massive intracerebral hemorrhage. These results indicated that micro-tPA has a longer therapeutic time window in ischemic stroke than tPA, and micro-tPA may be useful as a new therapeutic agent for ischemic stroke.

研究分野：脳神経疾患

キーワード：脳梗塞 組織プラスミノゲンアクチベータ マイクロバブル

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脳梗塞を含む脳卒中は、総患者数が約 123 万人であり、寝たきりの原因疾患の第一位である(厚生労働省平成 25 年「国民生活基礎調査の概要」)。それにも関わらず、脳梗塞に対する治療薬の進展は乏しく、国内では 2005 年にトロンボキサン合成阻害薬のオザグレールが登場したのが最後であり、根本的治療薬である血栓溶解薬は tPA (tissue plasminogen activator) のみである。しかし、tPA は発症から遅れて投与すると脳梗塞で脆くなった血管から出血を引き起こすため、脳梗塞発症から 4.5 時間以上経過した患者には投与することができない。そのため、tPA が適応となる患者は脳梗塞患者全体の 10%程度しかおらず、このことが脳梗塞患者増加の要因となっている。従って、これらの現状を解決する新たな治療法の確立が必要とされている。

これまでに tPA に代わる血栓溶解薬として、さまざまな臨床試験が国内外で行われてきた。しかし、未だに新しい血栓溶解薬登場の目途がたっていないこと、着実に我が国では超高齢化社会が迫っていることを考慮すると、既存治療薬の tPA をうまく活用する方法を見出すことが現状での重要な課題ではないかと考えた。そこで、本研究では tPA の時間制限を克服するために、薬物伝達システムに着目し、tPA を微小なバブルに封じ込み、血栓部位でのみ tPA の効果を発揮させる方法で出血リスクを減らせると考えた。本研究では、バブル化した tPA 投与が脳出血誘発リスクを低下させ、更には tPA 治療の制限時間を延ばすことができるのか、脳梗塞モデルマウスを用いて明らかにする。

### 2. 研究の目的

本研究では、「マイクロバブル化した tPA が脳出血誘発リスクを低下させ、更には tPA 治療の制限時間を延長することができるのか」を、脳梗塞モデルマウスを用いて明らかにし、tPA 治療を発展化させるための基盤を確立する。

### 3. 研究の方法

#### 3-1) 脳梗塞モデルマウス

体重 25-35 g の 6 週齢 ddY 系雄性マウス(エスエルシー、静岡)を使用した。イソフルラン吸入麻酔下で、マウスの正中を切開し、左側総頸動脈、外頸動脈および内頸動脈を露出させた。左総頸動脈を切開し、切開口からシリコンコーティングをしたナイロンを挿入し、中大脳動脈(MCA)を閉塞した。MCA 閉塞から 2 時間後もしくは 4 時間後にナイロンを引き抜き、再灌流を施すことで脳梗塞モデルマウスを作製した。実験動物の取り扱いには福岡大学動物実験委員会(Experimental animal care and use committee)に準じた。

#### 3-2) 薬物投与

tPA は注射用水で溶解(10 mg/kg)し、MCA 閉塞後 2 時間後もしくは 4 時間後の再灌流時にマウスの尾静脈より投与した。また、注射用水で溶解した tPA を、超音波用マイクロバブル粉末によってバブル化させた溶液に混和し、機械的に加圧、攪拌させ、マイクロバブル化させた tPA (micro-tPA) を作製した。Micro-tPA は MCA 閉塞後 4 時間後の再灌流時にマウスの尾静脈より投与した。なお、MCA 閉塞マウスは無作為にランダム化され、ブラインドで薬物を投与された。

#### 3-3) 梗塞巣体積と脳出血量

MCA 閉塞後 24 時間後にマウスの脳を取り出し、その脳を 2 mm 間隔の環状切片にした。その切片を用いて脳出血量を評価した。更に、その脳切片を 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride により染色し、梗塞巣体積を評価した。

#### 3-4) MMP-9、occludin 発現量

MCA 閉塞後 24 時間後にマウスの左心室にカテーテルを挿入し、生理食塩液で灌流を行った。その後、脳を取り出し、タンパク抽出液を用いて脳タンパクを抽出した。その抽出液をサンプルとし、ウエスタンブロッティング法により、脳内 MMP-9 および occludin の発現量変化を評価した。

### 4. 研究成果

#### 4-1) 脳梗塞モデルマウスにおける tPA の治療可能時間

2 時間 MCA 閉塞モデルマウスにおいて、tPA は vehicle と比較して有意に梗塞巣体積を減少させた(図 1A)。また、4 時間 MCA 閉塞モデルマウスにおいて、tPA は vehicle と比較して梗塞巣体積を減少させず、脳出血を誘発させた(図 1B, C)。tPA は 2 時間 MCA 閉塞モデルマウスに対しては治療効果を示し、4 時間 MCA 閉塞モデルマウスに対しては治療効果を示さず、逆に脳出血を誘発させた。つまり、本研究で用いた MCA 閉塞モデルマウスは脳梗塞発症から 4 時間の時点で tPA の治療可能時間を過ぎていることが明らかとなった。

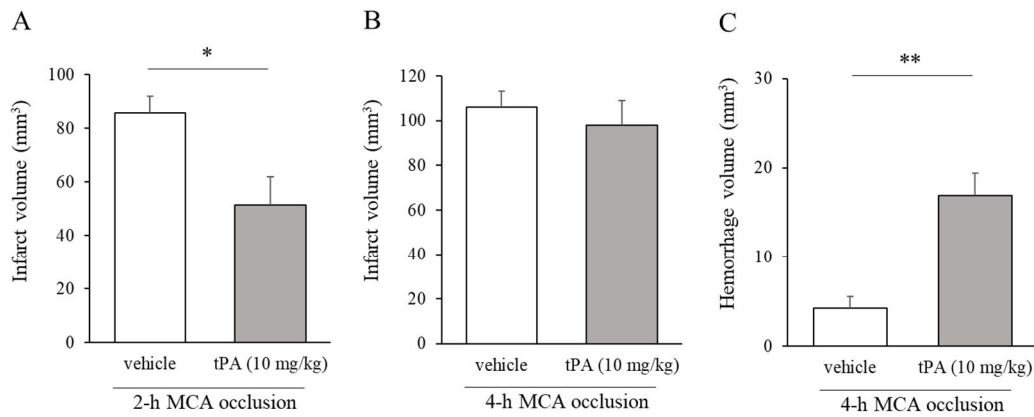


図1 tPA投与による梗塞巣体積と脳出血量の変化

Value are expressed as means  $\pm$  SEM. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01 vs. vehicle (student t-test)

#### 4-2) マイクロバブル化した tPA の治療効果

tPA の治療可能時間を過ぎた脳梗塞モデルである 4 時間 MCA 閉塞モデルマウスに対して、micro-tPA を 2, 5, 10 mg/kg の濃度で投与した。その結果、5 および 10 mg/kg は脳出血を誘発させた (Data not shown)。しかし、2 mg/kg は脳出血を誘発させず、更に vehicle 投与群と比較して有意に梗塞巣体積を減少させた (図 2A, B)。つまり、マイクロバブル化は tPA の有効投与濃度を低下させることができ、それにより、tPA の治療効果を維持した状態で脳出血誘発リスクを軽減させることができたと考えられた。なお、バブルのみの効果を排除するため、マイクロバブルを溶解させた溶液を 4 時間 MCA 閉塞モデルマウスに投与したが、治療効果は示さなかった。

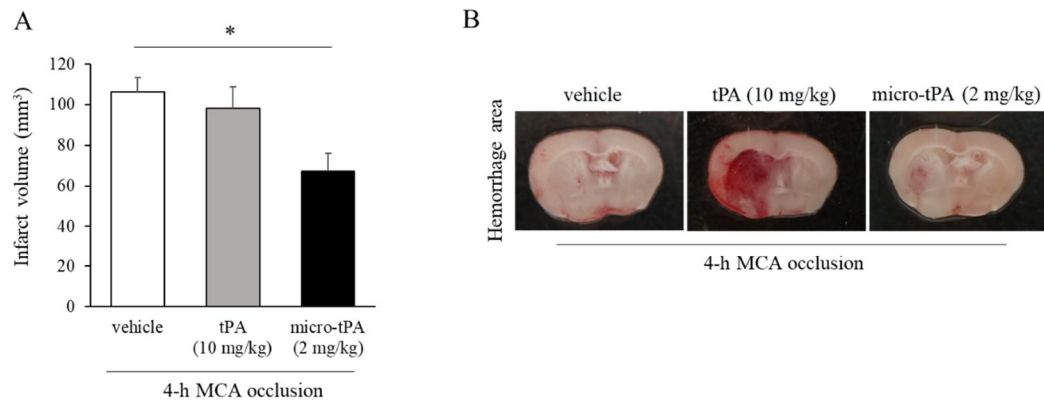


図2 tPAとmicro-tPAの治療効果と脳出血併発の比較

Value are expressed as means  $\pm$  SEM. \* $P$ <0.05 vs. vehicle (Tukey's test)

#### 4-3) マイクロバブル化した tPA 投与後の脳内変化

4 時間 MCA 閉塞後 24 時間後の脳内 MMP-9 および occludin の発現量変化を評価した。MCA 閉塞は脳内 MMP-9 の発現量を増加させ、また、occludin の発現量を低下させた。また、4 時間 MCA 閉塞モデルマウスに tPA を投与した場合、脳内 MMP-9 の発現量増加や occludin の発現量低下は更に更新する傾向がみられた。一方で micro-tPA は脳内 MMP-9 の発現量増加を有意に抑制し、更に occludin の発現量低下も抑制した。これらの脳出血誘発に関わる因子に対して、マイクロバブル化させた tPA は影響を与えにくいことが明らかとなった。

本研究成果により、マイクロバブル化させた tPA は、有効濃度を低下させることができ、それにより脳出血誘発リスクを軽減させることが可能であることが明らかとなった。また、脳出血誘発リスクが軽減したことにより、tPA が本来治療効果を示すことができず、脳出血を引き起こす時間帯においても、micro-tPA は有用性を示すことがわかった。マイクロバブル化は今後の脳梗塞治療の発展において重要なツールとなる可能性が示された。

本研究では申請書の内容通りにフィラメントによる脳梗塞誘発を行ったが、distal モデルなど様々な脳梗塞モデルに対しても同様の結果を得られるか、今後検討が必要である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakano T, Nakamura Y, Irie K, Okano S, Morimoto M, Yamashita Y, Kozako T, Hayashi T, Honda SI, Matsuo K, Kamimura H, Ishikura H, Egawa T, Mishima K.	4. 巻 252
2. 論文標題 Antithrombin gamma attenuates macrophage/microglial activation and brain damage after transient focal cerebral ischemia in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Life Sci.	6. 最初と最後の頁 117665
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.lfs.2020.117665.	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 Morimoto M, Nakano T, Egashira S, Irie K, Matsuyama K, Wada M, Nakamura Y, Shigemori Y, Ishikura H, Yamashita Y, Hayakawa K, Sano K, Mishima K.	4. 巻 11
2. 論文標題 Haptoglobin regulates macrophage/microglia-induced inflammation and prevents ischemic brain damage via binding to HMGB1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Am Heart Assoc.	6. 最初と最後の頁 e024424
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/JAHA.121.024424.	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 Nakano T, Tagashira Y, Egashira S, Morimoto M, Irie K, Hosokawa M, Hayashi T, Egawa T, Hayakawa K, Mishima K.	4. 巻 33
2. 論文標題 Therapeutic effect of anti-HMGB1 antibody in a mouse model of 4-hour middle cerebral artery occlusion: comparison with tissue plasminogen activator	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuroreport.	6. 最初と最後の頁 297-303
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/WNR.0000000000001780.	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 Nakano T, Nakamura Y, Park JH, Tanaka M, Hayakawa K.	4. 巻 5
2. 論文標題 Mitochondrial surface coating with artificial lipid membrane improves cellular transfer efficacy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Commun Biol.	6. 最初と最後の頁 745
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-022-03719-9.	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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中野 貴文、岡野 志のぶ、入江 圭一、森本 麻友香、山下 郁太、佐藤 朝光、仲村 佳彦、佐野 和憲、江川 孝、三島 健一
2. 発表標題 脳梗塞後の脳内炎症反応に対するアンチトロンピンIIIの治療効果
3. 学会等名 日本薬学会140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田頭 祐依、江頭 早紀、森本 麻友香、江口 幸臣、中野 貴文、入江 圭一、細川 雅人、山下 郁太、佐野 和憲、三島 健一
2. 発表標題 中大脳動脈閉塞マウスを用いた脳梗塞遅延期におけるanti-HMGB1抗体の治療効果
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 江頭 早紀、中野 貴文、田頭 祐依、仲村 佳彦、江口 幸臣、亀谷 富由樹、細川 雅人、佐藤 朝光、入江 圭一、山下 郁太、佐野 和憲、三島 健一
2. 発表標題 脳梗塞モデルマウスにおける血中タンパク質の動態
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Egashira S, Kashiwagi H, Mori M, Nakano T, Irie K, Hosokawa M, Kametani F, Nakamura Y, Otsubo S, Satho T, Yamashita Y, Sano K, Mishima K
2. 発表標題 Dynamic of plasma protease inhibitor A3N (Serpina3n) level following focal cerebral ischemia in mice
3. 学会等名 NEURO 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 真崎 有祐子, 江頭 早紀, 向井 梨恵, 熊谷 香南, 中野 貴文, 入江 圭一, 山下 郁太, 佐野 和憲, 佐藤 朝光, 三島 健一
2. 発表標題 脳梗塞モデルマウスにおける Sterol O-acyltransferase 1 の脳内動態
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 江頭 早紀, 真崎 有裕子, 向井 梨恵, 中野 貴文, 細川 雅人, 亀谷 富由樹, 入江 圭一, 佐藤 朝光, 山下 郁太, 佐野 和憲, 三島 健一
2. 発表標題 脳梗塞モデルマウスにおけるSerum Amyloid A(SAA)の動態
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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