

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18366

研究課題名(和文) 抗凝固作用の低いヘパリン誘導体の頭部外傷に対する治療薬としての開発応用

研究課題名(英文) Development and Application as therapeutic agents of non-anticoagulant desulfated heparin for brain injury

研究代表者

長田 雄大(Nagata, Katsuhiko)

東京医科大学・医学部・兼任講師

研究者番号：30627427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：ヘパリン類が頭部外傷部位への好中球浸潤を抑制し、脳浮腫の減少、神経予後の改善に寄与することを示してきた。さらに、抗凝固作用を抑えたヘパリン誘導体：2-O, 3-O desulfated Heparin (ODSH)でも同様の効果を示した。出血リスクの少ないODSHの頭部外傷後に対する作用機序の解明し、治療薬としての開発応用を目的とし、研究をおこなった。マウスの脳のパラフィンブロックを8microの薄さに切片化を終え、Ly6Gを用いた、好中球の脳内浸潤を観測するための試薬を購入し、免疫染色の準備を終えた。その後、COVID-19感染、家業に専念することとなり、研究が不能になってしまった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

頭部外傷後の神経予後を改善させる治療薬の研究は多くなされているが、確立されたものはない。抗凝固作用を抑えたヘパリン誘導体ODSHが頭部外傷後の脳浮腫を抑制、神経予後を改善させることを証明したが、その機序は明らかではない。本研究ではその機序を明らかにすることを目的とし、それは頭部外傷の治療薬としての可能性のみならず、その他の外傷、炎症疾患の治療応用へも繋がる。研究期間にマウス脳のパラフィンブロックを8マイクロに切片化を終え、Ly6Gを用いた、好中球の脳内浸潤を観測するための試薬を購入し、免疫染色の準備を終えた。その後、COVID-19感染、家業に専念することとなり、研究が不能になってしまった。

研究成果の概要(英文)：Unfractionated heparin administered immediately after traumatic brain injury (TBI) reduces brain leukocyte (LEU) accumulation, and enhances early cognitive recovery, but may increase bleeding after injury. Non-anticoagulant heparins, such as 2,3-O desulfated heparin (ODSH), shows similar effect for TBI. This study aimed to clarify of action mechanism of ODSH for TBI. The paraffin blocks of the brain of the mouse was cut and I finished preparations for immunostaining of brain leukocyte infiltration using Ly6G.

I could not do anything but stop this study because the COVID-19 pandemic and I have to focus on my business.

研究分野：救急医学

キーワード：頭部外傷 ODSH ヘパリン

1. 研究開始当初の背景

我が国において、重症頭部外傷は若年層の最大死因である外傷死の約半数をしめ、社会的な損失は大きい。頭部外傷は直接的な外力により生じる一次損傷に引き続く二次損傷を抑制することが治療のターゲットになる。二次損傷の進行は、脳浮腫、脳ヘルニアを引き起こす。二次損傷は血液脳関門の破壊に引き続く脳浮腫、好中球の組織浸潤により悪化していく。図1のように、活性化した好中球は、血管内皮上をローリングし、次に強固に接着し、血液脳関門を介して、脳組織内に浸潤し、最も早く損傷部位に遊走する。好中球の損傷部位への移行を抑制し、炎症を抑えることで、頭部外傷の二次損傷を抑制すると仮説を立て研究を行ってきた。ヘパリン類は好中球のローリング、血管内皮細胞への接着を抑制することが示されている(文献1)。応募者らは、これまでに、マウスの頭部外傷モデルに対する未分画ヘパリン、低分子ヘパリンの効果を評価し、損傷部の微小血管内皮上の好中球ローリングや血管透過性亢進を抑制し、脳浮腫の減少、神経予後の改善に寄与することを明らかにした(文献2、3)。

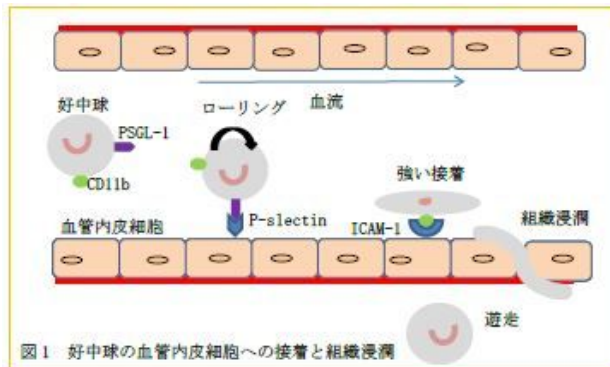


図1 好中球の血管内皮細胞への接着と組織浸潤

方法としては、CD1 マウスに controlled cortical impact (CCI)を用いて、重症頭部外傷モデルを作成した。治療群(高用量未分画ヘパリン、低用量未分画ヘパリン、低分子ヘパリン)受傷後、2時間後から2日間投与し、その後、生体内顕微鏡を用いて、損傷部位の微小血管を観察した。ローダミンを用いて、好中球をラベルし、血管透過性の変化はFITCアルブミンの血管外漏出を観測し評価した。脳浮腫に関しては、死後に脳水分含有量の変化により確認した。また、未分画ヘパリンを用いた研究において、Ly6Gを用いた免疫染色でも未分画ヘパリンが頭部外傷部位への好中球浸潤を抑制することも確認した(文献4)。しかし、高用量の未分画ヘパリンは好中球と血管内皮細胞の接着、好中球ローリングを抑制したが神経予後には寄与しなかった。このことは高用量の未分画ヘパリンが出血合併症をきたしていることが示唆された。

ここで、抗凝固作用を抑えたヘパリン誘導体：2-O, 3-O Desulfated Heparin (ODSH)が未分画ヘパリン、低分子ヘパリンと同様な効果を持つかどうか注目した。既に、ODSHが未分画ヘパリン、低分子ヘパリンと同様に、好中球ローリングや血管透過性亢進を抑制し、脳浮腫の減少、神経予後の改善に寄与することを明らかにした(文献5)。また、頭部外傷に対して、低分子ヘパリンと抗HMGB1モノクローナル抗体は同様に脳浮腫の軽減と好中球ローリングの減少、血管透過性亢進の抑制が見られた(文献6)。このことから、低分子ヘパリンがHMGB1シグナルをブロックすることで、好中球の脳内浸潤を抑制している可能性が示唆された。また、ヘパリンやODSHはHMGB1とRAGEの結合を抑制し、抗炎症反応を示すことが分かっている(文献7)。しかし、ODSHの頭部外傷に対する作用機序は明らかではない。過去の文献を元に下記のような作用機序を仮定した。これらの推察を明らかにすることにより、今後の治療応用につなげたいと考え研究を着想した。

プロテアーゼ活性型受容体(PAR-1)の起動を抑制

ODSHが培養されたヒト肺内皮細胞において、プロテアーゼ活性型受容体(PAR-1)の起動を抑えて、肺の血管透過性を抑制することが示されており(文献6)、脳の血管内皮細胞においても同様作用機序で、血液脳関門の透過性を抑制すると仮定した。

HMGB1による血液脳関門の構造的・機能的破綻を抑制

HMGB1は血液脳関門の構造的・機能的破綻を誘導し、頭部外傷後の血液脳関門の透過性を亢進する(文献9)ことが示された。ヘパリン類が脳浮腫の進行を抑えた結果は、好中球ローリングの減少、組織浸潤を抑制するだけでなく、HMGB1を抑制することによる血液脳関門の破綻を抑制すると仮定した。

アストロサイトの出現や形態変化を抑制

脳損傷後にアストロサイトは活性化され、血管透過性亢進因子などを産生し、血液脳関門の破壊を促すとされている。抗HMGB1抗体がアストロサイトの活性化を抑制するというデータもあり(文献9)、ODSHがHMGB1を抑制することにより、アストロサイトの出現や形態変化を抑制すると仮定した。

【参考文献】

- (1) Borsig L et al. Prog Mol Biol Transl Sci, 2010.
- (2) Li S et al. J Trauma, 2015.
- (3) Nagata K et al. J Trauma, 2016.
- (4) Nagata K et al. J Trauma, 2017.
- (5) Nagata K et al. J Trauma, 2018.

- (6) Li S, Nagata K et al. J trauma, 2016
- (7) Rao NV et al. Am J Physiol Cell Physiol, 2010
- (8) Gonzales JN et al. Vascul Pharmacol, 2014
- (9) Okuma Y et al. Annals of Neurology, 2012

2. 研究の目的

重症頭部外傷は若年層における最大死因である外傷死の約半数占める。頭部外傷一次損傷に引き続く二次損傷の進行は脳浮腫、脳ヘルニアを引き起こす。二次損傷の進行は、破綻した血液脳関門を介して好中球が損傷部位に浸潤し、更なる血液脳関門の破綻が一因となる。応募者らはこれまでに重症頭部外傷マウスモデルを作成し、未分画ヘパリンや低分子ヘパリンが頭部外傷部位への好中球浸潤を抑制し、脳浮腫の減少、神経予後の改善に寄与することを示してきた。さらに、抗凝固作用を抑えたヘパリン誘導体：2-O, 3-O Desulfated Heparin (ODSH)でも同様の効果を示した。出血リスクの少ないODSHは頭部外傷の治療薬となると期待できる。本研究では、既に得ているマウス脳のパラフィンブロックを用いて、ODSHの頭部外傷後に対する作用機序の解明し、治療薬としての開発応用を目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、既に応募者が得ている、頭部外傷を与えたマウスの脳のパラフィンブロックを用いて、免疫染色を行い、ODSHの頭部外傷に対する作用機序を判明する。

(1) 脳内の好中球の浸潤を評価

既に得ているマウス脳のパラフィンブロックを切片化し、Ly6Gを用いて、免疫染色し、好中球の脳内浸潤を観測する。マウスは陰性対照群（非外傷+生食投与）、陽性対照群（外傷+生食投与）、高用量ODSH群（外傷+高用量ODSH投与）、低用量ODSH群（外傷+低用量ODSH）の4グループに分けられており、受傷後2日後に組織固定したシリーズと17日後のシリーズの2シリーズ分のマウス脳のパラフィンブロックを得ている。それぞれ約10前後のn数である。それぞれのシリーズでの比較を行い、ODSHの外傷後の好中球脳内浸潤のデータを得る。得られたデータを解析し、比較検討をする。

(2) プロテアーゼ活性型受容体（PAR-1）の起動を確認

同様に、免疫染色を用いて、プロテアーゼ活性型受容体（PAR-1）を測定し、それぞれ比較検討をする。

(3) HMGB1や炎症性サイトカイン、vascular endothelial growth factor-A(VEGF-A)、アストロサイトなどの測定

同様に免疫染色し、HMGB1やサイトカイン、vascular endothelial growth factor-A(VEGF-A)、アストロサイトなどを測定し、ODSHによる抑制の有無を確認する。

4. 研究成果

研究期間にマウス脳のパラフィンブロックを8マイクロに切片化を終え、Ly6Gを用いた、好中球の脳内浸潤を観測するための試薬を購入し、免疫染色の準備を終えた。その後、COVID-19感染、家業に専念することとなり、研究が不能になってしまった。研究結果は得られなかった。

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

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