

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 11 日現在

機関番号：	34401
研究種目：	若手研究(B)
研究期間：	2008～2011
課題番号：	20791020
研究課題名（和文）	脱シアロ化短半減期エリスロポイエチン誘導体を用いた中枢神経再生治療法の開発
研究課題名（英文）	Development of regenerative therapy of central nervous system, using with asialo-erythropoietin.
研究代表者	
	三木 義仁 (Miki Yoshihito)
	大阪医科大学・医学部・非常勤医師
	研究者番号： 50454541

研究成果の概要（和文）：中枢神経疾患に対する治療効果が報告されているエリスロポイエチンより半減期の短い短半減期エリスロポイエチン誘導体である脱シアロ化エリスロポイエチンの神経保護効果について、ヒトの蘇生後脳症モデルに相当すると考えられているスナネズミ一過性前脳虚血モデルを用いて検討した。その結果、赤血球増多作用などの副作用を伴うことなく神経保護作用が確認され、新たな脳保護薬としての可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Systemic administration of high-dose recombinant human erythropoietin (rhEPO) is known to attenuate ischemic injury. However, high-dose rhEPO might aggravate ischemic lesions by increasing blood viscosity because of its erythropoietic effects. Asialoerythropoietin (asialoEPO), an EPO derivative with an extremely short plasma half-life, has considerably lesser erythropoietic effect than that of naive EPO. We attempted to determine whether asialoEPO exerts the same neuroprotective effect as naive EPO in a gerbil transient forebrain ischemia model, and resulting multiple dosing of asialoEPO, like EPO, could protect the hippocampal CA1 neurons from ischemic damage without affecting erythropoiesis. This data suggested that asialoEPO would be novel neuro-protective agent in the future.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：エリスロポイエチン、短半減期エリスロポイエチン、アシアロエリスロポイエチン、脳梗塞、脳虚血、神経保護、神経再生、選択的神経細胞死

### 1. 研究開始当初の背景

近年、造血ホルモンであるエリスロポイエチン（以下 EPO）に神経保護効果や血管新生効果があることが報告され中枢神経疾患の治療への応用が期待されている。本研究を開始するにあたって短半減期エリスロポイエチン誘導体である脱シアル化エリスロポイエチン（以下 Asialo-EPO）が EPO と同等の神経保護効果と EPO を上回る血管新生効果を発揮することをラット中大脳動脈閉塞脳梗塞モデルに対する治療実験で確かめた。

本研究ではヒトの蘇生後脳症の疾患モデルに相当すると考えられているスナネズミー過性 4 血管閉塞モデルを用いて、Asialo-EPO の持つ生物学的治療効果について検討を行う計画とした。

### 2. 研究の目的

2002 年にドイツの Max-Planck-Institute を中心とするグループにより“EPO-STROKE-STUDY”が行われ、急性期脳梗塞の患者に対し、遺伝子組み換えヒトエリスロポイエチン (rhEPO) を投与し治療効果があることが報告された。しかし、脳血液閉門を通過して効果を得るためには大量の全身的に投与される rhEPO が必要であり、その赤血球増多作用や血小板機能亢進作用により血栓性合併症を来す危険性があり、臨床応用の懸念材料となっている。脱シアル化エリスロポイエチン (asialoEPO) は酵素反応により脱シアル化された rhEPO の誘導体である。生体内での安定化を担うシアル酸を離脱させることで、ガラクトース基が露出し、肝臓のガラクトース結合蛋白により速やかに代謝され、短半減期という特徴を示す(図 1)。神経保護作用を示すには短時間の EPO の暴露で可能であり、骨髄への作用を呈することなく神経保護作用のみを得ることができると考えられ、今回 asialoEPO を用いたスナネズミー過性前脳虚血モデルに対する治療実験を行った。

#### EPO 蛋白質の構造

ポリペプチド基本骨格：  
165 個のアミノ酸  
N 型糖鎖結合：  
血中の安定化を担う

#### N 型糖鎖結合の構造

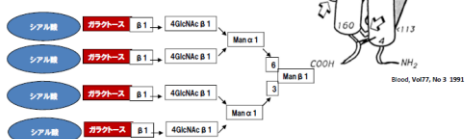


図 1 EPO 蛋白質の構造

### 3. 研究の方法

#### (1) スナネズミー過性前脳虚血モデルへの薬剤投与

24 匹の体重 60-70g の Mongolian gerbil を rhEPO 投与群、asialoEPO 投与群、PBS 投与群の 3 群に分類した。一過性前脳虚血モデルは脳動脈瘤用クリップを用いて両側総頸動脈を 3 分間遮断し、その後再開通させた。遮断中に脳血流が低下していることを確認するため、近赤外線脳血流ドプラーによりモニタリングした。薬剤投与は前脳虚血の 3 時間前、直後、24 時間後 (各 10U/g body weight (b. w.)) の 3 回行った (図 2)。

#### (2) 神経学的評価および組織学的評価

神経学的評価：前脳虚血後 6、7 日目に明暗箱を用いた受動的回避テストを行った。学習機能検査としてスナネズミを明箱の中に入れ暗箱へ入った時に電気ショックを与え再び明箱に戻すことを 10 分間繰り返し、電気ショックを受けた回数を数えた。その 24 時間後に記憶保持検査としてスナネズミを明箱に入れ、暗箱に入るまでの時間を最長 300 秒まで測定した (図 2)。

組織学的評価：7 日目の神経評価終了後、スナネズミを安楽死させ、脳を摘出し海馬 CA1 領域の神経細胞の障害について Nissl 染色および Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP end labeling (TUNEL) 染色にて評価を行った (図 2)。

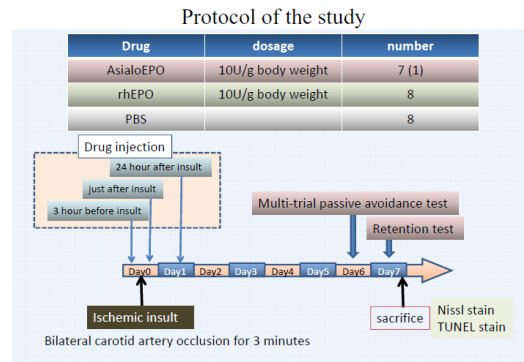


図 2 Protocol

#### (3) 造血系への影響についての評価

薬剤投与前と投与後 14 日目に同一個体の末梢血中のヘモグロビン濃度を測定した。また、薬剤投与 3 日目に採血および骨髄を採取し、末梢血中の網状赤血球の割合と骨髄中の赤芽球の割合を測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 結果

① 神経学的評価において明暗箱による神経学的評価では電気ショックを受ける回数に PBS 投与群は  $7.5 \pm 0.91$  回であったのに対し、asialoEPO 投与群は  $4.9 \pm 0.40$  回、rhEPO

投与群は  $5.5 \pm 0.68$  回であり有意に少なかった。また、24 時間後の記憶保持検査では PBS 投与群が暗箱へ入るまでに  $37.0 \pm 19.20$  秒であったのに対し、asialoEPO 投与群は  $263.6 \pm 27.18$  秒、rhEPO 投与群では  $230.6 \pm 25.63$  秒であり有意に延長していた(図 3)。

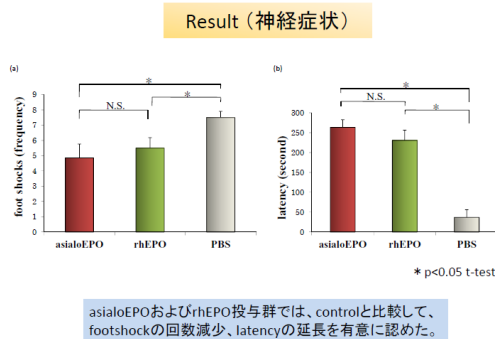


図3 神経学的評価

②組織学的所見において、Nissl 染色では海馬 CA1 領域の viable cell が asialoEPO 投与群は  $144.99 \pm 34.87$  cells/mm、rhEPO 投与群は  $103.57 \pm 27.90$  cells/mm であり、PBS 投与群 ( $19.00 \pm 3.79$  cells/mm) よりも有意に改善を認めた。また、TUNEL 染色においても asialoEPO 投与群は  $29.28 \pm 14.91$  cells/mm、rhEPO 投与群は  $33.40 \pm 8.13$  cells/mm であり、PBS 投与群 ( $76.67 \pm 8.14$  cells/mm) よりも有意にアポトーシスの抑制を認めた(図 4)。

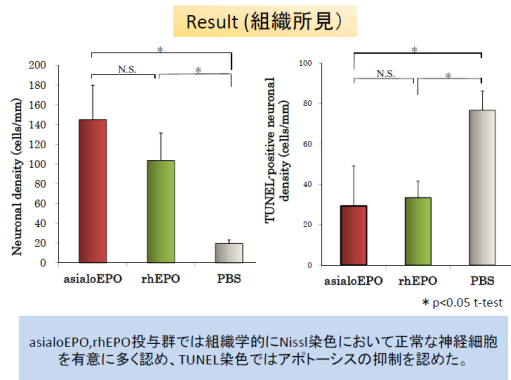


図4 組織学的評価

③赤血球造血系への影響について、ヘモグロビン濃度は asialoEPO 投与群と PBS 投与群は投与前後で変化はなく、rhEPO 投与群のみ上昇していた(図 5)。骨髄中の赤芽球および末梢血中の網状赤血球も同様に、rhEPO 投与群のみ上昇していた(図 6)。

**Result (造血系への影響)**

rhEPO(10U/g b.w.),asialoEPO(10U/g b.w.),PBSを投与前、投与後14日目に採血しヘモグロビンを測定した。(各n=5)

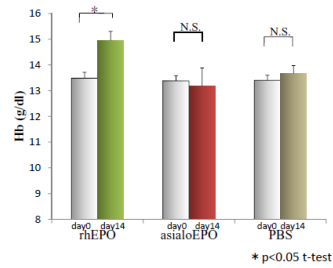


図5 ヘモグロビンの変化

rhEPO(10U/g b.w. n=4), asialoEPO(10U/g b.w. n=3), PBS(n=3)を投与後3日目にsacrificeし、赤芽球、網状赤血球を測定した。

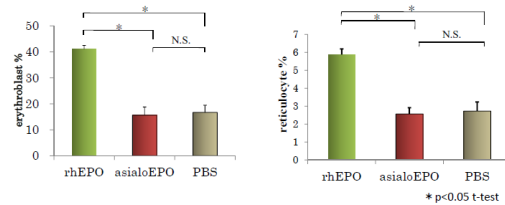


図6 赤芽球、網状赤血球の変化

## (2) 考察

スナネズミ一過性前脳虚血モデルに対する asialoEPO の大量投与により、rhEPO と同等に神経学的、組織学的に改善を認めた。また、造血系への影響では asialoEPO は PBS 投与群と同様に骨髄への作用を認めなかった。rhEPO の脳血液関門を通過する機序については明らかにされていないが、rhEPO の全身投与により髄液中の EPO 濃度が神経保護レベルまで速やかに上昇することが報告されている。造血作用と異なり、神経保護作用は短時間の EPO の暴露により得ることができる。この神経保護作用は強い抗アポトーシス作用によると考えられており、そのシグナル伝達が解明されてきている。その他の機序として、脳虚血によるグルタミン酸毒性の抑制や抗炎症作用なども報告されている。今回の実験では虚血負荷前投与により神経保護効果を見ることができた。今後、さらなる検討を行い、新たな脳保護薬としての臨床応用が期待される。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

① Yamashita T, Nonoguchi N, Ikemoto T, Miyatake S, Kuroiwa T, Asialoerythropoietin attenuates neuronal cell death in the hippocampal CA1 region after transient forebrain ischemia in a gerbil model., Neurological Research, 32(9), 957-962, 2010, 査読有り

〔学会発表〕(計3件)

- ① 山下太郎、脱シアル酸エリスロポイエチン asialoerythropoietin によるスナネズミ前脳虚血モデルに対する神経保護効果、第35回京滋免疫カンファレンス、2009年11月7日、京都国際ホテル
- ② 山下太郎、脱シアル酸エリスロポイエチン asialoerythropoietin によるスナネズミ前脳虚血モデルに対する神経保護効果、第68回日本脳神経外科学会総会、2009年10月14日、京王プラザホテル
- ③ 山下太郎、脱シアル酸エリスロポイエチン asialoerythropoietin によるスナネズミ前脳虚血モデルに対する神経保護効果、第10回日本分子脳神経外科学会、2009年9月19日、岡山コンベンションセンター

〔図書〕(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

三木 義仁 (Miki Yoshihito)

大阪医科大学・医学部・非常勤医師

研究者番号：50454541