

平成 22 年 5 月 17 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008 年 ～ 2009 年

課題番号：20890072

研究課題名（和文） 血栓溶解療法と新規神経保護薬リチウム

研究課題名（英文） Novel neuroprotectant lithium in thrombolytic therapy

研究代表者 高橋 哲哉 (TAKAHASHI TETSUYA)

新潟大学・医歯学総合病院神経内科・助教

研究者番号：20515663

研究成果の概要（和文）：脳梗塞に対する新規神経保護薬リチウムの組織プラスミノゲン・アクチベーター(t-PA)との併用療法について検討するため、よりヒトに近い動物モデルの確立を行った。種々の条件を検討した結果として、t-PAにより血栓溶解を起こし脳虚血の改善が得られ、かつ脳虚血からある程度の時間が経過した場合には逆に脳出血を含めたt-PAの副作用により脳虚血性障害が増悪する、といったヒトでの脳塞栓に近い状態をできるだけ再現することに成功した。このような臨床に即した動物モデルは望まれているものの手技上の難しさから未だ使われる報告は少ない。今後このモデルを使いリチウムの治療効果を検討する。

研究成果の概要（英文）：To investigate the neuroprotective effect of lithium with tissue plasminogen activator(t-PA) in thrombolytic therapy in stroke, I tried to establish the clinically-resembling animal stroke model. After several experimental condition had been tried, I've established the model that showed thrombolysis and neurological improvement by t-PA administration in early time point, and also showed worsened outcome including increased hemorrhage by t-PA administration in late time point. Similar animal model is not used in many report because of the technical difficulty. I'll evaluate the beneficial effect of lithium using this model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1200000	360000	1560000
2009年度	1050000	315000	1365000
年度			
年度			
年度			
総計	2250000	675000	2925000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：神経内科学

キーワード：脳塞栓モデル、リチウム

1. 研究開始当初の背景

(1)脳卒中は本邦での死因の第3位を占め

る重要な疾患で脳卒中による後遺症に苦しむ患者数は増加している。脳虚血による脳損傷を軽減し、後遺症の少ない状態で社会復帰を可能にするため、**脳虚血後の神経保護に関する研究は重要性を増している**。しかし**未だ臨床応用に至った薬剤はなく、新規の神経保護薬の開発が急務**である。

(2) 現在、臨床における脳梗塞の血栓溶解療法に用いられる**組織プラスミノゲン・アクチベーター (t-PA)**は血栓を溶解させ血流を再開する意味で脳梗塞に有効である一方、治療可能時間が発症から3時間以内ときわめて短い。また、脳浮腫、出血性梗塞を引き起こし脳損傷を増悪させること**(再灌流傷害)**を含め **t-PA には神経傷害的作用があり、これを抑制するための薬剤の併用**が検討されているが、未だ臨床応用はなされていない状態である。

(3) われわれは**リチウムを新規脳虚血治療薬として注目した**。リチウムは古くから双極性障害などの治療に使用されている薬剤であるが、近年、種々の疾患で神経保護作用を持つとする報告が散見される。リチウムはAktと呼ばれるリン酸化酵素を活性化し、脳虚血後の再灌流傷害を抑制し神経保護的に働くと考えられているが、その作用機序は**前述した t-PA の細胞傷害作用と拮抗する**。ヒトで古くから使用され安全性が確認されている薬剤であることから、臨床応用の可能性は十分あるものと考えられる。

2. 研究の目的

(1) リチウムはt-PAの副作用を抑制することができるかどうかを明らかにする。またその至適投与条件を検討する。

(2) リチウムがt-PAの副作用を抑制した場合、その作用機序としてAkt活性化が関

与するのか明らかにする。

(3) Akt活性を修飾する因子を追加投与することで、更に効果を高められるかを明らかにする。

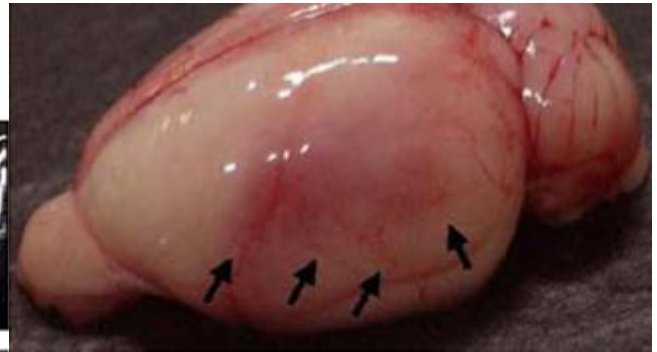
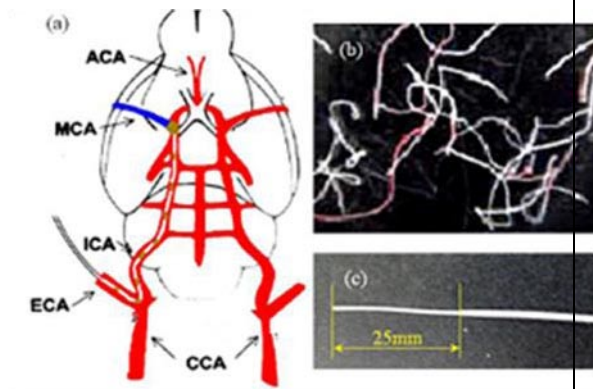
t-PAの副作用のメカニズムはAkt経路と関連が強く、Akt経路の活性化により抑制できる可能性が高いと申請者は考えている。リチウムの投与条件を最適化し、Akt経路にかかわる種々のタンパクの発現や酵素活性を検討することにより、t-PAとAkt経路の関連をより詳細に明らかにできる。さらにAkt経路の種々の活性化剤を同時に投与することで、リチウムによるt-PAの副作用を抑制する効果が高められるかも検討する。

3. 研究の方法

ラット脳塞栓モデルの作成

リチウム投与の効果検討に先立ち、梗塞サイズが安定している脳梗塞モデルを確立する必要がある。オスSprague-Dawleyラット(275~300g)を使用し、脳塞栓モデルとしてKoizumi's modelを用いる。ラット動脈血にトロンビンを添加し、内径0.38mmのポリエチレンチューブ内に注入して自家血血栓を作成し、長さ1mmの大きさに切り分けておく(図b, c)。ラットをハロセンにて麻酔導入後、外頸動脈から内頸動脈内に挿入したポリエチレンチューブを通して中大脳動脈起始部近傍に血栓を注入し脳梗塞を作成する(図a)。脳虚血導入120分後に生理食塩水、ないしt-PA(10mg/kg)を静脈注射する。この間、ラットの酸素飽和度や体温などを一定に保つことに留意し、またドップラーエコーを用い、頭頂葉の血流低下およびt-PA投与後の血流改善を確認する。24時間後にTTC染色により脳梗塞体積を測定し、脳梗塞体積が均一であるこ

とを確認する。また spectro-photometric assay を用いて出血量を測定する。



(図 1: 自家血栓による梗塞作成 4 時間後に t-PA を投与し生じた出血)

4. 研究成果

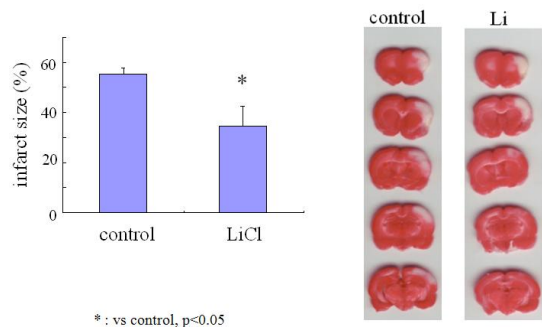
脳梗塞の治療薬として血栓溶解療法に用いられる組織プラスミノゲン・アクチベーター(t-PA)の副作用軽減を検討するにあたり、t-PAによる血栓溶解療法へのリチウムの併用効果の検討には、t-PAにより血栓溶解を起こし脳虚血の改善が得られ、かつ脳虚血からある程度の時間が経過した場合には逆に脳出血を含めたt-PAの副作用により脳虚血性障害が増悪する、といったヒトでの脳塞栓に近い状態をできるだけ再現することが重要である。そのため、t-PAの投与量、投与時間、また梗塞作成時に注入する自家血栓の量といった条件の検討を行った。

結果として、t-PAの脳虚血2時間後の投与で血栓溶解による梗塞体積の縮小効果を示し、また脳虚血4時間後のt-PA投与では出血性合併症の増加と死亡率の増加を示すという、きわめてヒトの脳塞栓症に対してのt-PAの治療効果と副作用をよく再現するモデルの作成に成功した(図1)。このような動物モデルは手技上の難しさから未だ使われる報告は少なく、本モデルの確立は今後の本研究、ないし異なる薬剤を標的とした研究を行うにあたり大きな優位点と考えている。

引き続き本モデル動物を使用し、炭酸リチウムの腹腔内投与を行い神経保護作用について現在検討中である。

また、モデルの作成と平行し、従来から用いられているラット中大脳動脈遠位閉塞モデルを使用し、リチウムの作用機序の1つとされるAkt経路について検討し、2009年米国神経学会で発表した。

本報告で、本モデルで炭酸リチウムの虚血急性期投与は神経保護的に作用することを示した(図2)。

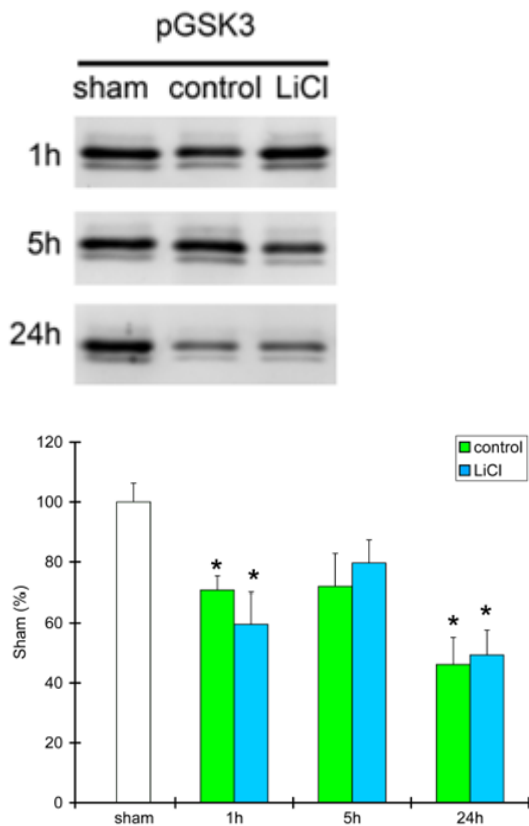


(図 2: リチウム投与により脳梗塞体積が縮小)

そのメカニズムの1つとして、Akt活性の変化をAktの基質の1つであるGSK3βのリン酸化で評価した。Akt活性はこのモデルにおいて、経時的に低下する傾向を示したが、虚血1,5,24時間後について、リチウム投与群と非投与群との間に有意差は認

めなかった (図 3)。

炭酸リチウム投与により梗塞サイズの縮小を示したにもかかわらず、Akt 活性に変化がなかった理由として、



(図 3) リチウム投与による Akt 活性の変化

1. リチウムは Akt 活性を変化させるといわれているがその働きについては議論の余地があり、Akt 活性を上昇、低下、不変とも報告がある。さらに、Akt に結合しその活性を調節する内在性の因子である CTMP が 2009 年に報告され、Akt 総量や Akt リン酸化は不変にもかかわらず CTMP の存在により Akt 活性は変化することが初めて示された。本実験でも CTMP が活性を調整していると考えられる。

2. リチウムは Akt をはじめとした種々の

タンパクの活性を調節すると考えられており、脳虚血の急性期についてはリチウムは Akt にはあまり影響を与えず、その保護効果は別のタンパクへの影響による可能性がある

等が考察された。

今後、本実験の結果を踏まえ、自家塞栓と t-PA を用いたモデルにおいて検討を行う。

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 件)

[学会発表] (計 1 件)

高橋 哲哉, Changes in protein levels of phosphorylated Akt and GSK 3 beta may not contribute to the protection of Lithium against focal ischemia in rats, 米国神経学会, 2009 年 4 月 29 日, 米国ワシントン州シアトル (Washington State Convention Center)

6. 研究組織

(1) 研究代表者 : 高橋 哲哉
(TAKAHASHI TETSUYA)

新潟大学・医歯学総合病院神経内科・助教
研究者番号 : 20515663

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :