

令和 6 年 10 月 15 日現在

機関番号：34306

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(A））

研究期間：2021～2023

課題番号：20KK0381

研究課題名（和文）プロテアーゼ活性制御による脳神経再生の高効率化と虚血性脳疾患治療への展開

研究課題名（英文）Highly efficient neuronal regeneration through regulation of protease activity for the treatment of ischemic brain injury

研究代表者

河下 映里（Kawashita, Eri）

京都薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：80509266

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 9,500,000円

渡航期間：12ヶ月

研究成果の概要（和文）：本国際共同研究では、脳梗塞や新生児低酸素性虚血性脳症（HIE）に対する創薬標的分子としてニューロセルピン（NSP）および 2アンチプラスミン（2AP）に着目した。脳梗塞および新生児HIEマウスにおける脳傷害が、NSP投与により有意に抑制され、そのメカニズムとしてNSPによるERストレスや酸化ストレスの軽減が示唆された。また、2APが脳梗塞後の脳室下帯における神経新生を抑制していることが明らかになり、2APの機能抑制を介した内因性神経新生の促進により神経機能障害が回復する可能性が示唆された。本研究成果は、虚血性脳疾患における神経機能再生・回復を狙った薬物療法の開発に繋がると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳梗塞や新生児HIEなどの虚血性脳疾患に対する治療において、発症後に失われた神経機能を再生・回復させる薬物治療は存在しない。脳虚血による神経機能障害は高確率で発生し、患者やその家族に対して大きな精神的・経済的苦痛をもたらすことから、虚血性脳疾患に対するneural replacement療法の開発は重要課題の一つである。本研究により、脳梗塞や新生児HIEにおいて、NSP投与による神経保護効果および2AP欠損による神経新生促進効果が明確になった。この成果は、脳梗塞および新生児HIEを含む虚血性脳疾患におけるneural replacementの高効率化を目指した薬物療法の実現化に繋がる。

研究成果の概要（英文）：2-Antiplasmin (2AP) and neuroserpin (NSP), members of the serine protease inhibitor (serpin) family, are known as principal physiological inhibitors of plasmin and tissue plasminogen activator (tPA), respectively. In this international joint research study, we demonstrated a protective effect of NSP against brain damage in adult stroke and mild neonatal hypoxic-ischaemic encephalopathy (HIE) mouse models by suppressing ER stress and/or oxidative stress. In addition, we found that 2AP deficiency promotes endogenous neurogenesis in the subventricular zone in a stroke mouse model. These findings suggest that combination of exogenous neuroserpin and 2AP inhibition could be a candidate pharmacotherapy of stroke and neonatal HIE.

研究分野：薬学

キーワード：脳梗塞 新生児低酸素性虚血性脳症 線溶 ニューロセルピン 2-アンチプラスミン セルピン

1. 研究開始当初の背景

虚血性脳卒中（脳梗塞）の治療において、超急性期における血栓溶解薬（組織型プラスミノゲンアクチベータ（tPA）製剤）の投与や血栓の外科的回収は一定の効果を示しているが、その後必要となる、失った脳組織を再生させる治療法については確立していない。一方、出生時の酸素欠乏により誘発される新生児低酸素性虚血性脳症（HIE）は、約 500 人に 1~2 人の割合で発生し、新生児の死亡、脳性麻痺および脳発達障害の最大原因である。現在、HIE に対する治療法として低体温療法が行われているが、約 50% の患者で重篤な脳障害が生涯にわたって残る。このように、脳虚血による神経機能障害は高確率で発生し、患者やその家族に対して大きな精神的・経済的苦痛をもたらすことから、脳梗塞および HIE を含む虚血性脳疾患に対する神経再生療法の開発は最重要課題の一つである。

脳梗塞や新生児 HIE などの虚血性脳疾患に対する効果的な neural replacement 療法を確立するためには、(1) 急性期の脳障害を抑制すること、(2) 内在性神経新生を促進すること、そして (3) 神経前駆細胞移植療法における移植後の細胞生着性を向上させることが重要である。本研究では、脳梗塞および新生児 HIE における神経再生療法の高効率化を目標とし、(1) の急性期の脳障害を抑制する創薬標的分子として、ニューロセルピン（NSP: tPA の生理的阻害因子）に着目し、さらに、(2) の内在性神経新生を促進し、(3) の移植後の神経前駆細胞の生着性を向上させるための創薬標的分子として、 $\alpha 2$ アンチプラスミン（ $\alpha 2AP$: 細胞外セリンプロテアーゼであるプラスミンの生理的阻害因子）に着目した。これまでに、抗 $\alpha 2AP$ 中和抗体を用いた脳内 $\alpha 2AP$ の機能抑制によって、海馬での内因性神経新生が促進されることを報告した [Kawashita et al. Mol. brain. 2020]。この結果から、 $\alpha 2AP$ 機能の抑制を介したプラスミン活性の維持または上昇による内因性神経新生の促進により、脳梗塞や新生児 HIE における虚血による神経機能の障害を改善できる可能性が推察される。プラスミン産生酵素としては、tPA とウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベータ（uPA）が存在するが、tPA がプラスミン非依存的に神経細胞死や血液脳関門の破綻を招くことが国内外の多数の研究により明らかにされており [Zhu et al. Cell. Mol. Life Sci. 2019]。効果的な神経再生療法の確立において、tPA による直接的な神経毒性を抑制することは極めて重要である。

一方、海外共同研究者である Zoltán Molnár 教授（Oxford 大学、生理・遺伝・解剖学部門（DPAG））は、正常脳の発達および新生児 HIE などの発達障害に関する分野に精通しており、脳発達に伴い大脳皮質での NSP の発現パターンが変化することを見出し [Kondo and Molnár et al. Front. Neurosci. 2015; Adorjan and Molnár et al. J. Anat. 2019]、大脳皮質発達における NSP の重要性を示唆している。

2. 研究の目的

本研究では、Oxford 大学の Molnár 教授の研究グループと協働して、脳梗塞および新生児 HIE マウスにおける神経障害や脳炎症、内因性神経新生における NSP および $\alpha 2AP$ の役割を明確にする。また、 $\alpha 2AP$ の機能抑制による神経再生促進効果と、tPA 誘発性神経毒性の NSP による抑制効果とのコンピネーションにより、脳梗塞モデルおよび新生児 HIE モデルにおける neural replacement の高効率化を検証する。さらに、脳への ES 細胞由来神経前駆細胞移植後の、細胞生着性における NSP および $\alpha 2AP$ の役割を明確にする。

3. 研究の方法

脳梗塞後の脳傷害に対する NSP の神経保護効果の検証とそのメカニズムを明らかにするため、中大脳動脈閉塞術（MCAO）脳梗塞モデルを作製した後、NSP（または人工脳脊髄液）を脳室内に単回投与し、2,3,5-トリフェニルテトラゾリウムクロライド（TTC）染色により梗塞サイズを、Western blotting により小胞体ストレス（ER ストレス）レベルを評価した [本検討は Molnár 教授グループ（Oxford 大学）と Lei Shi 教授グループ（Jinan 大学）が中心に実施した]。一方、脳梗塞後の脳室下帯での神経新生における $\alpha 2AP$ の関与を明らかにするため、長浜バイオ大学の永井信夫教授の協力を得て、 $\alpha 2AP$ 欠損マウスおよび野生型マウスを用いて光化学誘発性脳梗塞（photochemically induced thrombotic brain damage: PIT-BD）モデルを作製した後、プロモデオキシウリジン（BrdU）を腹腔内に連日投与し、増殖細胞（新生細胞）を BrdU ラベリングした。脳梗塞誘発から 1 週間および 2 週間後に、凍結脳切片を作製し、神経芽細胞・神経前駆細胞のマーカーであるダブルコルチン（Dcx）に対する抗体および抗 BrdU 抗体を用いて免疫組織染色を行い、BrdU/Dcx 二重陽性細胞数および Dcx 単独陽性細胞数をカウントした。また、新生した神経細胞の成熟化について評価するため、成熟神経細胞マーカーである NeuN に対する抗体および抗 BrdU 抗体を用いて、同様の解析を行った。脳炎症については、ミクログリアマーカー（Iba1）または活性化ミクログリアマーカー（CD68）に対する抗体を用いた免疫組織学的解析により評価した。さらに、ES 細胞由来神経前駆細胞の移植後の、細胞生着性への $\alpha 2AP$ の関与を明らかにするため、 $\alpha 2AP$ 欠損マウスおよび野生型マウスの大脳皮質に、GFP 発現 ES 細胞を分化誘導した神経前駆細胞を移植し、生着率および神経突起数を蛍光顕微鏡観察により解析した。

新生児 HIE に対する NSP の神経保護効果を検証し、そのメカニズムを明らかにするため、生後 8 日齢の C57BL/6J マウスの総頸動脈および外頸動脈を結紮した後、低酸素チャンバーに 40 分間マウスを入れ、新生児 HIE モデルを作製した。NSP（または人工脳脊髄液）を脳室内に単回投与した後、脳障害レベルを抗 CD68 抗体あるいは抗 NeuN 抗体を用いた免疫組織染色により評

価した。また、Western blotting により酸化ストレスマーカーの発現量を解析した。

4. 研究成果

MCAO 脳梗塞モデルマウスの脳室内に NSP を単回投与し、脳梗塞巣のサイズを測定した結果、既に国内外で報告されている通り、NSP 投与により脳梗塞巣のサイズが有意に減少することが確認された。本研究課題の海外共同研究者である Molnár 教授グループおよび Lei Shi 教授グループにより、無酸素無糖条件において、大脳皮質由来神経細胞からの NSP 分泌が抑制されることが明らかとなった。さらに、NSP が脳梗塞後の ER ストレスを抑制することが明らかになり、NSP の神経保護効果における新たなメカニズムが示された [Lei and Molnár et al. *Neural. Regen. Res.* 2024, Accepted; 共著者]。一方、脳梗塞マウスの内因性神経新生における $\alpha 2AP$ の関与を明確にするため、 $\alpha 2AP$ 欠損マウスおよび野生型マウスに対して、光化学誘発性脳梗塞を作製し、脳室下帯において新生した神経細胞数を解析した。その結果、両遺伝子型マウスにおいて、梗塞側の脳室下帯における新生神経芽細胞の数が、反対側に比して顕著に増加し、脳梗塞誘発 1 週間経過後の脳室下帯における新生神経芽細胞の数は、野生型マウスに比し $\alpha 2AP$ 欠損マウスで有意に増加していた。また、脳梗塞誘発 2 週間後には、脳梁および線条体における新生神経芽細胞の数が、野生型マウスに比し $\alpha 2AP$ 欠損マウスで有意に増加していた。さらに、新生した神経芽細胞が成熟神経細胞に分化し定着していることも示された。これらのことから、 $\alpha 2AP$ 欠損により脳梗塞後の神経新生が促進されることが示唆された。脳梗塞誘発から 1 週間経過後の梗塞巣周囲のミクログリアの数については、顕著な差はみられなかったが、ミクログリアの反応が非常に速いことを考慮し、今後、脳梗塞後 1 日あるいは 2 日後のミクログリア数を解析し、脳梗塞後のミクログリアの増殖や活性化に対する $\alpha 2AP$ 欠損の影響を明確にする。

さらに、同志社大学の西村周泰准教授の協力を得て、GFP 発現 ES 細胞を分化誘導することで大脳皮質神経細胞を得、 $\alpha 2AP$ 欠損マウスおよび野生型マウスに移植した。3 ヶ月後の移植細胞のグラフトサイズおよび定着細胞 (GFP 陽性神経前駆細胞あるいは成熟神経細胞) の数を解析した結果、予想に反して、両遺伝子型マウス間で顕著な差がみられなかった。一方、移植後に定着した神経細胞の突起数は、野生型マウスと比較して $\alpha 2AP$ 欠損マウスにおいて少ないことが明らかになり、脳内 $\alpha 2AP$ レベルが ES 細胞由来神経前駆細胞の移植後の成熟化に影響する可能性が示唆された [Kawashita et al. In preparation]。 $\alpha 2AP$ 欠損により、大脳皮質神経細胞の突起形成が抑制されることが示唆されたため、今後、野生型マウスへの神経細胞の移植後に、 $\alpha 2AP$ および抗 $\alpha 2AP$ 中和抗体を単回投与し、一過性の脳内 $\alpha 2AP$ レベルの変化が移植細胞の生着性に及ぼす影響を解析する必要がある。

新生児 HIE に対する NSP の神経保護効果の検証とそのメカニズムの解明を目的に、生後 8 日齢の C57BL/6J マウスを用いて新生児 HIE モデルを作製した後、NSP を脳室内に単回投与し、脳障害レベルを評価した。その結果、軽度 HIE マウスでは、NSP の単回投与により大脳皮質傷害が抑制されたのに対して、重度 HIE マウスでは、NSP による脳保護効果はほとんどみられなかった。また、HI 誘発 24 時間後に大脳における酸化ストレスマーカーの発現量を Western blotting により解析したところ、HI 誘発性の酸化ストレスが NSP 投与により有意に抑制されることが明らかになった。これらのことから、少なくとも軽度の新生児 HIE においては、NSP が酸化ストレスの抑制を介して、神経保護効果を発揮することが示唆され、新生児 HIE に対する創薬標的分子として NSP が有用である可能性が示された [Kawashita and Molnár et al. In preparation]。しかしながら、重度 HIE に対する神経保護効果が NSP の単回投与ではみられなかったことから、新生児 HIE の重症度に合わせた NSP の投与条件の確立が今後の課題であると考えている。

本共同研究において、脳梗塞および新生児 HIE における脳傷害が、NSP 投与により有意に抑制され、そのメカニズムとして、NSP による ER ストレスや酸化ストレスの軽減が示唆された。一方、脳梗塞後の脳室下帯における神経芽細胞の増殖が $\alpha 2AP$ 欠損により促進されたことから、 $\alpha 2AP$ の機能抑制による神経新生の促進効果が示唆された。この研究成果は、内因性神経新生の促進による神経機能障害の回復を狙った創薬標的分子としての $\alpha 2AP$ の可能性を前向きに推進する。本研究により、脳梗塞および新生児 HIE に対する NSP 投与および $\alpha 2AP$ 欠損の単独効果は明らかになったが、コンビネーション効果を検証するには至らなかった。今後、これを明確にし、脳梗塞および新生児 HIE を含む虚血性疾患における neural replacement の高効率化を実証する。本研究成果は、脳梗塞に留まらず中枢神経変性疾患に対する神経再生療法、および幹細胞を用いた細胞治療への応用など幅広く貢献することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Auguste Vadasiute, Elise Meijer, Florina Szab, Anna Hoerder-Suabedissen, Eri Kawashita, Shuichi Hayashi, Zoltan Molnar.	4. 巻 82
2. 論文標題 The role of snare proteins in cortical development.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Dev. Neurobiol. (Review)	6. 最初と最後の頁 457-475
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/dneu.22892.	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 該当する

1. 著者名 Yumei Liao, Qinghua Zhang, Qiaoyun Shi, Peng Liu, Peiyun Zhong, Lingling Guo, Zijian Huang, Yinghui Peng, Wei Liu, Shiqing Zhang, Istvan Adorjan, Yumi Fukuzaki, Eri Kawashita, Xiao-Qi Zhang, Xiaoshen Zhang, Zoltan Molnar, Lei Shi	4. 巻 -
2. 論文標題 Neuroserpinalleviatescerebralischemia/reperfusioninjuryb ysuppressing ischemia-induced endoplasmic reticulumstress.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Neural. Regen. Res.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 該当する

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 西村美紅, 河下映里, 永井信夫, 石原慶一, 井上和奏, 宮崎優奈, 松尾 理, 秋葉 聡.
2. 発表標題 脳梗塞後の神経新生における 2-antiplasminの関与
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 三崎友菜, 河下映里, 西村周泰, 石原慶一, 野口鈴華, 高田和幸, 松尾 理, 秋葉 聡.
2. 発表標題 移植神経前駆細胞の生存と成熟化における 2-アンチプラスミンの関与の検討
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 河下映里.
2. 発表標題 セルピンによる脳機能調節と虚血性脳疾患治療への展開
3. 学会等名 第6回Neuro-Vascular 研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Eri Kawashita, Jan Fischer, Yumi Fukuzaki, Lancelot Millar, Peiyun Zhong, Anna Hoerder-Suabedissen, Lei Shi, Zoltan Molnar.
2. 発表標題 Neuroprotective effect of neuroserpin in a mouse model of neonatal hypoxic-ischaemic encephalopathy
3. 学会等名 Neuro 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Eri Kawashita, Jan Fischer, Yumi Fukuzaki, Lancelot Millar, Peiyun Zhong, Anna Hoerder-Suabedissen, Lei Shi, Zoltan Molnar.
2. 発表標題 Neuroserpin as a promising candidate for neuroprotection in neonatal hypoxic-ischaemic encephalopathy
3. 学会等名 Cortical Development Conference 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Eri Kawashita, Jan Fischer, Yumi Fukuzaki, Lancelot Millar, Peiyun Zhong, Anna Hoerder-Suabedissen, Lei Shi, Zoltan Molnar.
2. 発表標題 Neuroserpin as a promising candidate for neuroprotection in neonatal hypoxic-ischaemic encephalopathy
3. 学会等名 Cortical Development Conference 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Eri Kawashita, Jan Fischer, Yumi Fukuzaki, Lancelot Millar, Peiyun Zhong, Anna Hoerder-Suabedissen, Lei Shi, Zoltan Molnar
2. 発表標題 Neuroprotective effect of neuroserpin in a mouse model of neonatal hypoxic-ischaemic encephalopathy
3. 学会等名 Neuro 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小高春香, 河下映里, 永井信夫, 石原慶一, 井上和奏, 宮崎優奈, 松尾 理, 秋葉 聡.
2. 発表標題 2-アンチプラスミン欠損による脳梗塞後の神経芽細胞の産生と移動の促進
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡村萌子, 河下映里, 石原慶一, 依馬正次, 松尾 理, 秋葉 聡.
2. 発表標題 脳血管形成における 2-アンチプラスミンの関与
3. 学会等名 日本薬学会第144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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	モルナー ゾルタン (Molnar Zoltan)	オックスフォード大学・生理解剖遺伝学部門 (DPAG)・教授	

	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
その他の研究協力者	永井 信夫 (Nagai Nobuo) (90260281)	長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授 (34204)	
その他の研究協力者	西村 周泰 (Nishimura Kaneyasu) (90527889)	同志社大学・研究開発推進機構・准教授 (34310)	

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		
英国	オックスフォード大学	Dept. of Physiol., Anat. and Genetics	
中国	暨南大学	JNU-HKUST	