

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 6 月 1 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21591106

研究課題名（和文） セレクチンを標的とするリポソームを用いた脳虚血での血管内皮細胞活性化機構の解析

研究課題名（英文） An analysis of endothelial activation under cerebral ischemia using liposomes, which targets E-selectin.

研究代表者

脇田 英明 (WAKITA HIDEAKI)

藤田保健衛生大学・医学部・内科・教授

研究者番号：80416172

研究成果の概要（和文）：Sialyl Lewis X を表面に結合させたリポソームは脳虚血部位に選択的に集積する。このリポソーム内に炎症を制御する薬物を内包し、血管内皮細胞に発現する炎症関連因子を制御した。リポソームの薬物内包の有無では、虚血性細胞死、炎症制御に関する量的、質的な差は認めず、リポソームの細胞接着分子制御が虚血性細胞死抑制の主要なメカニズムであると考えられた。リポソーム自体が、炎症反応制御、脳虚血細胞死の強い抑制効果を持ち、脳虚血治療法として有望であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：A novel liposome conjugated to Sialyl Lewis X (SLX-liposome), which targets E-selectin has been developed. In this study, we investigated the capacity of SLX-liposome containing anti-inflammatory agent for neuroprotection in cerebral ischemia using a rat model of transient middle cerebral artery occlusion (TMCAO). SLX-liposomes blocked E-selectin on luminal endothelium and attenuated infarct volume after TMCAO. These results suggest that SLX-liposomes have the potential for the treatment targeted to endothelial cells in acute ischemic stroke.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、神経内科学

キーワード：神経分子病態学、脳血管障害、炎症

1. 研究開始当初の背景

脳虚血で誘導される血管内皮細胞の活性化は、白血球浸潤等の虚血後炎症反応の起点となる反応で、E-selectinは活性化血管内皮細胞に選択的に誘導される細胞接着分子である。E-selectinは非活性化状態の血管内皮細胞には発現せず、炎症性サイトカインの

刺激等により活性化された血管内皮細胞に発現する。血管内皮細胞表面のE-selectinと白血球細胞膜上のリガンド糖鎖のSialyl Lewis Xとが結合することで、白血球の脳内浸入という一連の反応が開始され、脳虚血に引き続く組織障害性の炎症反応が進行する。これらの特徴からE-selectinは脳虚血部

位に薬物を運ぶ標的となるとともに、脳虚血による組織障害性炎症反応に対する有力な治療対象となると考えられている。

E-selectinのリガンド糖鎖であるSialyl Lewis Xを表面に結合したリポソーム (Sialyl

Lewis X結合リポソーム) をラット局所脳虚血モデルに投与し、脳内での分布を蛍光イメージングシステムと蛍光顕微鏡にて観察した所、Sialyl Lewis X結合リポソームの虚血部位内の血管内皮細胞への集積が確認され、Sialyl Lewis X結合リポソームは、脳虚血部位のE-selectinを発現している活性化血管内皮細胞に選択的に薬物を運ぶ有力なドラッグデリバリーシステムであると考えられた。血管内皮細胞活性化の分子機構を培養細胞系で解明する研究は今までに数多く行われているが、生体内で選択的に薬物投与する方法がなかったため、生体内条件下で、どのような分子がどのような役割を持つのかを解明することが困難であった。脳虚血におけるE-selectinを発現している活性化血管内皮細胞に選択的に薬物を運ぶドラッグデリバリーシステムとして、Sialyl Lewis X結合リポソーム以外に報告はなく、本研究は活性化血管内皮細胞に発現される特定の分子を生体内で促進または阻止、制御する初めての試みである。Sialyl Lewis X結合リポソームを用いることで、活性化血管内皮細胞における特定の分子を生体内で促進または阻止、制御することができるため、従来の方法では解明できない生体内における血管内皮細胞活性化の分子機構を解明する研究である。さらに、Sialyl Lewis X結合リポソームをドラッグデリバリーシステムとして用いた脳虚血の治療への応用の可能性についてもあわせて検討できる。

2. 研究の目的

細胞接着分子E-selectinに対するリガンド糖鎖のSialyl Lewis Xを表面に結合させたリポソームは脳虚血での活性化血管内皮細胞がE-selectinを産生するため、活性化血管内皮細胞に選択的に集積する。このSialyl Lewis X結合リポソーム内に炎症を制御する作用を持つ薬物を内包し、活性化血管内皮細胞に選択的に薬物を送達し、活性化血管内皮細胞に発現する細胞接着分子や炎症関連因子等の特定の分子を生体内で促進または阻止、制御することで、脳虚血における血管内皮細胞活性化機構の生体内での役割を分子レベルで解明する。Sialyl Lewis X結合リ

ポソームをドラッグデリバリーシステムとして用いた脳虚血の治療への応用の可能性についてもあわせて検討することを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

ラットの中大脳動脈の閉塞による局所脳虚血・再灌流モデルを用いた。具体的方法としては、雄性Sprague-Dawleyラットを用い、吸入麻酔下において、血圧、体温、血液ガス等の生理データの管理下で、ナイロン栓子法により一過性局所脳虚血(120分)・再灌流モデルを作製した。虚血導入、再灌流の確認には、脳血流変化をレーザー脳血流計で測定する。再灌流後に炎症関連分子を生体内で制御する薬物を内包したSialyl Lewis X結合リポソームを大腿静脈より投与した。投与時期を変えた数群について、脳虚血を導入してから24時間後に安楽殺後、脳を取り出し、免疫組織化学を用いて脳内の細胞接着分子、炎症関連分子の制御の程度について時間的・空間的解析を行なった。さらに、cresyl violet染色を用いて脳梗塞巣の大きさを計測し、虚血後の各時期における標的制御蛋白の虚血障害に関わる役割を検討した。以上の成果を検討することで、炎症関連分子を生体内で制御する薬物を内包したSialyl Lewis X結合リポソームによる脳組織内での細胞接着分子、炎症関連分子の制御の程度について、最も効率の良い至適条件を決定した。決定された至適条件下において、炎症関連分子を生体内で制御する薬物を内包したSialyl Lewis X結合リポソームまたは薬物を内包していないSialyl Lewis X結合リポソームを大腿静脈より投与した。また、Sialyl Lewis X非結合リポソームについても同様の実験を行い比較した。脳虚血導入から24時間後に安楽殺後、脳内の細胞接着分子、炎症関連分子の制御の程度、神経細胞死の抑制効果、脳梗塞体積の解析を行なった。制御された炎症関連分子を中心とする生体内での脳虚血における炎症反応のカスケードを検討した。さらに、虚血後の各時期における炎症関連分子の虚血性神経障害に関する役割と、Sialyl Lewis X結合リポソームを用いた脳虚血治療の開発の可能性について検討を行なった。本研究で用いる遺伝子操作や動物実験については、所属機関の各専門委員会の許可、承認を受けて行なった。また、動物の処置にあたっては同委員会の規則を遵守し、倫理面に十分に配慮した動物の取り扱いを行なった。

4. 研究成果

炎症関連分子を生体内で制御する薬物を内包したSialyl Lewis X結合リポソームによ

る脳組織内での細胞接着分子、炎症関連分子の制御は再灌流直後から6時間後まで可能であることが明らかとなった。また、炎症関連分子を生体内で制御する薬物を内包した Sialyl Lewis X 結合リポソームと薬物を内包していない Sialyl Lewis X 結合リポソームの炎症制御に関する効果を比較した所、薬物を内包していない Sialyl Lewis X 結合リポソームにおいても、E-selectin の阻止効果を認め、ICAM-1 の発現、白血球脳内浸潤、グリア細胞の活性化が抑制された。そこで、炎症関連分子を生体内で制御する薬物を内包した Sialyl Lewis X 結合リポソーム、薬物を内包していない Sialyl Lewis X 結合リポソーム、Sialyl Lewis X 非結合リポソームそれぞれの炎症制御に関する質的、量的な比較を行った。Sialyl Lewis X 非結合リポソームと比較して、炎症関連分子を生体内で制御する薬物を内包した Sialyl Lewis X 結合リポソームと薬物を内包していない Sialyl Lewis X 結合リポソームは、ともに細胞接着分子 E-selectin の阻止効果を認め、血管内皮細胞での細胞接着分子 E-selectin の発現を機転とした ICAM-1 の発現、白血球脳内浸潤、グリア細胞の活性化につながる炎症反応を抑制することが明らかとなった。薬物内包の有無では、虚血性細胞死、脳梗塞体積、E-selectin の発現を機転とした ICAM-1 の発現、白血球脳内浸潤、グリア細胞の活性化につながる炎症反応に関する量的、質的な差は認めず、両者ともに細胞接着分子 E-selectin の接着阻止が虚血性細胞死抑制効果の主要なメカニズムであると考えられた。Sialyl Lewis X 結合リポソーム自体が、血管内皮細胞での細胞接着分子 E-selectin の発現を機転とした ICAM-1 の発現、白血球脳内浸潤、グリア細胞の活性化につながる炎症反応の制御、脳虚血細胞死の強い抑制効果を持ち、Sialyl Lewis X 結合リポソームによる細胞接着分子 E-selectin の接着阻止効果を用いた脳虚血治療法は有望であると考えられた。Sialyl Lewis X 結合リポソーム自体が強い抗炎症効果を持つため、内包薬物の抗炎症効果に対する有効性の評価に影響することも明らかとなり、今後は炎症反応以外のメカニズムに有効な薬物を内包することによる虚血性神経細胞死の制御についても検討が必要であると考えられた。研究成果により、生体内における血管内皮細胞活性化から脳内炎症反応に至る機構が解明されたばかりではなく、脳虚血治療の新しい試みとして、細胞接着分子 E-selectin の接着阻止効果を機転とした炎症反応を制御する Sialyl Lewis X 結合リポソームを用いた脳虚血の新規治療法への応用につながると考えられた。

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7件)

- ① Dental pulp derived CD31-/CD146- side population stem/progenitor cells enhance recovery of focal cerebral ischemia in rats. Sugiyama M, Iohara K, Wakita H, Hattori H, Ueda M, Matsushita K, Nakashima M. Tissue Engineering Part A. 17(9-10): 1303-1311, 2011 査読有 DOI: 10.1089/ten.tea.2010.0306.
- ② Watershed infarcts in a multiple microembolic model of monkey. Maki T, Wakita H, Mase M, Itagaki I, Saito N, Ono F, Adachi K, Ito H, Takahashi R, Ihara M, Tomimoto H. Neuroscience Letters 499(2): 80-83, 2011 査読有 DOI: 10.1016/j.neulet.2011.05.036
- ③ E-selectin targeting to visualize tumors in vivo. Hirai M, Hiramatsu Y, Iwashita S, Otani T, Chen L, Li YG, Okada M, Oie K, Igarashi K, Wakita H, Seno M. Contrast Media & Molecular Imaging 5(2): 70-77, 2010 査読有 DOI: 10.1002/cmmi.367
- ④ miRNA による E-selectin の抑制、吉崎嘉一、脇田英明、大隅典子、高橋慶吉、炎症と免疫 18 (2): 130-134, 2010 査読無

[学会発表] (計6件)

- ① 脇田英明、足立香代、武田和也、國本正子、渡邊淳、丸山和佳子
マウス血管性認知症モデルに対する Sialyl Lewis X 結合リポソームの有効性の検討
第29回日本認知症学会学術集会, 2010年11月5,6日, 名古屋
- ② 脇田英明
血管性認知症の実験モデル
第29回日本認知症学会学術集会 (シンポジウム1, 血管性認知症のニューホライズン)
2010年11月5日, 名古屋
- ③ 脇田英明、足立香代
E-selectin を標的としたリポソームによる細胞接着分子阻止とグリア細胞活性化の抑制
第51回日本神経学会総会, 2010年5月22日, 東京
- ④ 脇田英明、足立香代
セレクチンを標的としたリポソームによる細胞接着分子抑制効果の検討
第35回日本脳卒中学会総会, 2010年4月16日, 盛岡
- ⑤ 脇田英明、吉崎嘉一
マウス血管性認知症モデル白質病変での細胞接着分子発現とグリア細胞活性化の検討
第50回日本神経学会総会, 2009年5月22日, 仙台

6. 研究組織

(1) 研究代表者

脇田英明 (WAKITA HIDEAKI)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号：80416172

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：