

機関番号：11301  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2009～2010  
 課題番号：21791344  
 研究課題名（和文） 脳虚血後の神経細胞における細胞修復因子の発現動態に関する研究  
 研究課題名（英文） Expression of cellular protective factors in neuronal cells after cerebral ischemia  
 研究代表者 齊藤 敦志 (SAITO ATSUSHI)  
 東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師  
 研究者番号：60375053

研究成果の概要（和文）：脳虚血の原因となる頸動脈病変に注目し、細胞修復因子、動脈硬化促進因子として知られる Lectin-like low density lipoprotein receptor 1(LOX1)の発現、薬物送達指標としての有用性を明らかにすることを目的とした。研究の第一段階としてラット頸動脈プラークモデルを用いて頸動脈病変における LOX1 の発現動態を明らかにした。次に第二段階としてこの発現を target とした liposomal drug の drug delivery system を構築すべく、塩酸ファスジルを内包した liposomal drug の表面を抗 LOX1 抗体で修飾し経静脈的に投与を行った。頸動脈病変での liposomal drug の集積を組織学的に確認し、targeting drug delivery によりプラーク形成の抑制効果が有意に高まった

研究成果の概要（英文）：We focused on pathophysiological states of carotid atherosclerotic lesion as one of targets of cerebral ischemia. Our purposes were first, evaluation of expression of lectin-like low density lipoprotein receptor 1 (LOX1) in rat carotid plaque, second, establishment of targeting drug delivery system for carotid atherosclerotic lesion using LOX1. Liposomal fasudil conjugated with anti-LOX1 antibody on the surface was newly developed and selective accumulation of the new drug and effectiveness on inhibition of abrogation of carotid plaque. The new liposomal fasudil was specifically accumulated on the carotid lesion and plaque extension was significantly inhibited after intravenous administration of liposomal fasudil with LOX1 antibody.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：神経外科学分野

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：実験脳外科学

#### 1. 研究開始当初の背景

脳虚血は血流動態の改善が治療の重点となっており、therapeutic window がせまいことが問題のひとつとなっている。近年、tissue

plasminogen activator による血栓溶解療法が脳梗塞超急性期の一般的な治療となったがその適応には時間的な制限がある。超急性期治療の適応にはならない症例では抗血小

板療法や抗凝固療法を行うはいずれも血流改善を主眼においた治療法であり虚血にさらされた神経細胞の細胞保護に着眼して治療法は活性酸素の生成抑制などに限られている。脳虚血の細胞修復因子には細胞死調節因子の他様々な細胞伝達経路の調節因子が含まれる。細胞保護の細胞内伝達経路を明らかにし調節因子の発現を薬物投与などの方法で **extrinsic** に活性または抑制し調節することで細胞保護効果を高めることが可能となれば、虚血耐性の獲得にもつながり、新たな治療法の開発へ道が開ける。当初、我々は脳虚血モデルを用いた神経細胞におけるこれらの調節因子の発現動態を調べることを想定していたが、実験動物モデルが安定しないため、脳虚血の原因となりうる頸動脈プラークに主眼をおいた虚血治療方法の開発を研究対象とした。頸動脈プラークモデルを用いて血管損傷に関わる細胞保護調節因子の lectin-like low density lipoprotein receptor 1 (LOX1) の発現動態を調べ、選択的な薬物送達による新たな治療法の方の開発を研究課題とした。

## 2. 研究の目的

研究の第一段階としてはラット頸動脈プラークモデルをもちいて頸動脈病変における LOX1 の発現動態を明らかにすることを目的とした。この LOX1 の発現を標的とし、動脈硬化の抑制や血管壁の remodeling の安定化に有用性が報告されている塩酸ファスジルを liposome に内包し、表面に抗 LOX1 抗体を修飾した新たな liposomal drug を開発し、経静脈投与での頸動脈病変に対する選択的な薬物送達による治療法の開発を目的とした

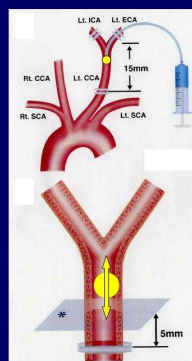
## 3. 研究の方法

### 頸動脈プラークモデル

ラットの頸動脈バルーン損傷モデルを使用して作成した。ラットはSDラット、250-350gを用いた。動物実験は動物取り扱い規約、倫理規定に従って実験を行った。全身麻酔下のラットの頸動脈分岐部を露出し外頸動脈からバルーン付きカテーテルを挿入して頸動脈分岐部におき inflation したバルーンを20回 douncing させて頸動脈内膜の機械的損傷を加えた。

### 方法

#### ラット頸動脈バルーンモデル



- ・バルーンの拡張により内膜を損傷
- ・内頸動脈分岐部から15mm中樞側まで
- ・侵襲から7日目に内膜肥厚を確認

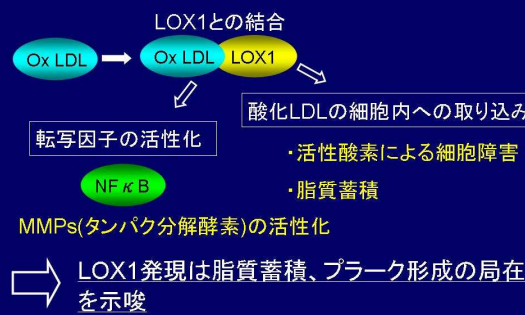
### 組織学的評価

手術侵襲から1, 3, 7, 14日目に頸動脈プラークサンプルを摘出し、ヘマトキシリン・エオジン染色によるプラーク形成の組織学的評価を行った。免疫染色法にタンパク質発現の空間的評価、Western blot 法による生化学的定量方法によって LOX1 の発現動態を解析した。

### Liposomal drug の開発

LOX1 抗体を liposome に結合、emersion 法によって塩酸ファスジルを liposome 内腔に内包させた。モデルラットの頸静脈を露出し経静脈的に targeting liposomal drug delivery を試みた。Liposomal drug を経静脈的に投与し、liposome の集積、プラーク抑制効果を免疫組織学的手法によって解析した。

### LOX1の細胞内伝達機構



LOX1との結合

Ox LDL → Ox LDL-LOX1

転写因子の活性化

NFκB

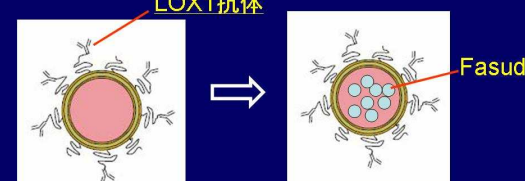
MMPs(タンパク分解酵素)の活性化

酸化LDLの細胞内への取り込み

- ・活性酸素による細胞障害
- ・脂質蓄積

LOX1発現は脂質蓄積、プラーク形成の局在を示唆

### LOX1抗体修飾liposomal Fasudilの合成



LOX1抗体

Fasudil

Diameter: 110nm  
Polyethylene glycol へのLOX1抗体結合

侵襲3日目に Fasudil 2mg x1 i.v.  
侵襲7日目に評価

#### 4. 研究成果

侵襲3日後にはプラークの形成が確認された。免疫組織学的検討によりプラーク内の中膜層を中心にLOX1の顕著な発現が確認された。Western blot法による定量的な解析でも侵襲後の有意なLOX1の発現増加が確認された。(Figure1)

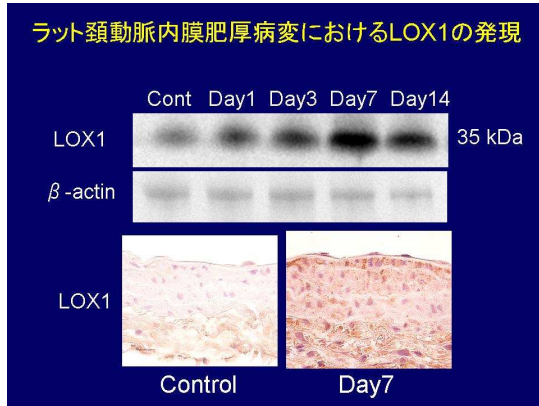


Figure 1

このLOX1を標的としたLOX1抗体修飾 liposomeを作成しliposome内に細胞保護効果が確認されている塩酸ファスジルを内包させて liposomal drugを開発した。予備実験として liposomeに蛍光色素DiIを内包させてLOX1修飾 liposomeをラットに経静脈内投与し体内分布を組織学的に評価した。LOX1の発現に特異的にLOX1抗体修飾 liposomeが集積することが確認された (Figure 2)。

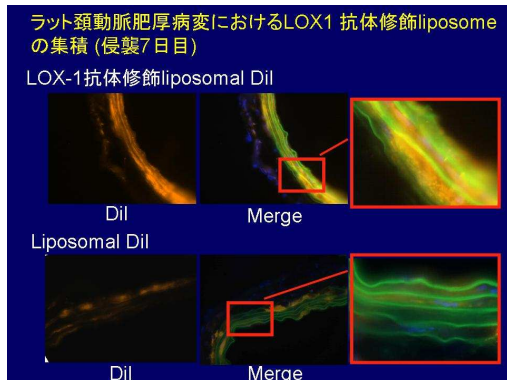


Figure 2

塩酸ファスジルを内包させた修飾 liposomal drugをラット頸動脈プラークモデルに経静脈投与した。LOX1の発現部位に特異的な liposomal drugの集積が確認され、プラーク形成抑制による細胞保護効果が確認された (Figure 3)。血管壁損傷や動脈硬化に伴っ

て発現の増加が確認されているmatrix metalloproteinase 9 (MMP9)の発現をWestern blot法で評価を行ったところLOX1抗体修飾 liposome製剤では有意なMMP9の発現の低下を認めた。

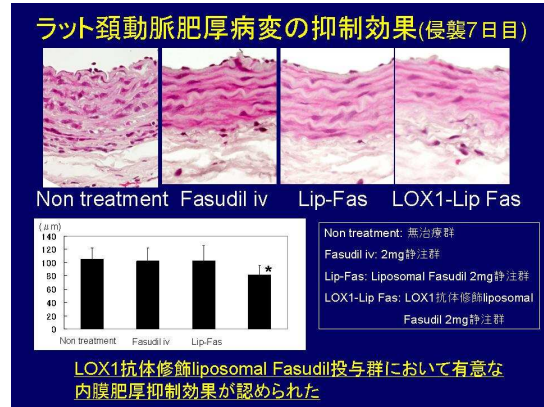


Figure 3

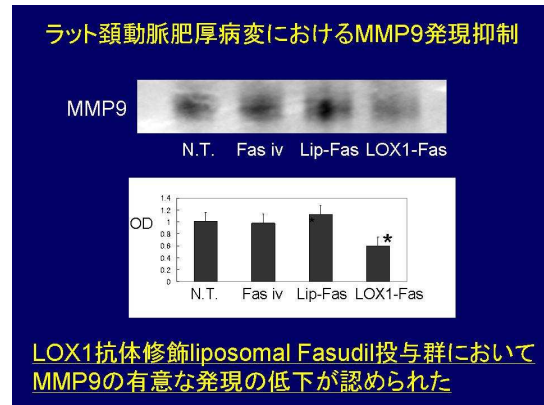


Figure 4

以上の結果からラット頸動脈プラーク病変においては LOX1 が損傷後に有意に増加すること、局所の LOX1 の発現を target とした LOX1 抗体修飾 liposome 製剤は経静脈投与により選択的に頸動脈の動脈硬化性病変に集積し塩酸ファスジルによるプラーク形成の抑制効果、MMP9 発現抑制を有意に示すことが明らかとなった。

#### 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 2 件)

1. Saito A, Fujimura M, Inoue T, Shimizu H, Tominaga T Relationship between lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 expression and preoperative echogenic

findings of vulnerable carotid plaque. Acta Neurochir (Wien). 2010;152(4):589-595 査読あり

2. Saito A, Fujimura M, Inoue T, Shimizu H, Tominaga T Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 and matrix metalloproteinase expression in ruptured and unruptured multiple dissections of distal middle cerebral artery: case report. Acta Neurochir (Wien). 2010 Jul;152(7):1235-1240. 査読あり

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 日本脳循環代謝学会総会  
頸動脈プラークに対する新たな drug delivery system の試み  
2010年11月26日 大阪

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織  
(1) 研究代表者

斉藤 敦志 (SAITO ATSUSHI)  
東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師  
研究者番号：60375053

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号：

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：