

## 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 25 年 4 月 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ～ 2012 年

課題番号：22790813

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・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。また局所脳虚血モデルへの炭酸リチウム投与はアポトーシスによる神経細胞死を抑制したが、この保護効果は従来報告されているAktの活性化を介していないことが示唆された。

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 reports because of the technical difficulty. Administration of lithium chloride after focal brain ischemia suppressed neurodegeneration through apoptosis. This protective effect was not related the activation of Akt.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

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。

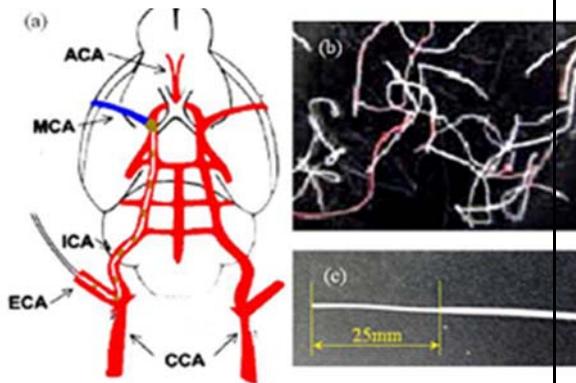
t-PAの副作用のメカニズムはAkt経路と関連が強く、Akt経路の活性化により抑制できる可能性が高いと申請者は考えている。リチウムの投与条件を最適化し、Akt経路にかかわる種々のタンパクの発現や酵素活性を検討することにより、t-PAとAkt経路の関連をより詳細に明らかにできる。さらにAkt経路の種々の活性化剤を同時に投与することで、リチウムによるt-PAの副作用を抑制する効果が高められるかも検討する。

## 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 1b, 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 1a)。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: 自家血栓による脳塞栓モデル)

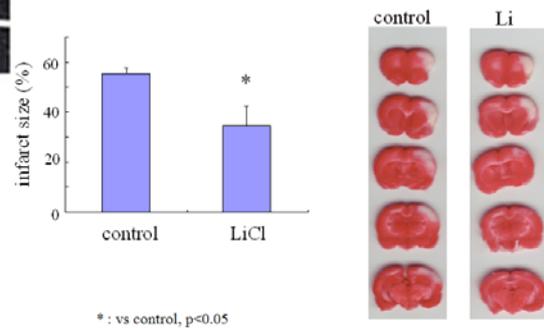
#### 4. 研究成果

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。

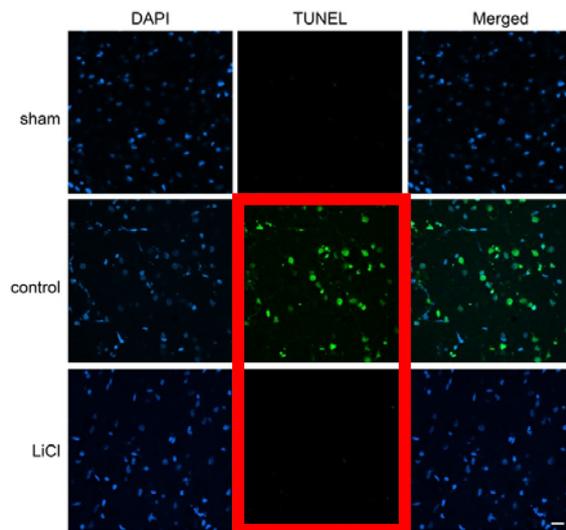
結果として、t-PAの脳虚血2時間後の投与で血栓溶解による梗塞体積の縮小効果を示し、また脳虚血4時間後のt-PA投与では出血性合併症の増加と死亡率の増加を示すという、きわめてヒトの脳塞栓症に対してのt-PAの治療効果と副作用をよく再現するモデルの作成に成功した。このような動物モデルは手技上の難しさから未だ使われる報告は少なく、本モデルの確立は今後本研究、ないし異なる薬剤を標的とした研究を行うにあたり大きな優位点と考えている。

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、2012 年 Aging and Disease 誌にて論文発表した。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 2,3 ) 。



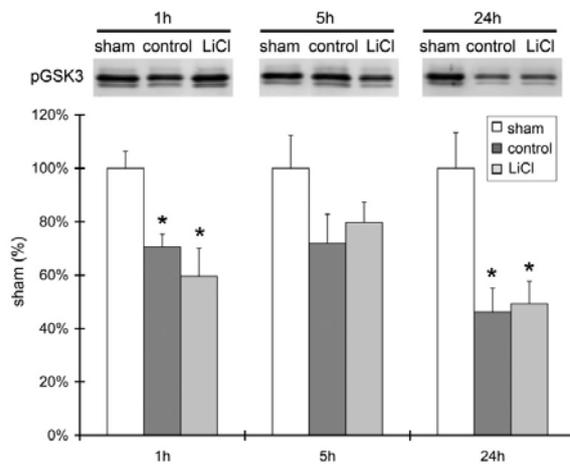
(図 2: リチウム投与により脳梗塞体積が縮小)



(図 3: アポトーシスによる神経細胞死を TUNEL 法で検討。リチウム (LiCl) 投与により TUNEL 陽性細胞が著明に減少する (赤枠内の上下 2 つで比較))

その保護メカニズムの 1 つとして、Akt 活性の変化が考えられるため、Akt 活性を 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 4)。



(図 4) リチウム投与による Akt 活性の変化：投与による有意な変化は見られなかった。

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、

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 活性の上昇、低下、不変それぞれの報告がある。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可能性がある。

2. リチウムは Akt を直接阻害せず、Akt 経路の下流の蛋白活性化を阻害することで Akt 経路の阻害、ひいては Akt 活性化を起こすとする報告が複数ある。しかしこれらはリチウムの慢性投与であり、本モデルの

ような脳虚血での急性期投与のみでは Akt 活性を変化させるには不十分である可能性がある。リチウムは Akt 以外にも成長因子など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。

## 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. Takahashi T, Steinberg GK, Zhao H. Lithium treatment reduces brain injury induced by focal ischemia with partial reperfusion and the protective mechanisms dispute the importance of akt activity. Aging Dis. 査読有り、3(3)、2012、226-33

[学会発表] (計 0 件)

[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：高橋 哲哉  
(TAKAHASHI TETSUYA)  
新潟大学・医歯学総合病院・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：