

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月22日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791582

研究課題名（和文） 新たな抗血栓薬の脳虚血超急性期への治療応用に関する研究

研究課題名（英文） New therapeutic strategy with SMTP for acute cerebral ischemia

研究代表者

斉藤 敦志 (SAITO ATSUSHI)

東北大学・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）：マウス脳虚血モデルを用いて SMTP の脳虚血再灌流障害における効果を検討した。SMTP の経静脈的投与によって有意な梗塞巣の縮小が確認され、脳血流量測定上、再灌流時の急激な血流増加を軽減し緩徐な血流回復をもたらすことが明らかとなった。脳虚血後の活性酸素による酸化反応、血管内皮細胞障害は SMTP によって有意に抑制されていた。SMTP は血栓溶解作用の他、抗酸化作用も有し脳虚血後の血管内皮細胞障害を抑制することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：We evaluated effectiveness of SMTP for acute cerebral ischemia using mouse transient focal cerebral ischemia model. SMTP was intravenously injected and successfully reduced size of cerebral infarction compared with the vehicle group. Cerebral blood flow analysis demonstrated that SMTP reduced remarkable increase of CBF after reperfusion and induced gradual CBF recovery. Superoxide production, radical reactive production and endothelial destruction marker was significantly reduced in SMTP-treated group compared with the vehicle group. Our results indicate that SMTP administration might induce not only fibrinolytic effectiveness, but also anti-oxidative injury after reperfusion due to transient cerebral ischemia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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

現在、わが国では脳梗塞は年間 1000 人に対して 4.7 人に発症し、単一臓器の致死疾患としてはわが国の No.1 の疾患と言って過言ではないが未だ決定的な病態の解明や治療法が確立していないのが現状である。2009 年の脳卒中治療ガイドラインでは脳梗塞治療のエビデンスが示され治療については脳虚血の発生原因に基づき血栓溶解剤、抗凝固剤、抗血小板薬、ラジカルスカベンジャー剤などが使い分けられている。このうち発症直後の超急性期における血栓溶解療法においては、組換え t-PA 製剤が強力な血栓溶解作

用を有し劇的な効果を上げる一方で、再灌流障害のひとつである出血性梗塞の副作用が高頻度にかかることから、その使用方法に厳しい制限があり脳梗塞患者全体のわずか 5% にしか用いられていない。発症から使用可能な時間幅が拡大でき、かつ出血性梗塞の併発といった再灌流障害の抑制効果を有する新薬の登場が待たれている。

Stachybotrys microspora triprenyl phenols (SMTP) は、東京農工大農学部発酵学研究室で開発された新たな内因性 plasminogen activator である。SMTP は、前駆体であるプラスミノゲンに直接作用してプラスミ

ンへの変換とフィブリンへの結合の両者を促進する。血栓あるいは細胞上に局在して生理的にプラスミンノーゲンを活性化する過程が tPA とは異なっており、新たに線溶系亢進作用の他に抗酸化作用、抗炎症作用が実験系で確認されており、脳虚血超急性期の血栓溶解だけでなく、虚血再還流障害に伴う活性酸素や炎症系細胞の活性化による細胞障害の抑制効果が期待できる。これらの作用機序から、SMTP は tPA を上回る安全性と治療の time window の拡大が期待されるが、脳梗塞の生体モデルを用いた研究結果に乏しく、SMTP の治療効果は明らかではない。

2. 研究の目的

脳虚血急性期の新たな治療法の開発に主眼をおき、新たに開発された血栓溶解剤の SMTP の脳虚血抑制及び再還流障害抑制の効果判定、同薬の作用機序の解明を目的とした。

3. 研究の方法

脳虚血実験動物モデルを用い、マウス脳虚血モデルにおける SMTP 投与後の神経細胞保護効果の評価を行った。SMTP 投与後の虚血脳サンプルを用いて梗塞巣の体積、脳血流動態の評価、活性酸素の生成への影響、血管内皮障害や酸化ストレス関連因子への影響を評価し SMTP の作用機序解明の研究を進めた。

4. 研究成果

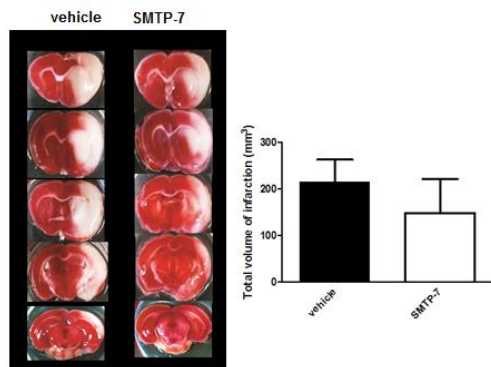


Figure1

マウス一過性脳虚血モデルを用いて、脳虚血侵襲直前から SMTP または vehicle の経静脈的に投与を行った。脳虚血再灌流障害後に脳を取り出し、脳切片に TTC 染色を行い梗塞巣の体積を比較。SMTP 投与群では vehicle 投与群と比較して有意な梗塞巣の縮小効果が確認された。

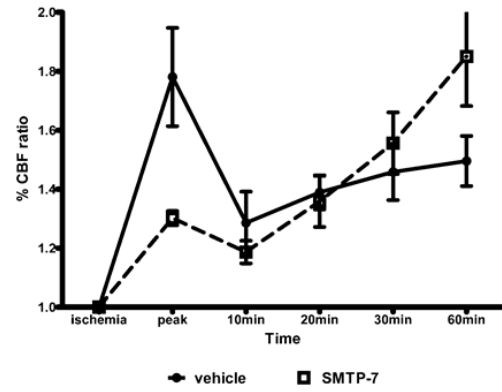


Figure2

脳表赤外線ドップラーによる脳血流量測定を行い、SMTP は虚血再灌流時の急激な血流増加を軽減し緩徐な血流の回復をもたらすことが明らかとなった。

酸化反応の指標となるnitrotyrosineの発現

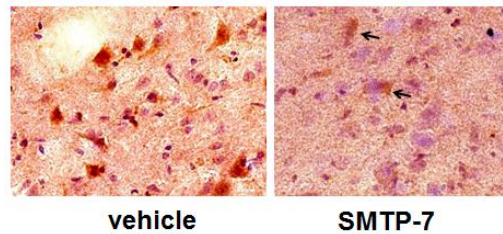


Figure3

免疫組織染色法によって nitrotyrosine の発現を解析。SMTP 投与群では顕著な発現低下を確認した

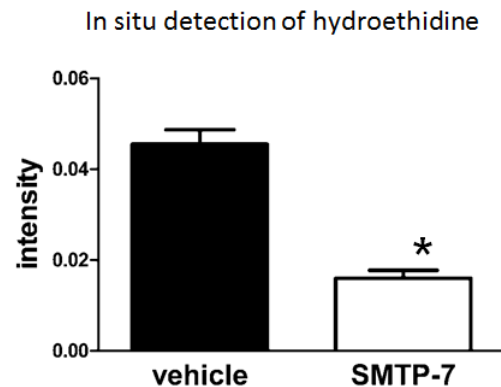


Figure4

Superoxide の生成を hydroethidine 投与後の脳の in situ detection によって計測。SMTP7 投与群では有意な hydroethidine 生成の抑制が確認された。Hydroethidin は superoxide 産生のマーカーであり、酸化 hydroethidin

は蛍光顕微鏡でも定性的に評価可能である。In situ detection に留まらず、脳切片を用いた組織学的評価においても、脳虚血再灌流時には、酸化 hydroethidin の顕著な発現が観察され、SMTP7 はこの発現を顕著に抑制していた。

上記の結果から、我々のグループでは、SMTP7 を脳虚血直前に経静脈的に投与することにより、脳虚血再灌流障害によってもたらされた脳梗塞巣の体積は有意に縮小された。

脳梗塞の原因としては脳虚血侵襲、再灌流障害の両者が影響するモデルであるが、我々は SMTP7 による血栓溶解作用自体よりも、再灌流障害に伴う血流再開時の脳血流量の動的な変化、再灌流時に生じる活性化障害の程度、その両者が影響する血管内皮細胞障害に注目し、以降の本研究を進めた。

脳血流量は頭蓋骨を穿頭し微小の赤外線プローブを脳表に設置し、脳虚血侵襲時、薬剤投与時、再灌流時の継時的な脳血流量変化を計測した。脳虚血前を対照として変化の増大を数値化した。虚血再灌流障害時には、顕著な脳血流の over shoot が特徴であるが、SMTP7 はこの再灌流直後に生じる脳血流量の回復を緩徐に進めていた。持続的な脳血流回復傾向によって、活性酸素による酸化反応と血管内皮細胞の物理的な障害が軽減された可能性もある。

活性酸素の生成は、hydroethidin の生成を指標とした。SMTP7 投与によって脳虚血域の活性酸素の生成が有意に抑制された結果が得られた。hydroethidin 以外にも nitrotyrosine の生成を酸化反応の指標として用いた。Nitrotyrosine は、tyrosine 残基の過酸化窒素産物による radical reaction の結果、産生されることが知られている。SMTP7 は活性酸素自体の生成、radical reaction の抑制をもたらすことが明らかとなった。また、血管内皮細胞障害の指標となる endothelin の生成についても組織学的評価とともに定量的評価を行い、SMTP7 による有意な抑制効果が明らかとされた。

以上の結果から、SMTP7 は広範で効率的な血栓溶解作用によって脳虚血侵襲自体だけでなく、再灌流障害時においても緩徐な脳血流量の回復と活性酸素産生の抑制をもたらし、その結果として脳保護効果が獲得できたものと考えられた。

SMTP7 のもつ緩徐な脳血流の回復と再灌流障害の抑制効果は、臨床上の急性期脳虚血における血栓溶解療法において2つの利点が考えられる。ひとつは虚血後の治療効果発現時間が従来の薬剤よりも延長できる可能性がある。虚血侵襲の時間がより長く加わると虚血領域の血管内皮細胞障害も程度が大きくなり、再灌流障害も強く生じてしまうが、こ

の損傷のメカニズムを SMTP7 は抑制し、治療反応時間を長くすることが期待できる。

2 つ目は虚血侵襲が重度に加わった領域への再灌流によって生じるであろう出血性梗塞の合併症を減少させる可能性である。活性酸素抑制効果と緩徐な血流回復による血管内皮細胞障害の抑制によって Blood brain barrier の障害も抑制効果が期待でき、血栓溶解療法の安全性を高めることが期待できる。

以上の点から、従来の血栓溶解に使用されていた tPA の効果とは異なり、発症から治療までの時間の延長や血栓溶解後の出血性梗塞の併発の抑制、再灌流に伴うラジカル反応の抑制効果が臨床で、期待できる。

本研究では SMTP7 の有する急性期血栓溶解療法における脳保護効果の一部が明らかになった。しかしながら、抗酸化作用の詳細な機序や、血栓溶解効率、SMTP7 の投与時期や投与量の工夫など、明らかにすべき点は山積しているのも現状である。今後の更なる研究によって、血栓溶解の効率性、再灌流障害に対する別の視点からの機序が解明されれば、SMTP7 の臨床応用への有用性と安全性が明らかになると期待される。

今回、明らかになった SMTP7 のフリーラジカル反応の抑制効果は虚血再灌流障害においては重要な位置を占めている。虚血領域への緩徐な血流再開が可能であれば再灌流障害自体は緩和されるが虚血領域への早期の酸素供給、エネルギー供給もまた、必要である。血流は早期から緩徐に回復しつつ、再灌流に伴うフリーラジカル反応を抑制することが脳虚血超急性期治療の課題であり、現状では、血圧管理やラジカルスカベンジャーの併用によってコントロールされているが両者の両立は容易ではない。虚血侵襲から早いものでは再灌流障害をきたしにくいという基礎研究のデータの蓄積から血栓溶解療法の適応は決定され、発症時刻による厳密な制限が必要であるのが現状といえる。さらに血栓溶解剤の投与後に血流回復の程度を調節することは困難であり、循環動態の面からの調節とラジカルスカベンジャーによる細胞保護効果に期待しながら再灌流障害を予防している。SMTP7 のフリーラジカル反応の抑制機構は未だ不明である。虚血侵襲後の循環障害に陥った末梢血管において、緩徐な血栓溶解を促している可能性は示唆されるが、その緩徐な血栓溶解作用こそが再開後の over shoot を抑制し、二次的にフリーラジカルの産生を抑制している可能性もある。

今後、フリーラジカル産生の抑制機序が明らかとなり、血流回復による細胞保護効果とのバランスが明らかとなれば、SMTP7 は理想的な血栓溶解剤として脳虚血の超急性期治療に応用できることが期待できる。また、

虚血侵襲から投与までの最適な時間配分があきらかとなれば一層の効果が発揮できると考えられる。

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. Akamatsu Y, Saito A et al. Stachybotrys microspora triprenyl phenol-7 (SMTP-7) attenuates reperfusion injury after transient focal cerebral ischemia in rats Neuroscience Letter 503:110-114, 2012 (査読あり)

[学会発表] (計 1 件)

1. Akamatsu Y, Saito A, et al. Stachybotrys microspora triprenyl phenol-7 (SMTP-7) attenuates reperfusion injury after transient focal cerebral ischemia in rats. Brain 11, Barcelona, Spain, May24-28, 2011

6. 研究組織

(1) 研究代表者

斉藤 敦志 (SAITO ATSUSHI)

東北大学・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：