

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500423

研究課題名(和文) 虚血性脳損傷による血液脳関門機能破綻に対する抗酸化ペプチドの保護作用

研究課題名(英文) Protective effect for antioxidative peptide against disruption of blood brain barrier induced ischemic injury

研究代表者

卜部 貴夫 (Urabe, Takao)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：60291663

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、虚血性大脳白質障害の増悪の病態に抗酸化ペプチドであるアドレノメデュリン(AM)の欠損が関与することを明らかにした。

AMが欠損すると酸化ストレスや炎症反応が増強し大脳白質障害が悪化する。それと共に、オリゴデンドロサイト前駆細胞の減少を認め、オリゴデンドロサイトの増殖・分化機能の破綻が、大脳白質障害の増悪の要因となることが確認された。この病態は加齢による慢性的な高血糖状態の下でさらに増強し、特に血管内皮細胞の障害が関与することが明らかとなった。

AMが虚血性大脳白質障害に対して保護的作用を有し、障害の増悪因子である加齢による高血糖に対しても防御的作用を示すことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study demonstrated that ischemic white matter injury was increased in adrenomedullin (AM) deficiency, which induced oxidative stress.

We indicated that adrenomedullin downregulation results in increase in oxidative stress after cerebral hypoperfusion in mice cerebral white matter. Oxidative stress was detected in oligodendrocytes, with a larger increase in the AM deficiency group. The number of oligodendrocyte progenitor cells gradually increased after prolonged hypoperfusion, whereas oligodendrocytes decreased following a transient increase, but the ratio of increase was mild in the AM deficiency group.

White matter injury was more exacerbated because of hyperglycemia in aged AM deficiency group. The results indicated that adrenomedullin may be an important target in the control of ischemic white matter injury.

研究分野：神経内科学

キーワード：アドレノメデュリン 抗酸化ペプチド 虚血性大脳白質障害 酸化ストレス 高血糖 加齢 脳保護 認知障害

1. 研究開始当初の背景

世界一の超長寿社会を迎えているわが国において、長期にわたる老年期をいかに健全に過ごすかが問われる世の中になっている。現代社会の大きな社会問題として、様々の原因による寝たきり介護者の増加が挙げられるが、寝たきり状態となる原因疾患としては脳血管障害後遺症が約 4 割を占め、その中でも脳血管性認知症が重要な位置を占めている。本邦における認知障害性疾患は、近年アルツハイマー病の頻度の増加が指摘されているが、脳血管障害後の発症や脳血管性認知症との合併さらには糖尿病の関与が問題となっている。このような観点からアルツハイマー病も広い意味では血管病の範疇に位置づけられるともいえる。

また、近年の画像診断の飛躍的な進歩により神経症状を来さない程度の微小脳出血 (microbleeds) が検出可能となり、虚血病変のみならず出血病変がアルツハイマー病や血管性認知症の発症・進展に関わるといった新たな知見が明らかになりつつある。虚血損傷に伴う出血の病態としては、血管内皮細胞とアストロサイトなどにより構成される vascular unit である血液脳関門 (Blood brain barrier: BBB) の機能破綻の関与が注目されている。さらに出血性脳病変の発症は、脳損傷を増悪させる重要な合併症である。現在国内において広く普及している脳梗塞超急性期患者に対する組織プラスミノゲンアクチベーター (rt-PA) による血栓溶解療法は、有効性もさることながら症候性頭蓋内出血の合併頻度も約 6% と決して低い数字ではない。さらに再発予防に用いられる各種抗血小板薬や抗凝固薬においても出血は重要な合併症として認知されている。虚血性脳損傷による BBB 機能破綻には酸化ストレスによる血管内皮機能障害が重要な要因として挙げられる。血管内皮細胞におけるこれら傷害性因子に対する防御機構に降圧ペプチドであるアドレノメデュリン (adrenomedullin: AM) が重要な役割を示すことが明らかにされている。さらに脳組織の中でも血管内皮細胞は AM の主な産生部位であることから、脳損傷における重要な標的分子であると考えられる。

AM は 1993 年にヒト副腎由来の褐色細胞腫から単離された循環調節ペプチドであり、降圧作用のみならず臓器保護作用を有することが明らかにされてきた。AM の臓器保護作用に関しては、分担研究者の下澤らが確立したアドレノメデュリンノックダウン (AM^{+/-}) マウスの解析より、酸化ストレスに対し内因性の抗酸化物質として作用を発揮していることが証明されている (Shimosawa T et al: *Circulation* 105: 106-111, 2002)。さらに AM^{+/-} マウスの高齢モデルでは肥満になるとともに酸化ストレスが亢進し臓器障害を示すようになることを見出し、AM が酸化ストレスから生体を保

護する作用を担っていることが明らかにされている。われわれも高齢 AM^{+/-} マウスの脳組織変化の評価を実施しており、加齢に伴い白質障害が顕著になることに着目している。脳虚血に関しては、AM^{+/-} マウスでは梗塞周辺部での脂質過酸化代謝産物蓄積と酸化的 DNA 障害が増強していることを明らかにし、cAMP と proteinkinase A (PKA) の産生が野生型に比べ有意に低下することを確認した。以上のことから AM は cAMP - PKA シグナル伝達系を促進することで酸化ストレスを制御しており、特に脳虚血下で AM が欠損した状況では酸化ストレスが増強し、脳梗塞が進展・増悪することを明らかにした (Miyamoto N et al: *J Cerebral Blood Flow & Metab* 29: 1769-1779, 2009)。

さらに本研究を進めるなかで、AM^{+/-} マウスの脳梗塞モデルでは高頻度に脳内出血合併症を来すことを見出している。AM の興味深い作用として BBB を構成する血管内皮細胞から AM が産生され、血管内皮細胞の機能維持に深く関わっていることも明らかにされており (Kis B et al: *J Neuroendocri* 14: 283-293, 2002)、AM 欠損での出血合併の原因として BBB 機能破綻が強く関与することが考えられた。またわれわれは、慢性脳低灌流モデルの虚血負荷早期において、血管内皮細胞機能が障害され BBB 機能破綻により血管内物質が脳実質内への漏出することを証明している (Ueno Y et al: *Neuroscience* 162: 317-327, 2009)。このように虚血の程度は様々であったとしても、虚血侵襲により BBB 機能が破綻し、AM がこの機能破綻に対し防衛的に作用することが明らかにされつつある。

われわれは既に下澤らと共同で、AM^{+/-} マウスでの急性期脳梗塞モデルによる検討を行い、AM が cAMP - PKA シグナル伝達系を促進することで酸化ストレスを制御し、とくに脳虚血下で AM が欠損した状況では酸化ストレスがさらに増強し、脳梗塞が進展・増悪することを証明している (Miyamoto N et al: *J Cerebral Blood Flow & Metab* 29: 1769-1779, 2009)。さらに AM^{+/-} マウスの脳梗塞モデルでは高頻度に脳内の出血合併症を来すことを見出している。以上の研究成果をもとにして、本研究では虚血性脳損傷による出血性障害と認知障害のメカニズムに関して、酸化ストレスと血管内皮細胞機能障害による BBB 機能破綻のメカニズムを明らかにし、出血合併の制御機構の探索を進めていく。さらに脳虚血モデルにおける BBB 障害に対して AM を投入することによる白質障害抑制効果と認知障害の改善効果を評価し、出血合併制御の視点での検討を加える。また将来的な臨床治療への応用に向け解剖学的構造がよりヒトに近いミニブタでの検討を加え、ペプチドの有効な投与方法として超音波技術を利用したバブルリポソームを用いた新規のデリバリーシステムの導入も進めるこ

とで、いまだ治療法が確立されていない血管病としての認知症に対する新たなペプチド治療が確立されることが期待できる。

2. 研究の目的

以上の学術的背景から、本研究は虚血性脳損傷による出血性障害と認知障害のメカニズムに関して、抗酸化ペプチドを標的分子として酸化ストレスや炎症反応による白質障害とBBB機能破綻の病態との関連を解明し、ペプチドを利用した防御法の確立を目標として立案した独創性の高い内容である。さらには将来的な臨床治療への応用に向け解剖学的構造がよりヒトに近いミニブタでの検討を加え、ペプチドの有効な投与方法として超音波技術を利用した超音波造影ガスを封入したりポソームであるバブルリポソームを用いた新規のデリバリーシステムの導入も検討する。

3. 研究の方法

(1) マウスの脳虚血モデルの作製

マウス中大脳動脈閉塞・再灌流モデル：ナイロン糸を使用した中大脳動脈閉塞・再灌流モデルは広く使用されており、本モデルを用い、大脳白質の急性虚血による障害を免疫組織化学的に評価する。BBBの形態変化を免疫組織化学的に評価し、電子顕微鏡レベルでの詳細な検討を加える。

マウス慢性脳低灌流モデル：ラットを用いた両側総頸動脈結紮による慢性脳低灌流モデルの作成は京都大学グループとわれわれのグループにおいて既に確立されており、本モデルを用いた白質障害に関する研究成果はStroke誌に発表している(Watanabe T et al: Stroke 37, 1539-1545, 2006)。ラットと同様にマウスの白質障害は両側総頸動脈狭窄による慢性脳低灌流により作成することが可能である。マウスモデルに関してはShibata Mら(Stroke 38: 2826-2832, 2007)により特殊なマイクロコイルによる確実な両側総頸動脈狭窄の作成により確立されている。本モデルを用いてアドレノメデュリンとその受容体の脳内分布と経時的発現変化を免疫組織化学的に評価する。さらにBBBの形態変化を免疫組織化学的に評価し、電子顕微鏡レベルでの詳細な検討を加える。

(2) AM+/-マウスの脳虚血モデルの作製

AM+/-マウスの中大脳動脈閉塞・再灌流モデル：われわれは既に本モデルにおいてAMがcAMP-PKAシグナル伝達系を促進することで酸化ストレスを制御し、とくに脳虚血下でAMが欠損した状況では酸化ストレスがさらに増強し、脳梗塞が進展・増悪することを証明している。さらにAM+/-マウスの脳梗塞モデルでは高頻度に脳内出血合併症を来すことを見出している。AMは正常脳においてBBBを構成する血管内皮細胞から産生され、血管内皮細胞の機能維持に深く関わっている。

BBBの形態変化を免疫組織化学的に評価し、電子顕微鏡レベルでのBBBの各コンパートメントについて詳細な検討を行う。

AM+/-マウスの慢性脳低灌流モデル：Shibataら(Stroke 38: 2826-3282, 2007)の作製方法に従い慢性脳低灌流モデルを作製する。急性モデルと同様に脂質過酸化代謝産物と酸化的DNA障害脳内蓄積と白質障害の変化関連を免疫組織化学的に評価し、BBBの形態変化を電子顕微鏡で詳細に検討し出血病変の有無および程度を解析する。

(3) 血液脳関門(BBB)機能の評価

われわれは、エバンスブルーによるBBB機能評価法を確立しており、慢性脳低灌流モデルの虚血負荷早期に血管内皮細胞機能が障害されBBB機能破綻により血管内物質が脳実質内への漏出することを報告している(Ueno Y et al: Neuroscience 162: 317-327, 2009)。本手法を用いAM+/-マウスの急性虚血モデルと慢性虚血モデルでのBBB機能の評価を行う。

(4) In vivo 脳虚血モデルによるアドレノメデュリンの検討

アドレノメデュリンノックダウンマウスの大脳皮質神経細胞と血管内皮細胞の培養系を作製する。両培養系に低酸素負荷による細胞障害を惹起させ、AMのシグナル伝達に関与するcAMPを測定し、酸化ストレスマーカーや細胞死のマーカーで評価を行う。さらにアドレノメデュリンを添加することによる効果を同様に評価して比較検討する。

(5) 高齢AM+/-マウスにおけるBBB機能の評価

高齢AM+/-マウスの急性脳虚血モデルおよび慢性脳虚血モデルを作製し、とくにBBB機能に焦点を絞った解析を行う。出血病変について免疫組織化学的に評価し、電子顕微鏡レベルでのBBBの各コンパートメントについて詳細な検討を行う。さらに機能評価はエバンスブルーを用いて実施する。以上の結果を成獣AM+/-マウスの結果と比較し、加齢に伴う出血病変の増悪の有無を脳内AM産生量と組織内分布の変化に付いてタンパクおよびmRNAレベルでの検討を加える。

(6) マウスを用いた抗酸化ペプチド治療

AMはペプチドであるため生体への投与方法には直接の経口投与での体内移行は不可能のため、投与方法の工夫が必要である。マウス脳室内または髄腔内への直接投与を行い、免疫組織化学的に詳細を検討する。

(7) ミニブタ脳虚血に対するペプチド治療

ミニブタにおける局所脳梗塞モデルはTanaka Mらの報告(Stroke 2008; 39: 205-212)に準じて作製する。ミニブタの脳梗塞モデルに対して抗酸化ペプチドの治療効果を検討するために、その効率のよい投与経路と投与方法を検討する。臨床応用を念頭に

置いた場合には投与経路としては、経口、経皮、経静脈または、経動脈が可能であるが、モデルにおける効果を確認するために脳室内や髄腔内への直接投与との検討も行う。投与方法は対象物質がペプチドであるために安全かつ有効なデリバリーシステムの活用が必要であるため、超音波技術を利用した超音波造影ガスを封入したリポソームであるバブルリポソームを用いた新規デリバリーシステムを用いた投与の有効性を検討していく。

4. 研究成果

(1)急性脳虚血モデルでの検討：野生型マウスおよびアドレノメデュリンノックダウンマウスの脳虚血モデルを用いて、血管内細胞障害に関して免疫組織化学的に比較検討を行った。正常マウスにおけるアドレノメデュリン受容体の局在を免疫組織化学的に検証した。その結果、血管内皮細胞と神経細胞に局在することを確認した。特に脳内の血管では実質内の毛細血管に広く局在しており BBB の血管側での機能を有することが示唆された。加齢マウスを用いて BBB の構成に関わっているアストロサイトの経時変化も検討した。アストロサイトは成獣マウスにおいて加齢により発現が低下する。さらに虚血負荷による反応性は若年群に比して加齢群で低下することを確認した。アドレノメデュリンノックダウン (AM+/-) マウスの脳虚血モデルを作製し血管内皮細胞機能と BBB に関して検討を行った。AM+/- マウスの急性脳梗塞モデルでは高頻度に脳内出血が合併することを見出している。

(2)慢性脳低灌流モデルでの検討：慢性低灌流モデルでは時間経過とともに大脳白質障害が進行し、血管内皮細胞における誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) の合成が増加し、各種酸化ストレスマーカーと炎症マーカーが増加することを確認した。AM+/- マウスでは慢性虚血における大脳白質障害がより強くなり、各種障害マーカーの発現も増強することを認めた。また、加齢により野生型マウスおよび AM+/- マウスの双方で大脳白質障害が若年グループよりも強くなることを確認した。とくに AM+/- マウスでは加齢に伴い高血糖状態となっていることを確認し、加齢脳による白質障害は、高血糖状態により増強されていることを明らかにした。免疫組織学的検討では、慢性脳低灌流の状態下では核酸の酸化障害マーカーである 8OHdG と脂質過酸化代謝産物の HNE が成熟オリゴデンドロサイトに蓄積し、細胞死が誘導されていることを確認した。さらにこの酸化障害の病態は、AM+/- でより強くなり、若年群よりも加齢群ではさらに増強されていることを明らかにした。オリゴデンドロサイトの再生に関しては、虚血負荷により前駆細胞の分化が抑制され、このことは AM+/- マウスおよび加齢現象でより強く認められた。

(3)得られた成果の国内外におけるインパクトと位置づけ：本研究成果は脳虚血の中でも認知機能障害と関係のある虚血性大脳白質障害の病態に加齢と高血糖が強く関与し、アドレノメデュリンの抗酸化作用が白質保護を示すこととの関連を明らかにした点で、世界をリードする内容である。

(4)今後の展望：新たな視点での血管内皮細胞保護による出血性合併症の予防のための臨床応用に向けた抗酸化ペプチドの投与実験を遂行していく。

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 13 件)

Ueno Y, Koike M, Shimada Y, Shimura H, Hira K, Tanaka R, Uchiyama Y, Hattori N, Urabe T: L-carnitine enhances axonal plasticity and improves white-matter lesions after chronic hypoperfusion in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 35: 382-391, 2015. 査読有り

Mitome-Mishima Y, Miyamoto N, Tanaka R, Shimosawa T, Oishi H, Arai H, Hattori N, Urabe T: Adrenomedullin deficiency and aging exacerbate ischemic white matter injury after prolonged cerebral hypoperfusion in mice. *Biomed Res Int* 2014: 861632, 2014. 査読有り

Shimada Y, Tanaka R, Shimura H, Yamashiro K, Urabe T, Hattori N: Phosphorylation enhances recombinant HSP27 neuroprotection against focal cerebral ischemia in mice. *Neuroscience* 278: 113-121, 2014. 査読有り

Mitome-Mishima Y, Miyamoto N, Tanaka R, Oishi H, Arai H, Hattori N, Urabe T: Differences in phosphodiesterase 3A and 3B expression after ischemic insult. *Neurosci Res* 75: 340-348, 2013. 査読有り

Yatomi Y, Tanaka R, Shimura H, Miyamoto N, Yamashiro K, Takanashi M, Urabe T, Hattori N: Chronic brain ischemia induces the expression of glial glutamate transporter EAAT2 in subcortical white matter. *Neuroscience* 244: 113-121, 2013. 査読有り

[学会発表](計 12 件)

三島有美子, 宮元伸和, 田中亮太, 大石英則, 新井 一, 服部信孝, 下澤達雄, 卜部貴夫: アドレノメデュリンノックアウトマウスを用いた慢性脳低灌流モデルにおける虚血性白質障害の検討. 第 39 回日本脳卒中学会総会, 大阪(大阪国際会議場), 平成 26 年 3 月 14 日.

卜部貴夫: シンポジウム 4 脳保護と

NVU: 虚血性脳損傷における細胞内保護シグナル伝達系の関わりと NVU protection. 第 26 回日本脳循環代謝学会総会, 岡山(岡山コンベンションセンター), 平成 26 年 11 月 21 日.

三島有美子, 田中亮太, 宮元伸和, 大石英則, 新井一, 服部信孝, 上部貴夫: アドレノメデュリンノックアウトマウスを用いた慢性脳低灌流モデルにおける虚血性白質障害の検討. 第 38 回日本脳卒中学会総会, 東京(グランドプリンスホテル高輪), 平成 25 年 3 月 23 日.

上部貴夫: シンポジウム 4 「脳保護療法の進化: 現状と展望」虚血性脳損傷に対する細胞内シグナル伝達系制御による治療戦略. 第 38 回日本脳卒中学会総会, 東京(グランドプリンスホテル高輪), 平成 25 年 3 月 22 日.

上部貴夫: シンポジウム S(1)-1 「脳卒中: 脳保護研究の現状と展望 (Neuroprotection-Update)」; 虚血性白質障害の分子機構と新たな防御戦略. 第 53 回日本神経学会学術大会, 東京(東京国際フォーラム), 平成 24 年 5 月 23 日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上部 貴夫 (URABE, Takao)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号: 60291663

(2) 研究分担者

下澤 達雄 (SIMISAWA, Tatsuo)

東京大学・医学部・講師

研究者番号: 90231365

(3) 研究協力者

宮元 伸和 (MIYAMOTO Nobukazu)

田中 康貴 (TANAKA Yasutaka)