

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430063

研究課題名(和文)血管安定化タンパクAng1を介した脳梗塞の血管保護療法確立に関する研究

研究課題名(英文) Vasoprotective protein Angiopoietin-1 is a novel therapeutic target molecule for cerebral ischemia

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：アンジオポエチン1(Ang1)は血管安定化に関与する蛋白である。本研究では組織プラスミノゲンアクチベーター(tPA)による血栓溶解療法に伴う脳出血や脳浮腫へのAng1の効果を検証した。ラット脳塞栓モデルに脳虚血後tPAおよび組替Ang1蛋白ないし偽薬を投与し、24時間後の脳出血量、脳浮腫・脳梗塞体積・神経学的予後について検討した。Ang1発現量、Ang1陽性血管数は脳虚血後に減少していた。tPA後に組換Ang1を投与した群は偽薬群と比較し脳出血量・脳浮腫が抑制された。神経機能予後は改善の傾向であった。Ang1はtPA療法に伴う合併症を抑制する血管保護療法の標的分子として有望であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：An angiogenesis factor, angiopoietin-1 (Ang1), is associated with the blood-brain barrier (BBB) disruption after focal cerebral ischemia. We hypothesized that administering Ang1 might attenuate hemorrhagic transformation and cerebral edema after tissue plasminogen activator (tPA) treatment by stabilizing blood vessels and inhibiting hyperpermeability. We used the rat thromboembolic focal cerebral ischemia model treated with tPA after ischemia with recombinant Ang1 protein or vehicle. Ang1 expression levels and Ang1-positive vessel densities on the ischemic side of the cerebral cortex were decreased after ischemia. Administration of recombinant Ang1 protein showed that the suppression of hemorrhagic transformation and less cerebral edema, as compared to administering vehicle protein. In conclusion, Ang1 might be a promising target molecule for developing vasoprotective therapies for controlling hemorrhagic transformation and cerebral edema after tPA treatment.

研究分野：神経科学

キーワード：アンジオポエチン1 脳虚血 脳塞栓モデル 血管保護

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞は日本人の死因の第 4 位であり 9.9%を占める。また脳梗塞発症後に救命できたとしても、高度の後遺障害が生じうる。本邦では 2005 年より、発症から 3 時間以内の脳梗塞患者に対して、組織プラスミノゲンアクチベーター (tPA)による血栓溶解療法が認可された。脳梗塞急性期の治療として行われる tPA による血栓溶解療法は、機能予後の大幅な改善が望めるが、治療開始時間が遅れた場合、血液脳関門の破綻に伴う脳出血を合併し、予後不良となる。一方、血管新生因子アンギオポエチン-1 (angiopoietin-1; Ang1) は、血管内皮細胞の生存、血管リモデリング、血管の成熟や安定化に参与し、脳虚血後においては血管内皮増殖因子による血液脳関門 (BBB) の透過性亢進を抑制することが報告されている。本研究では、tPA による血栓溶解療法に伴う脳出血合併症や脳浮腫に対する Ang1 の効果を検証した。

2. 研究の目的

「血管保護療法」という従来存在しなかった新しい脳梗塞の治療戦略の確立を目指す。とくに血管安定化タンパクであるアンギオポエチン 1 (Ang1) を標的とした治療法の開発を最終目的とする。具体的には Ang1 の効果増強による脳梗塞の治療効果、臨床で用いられる血栓溶解療法での出血性合併症の抑制、および発症後の血管安定化・血管新生促進作用を介した予後の改善について、動物モデルを用いて検討する。またこれに先立ち、現在不明な点が多い Ang1 の脳虚血時の作用メカニズムを検討するため、脳虚血時の Ang1 発現および Ang1 の作用である血管安定化作用を複数の関連タンパクの変化から経時的に観察する。

3. 研究の方法

自家血血栓によるラット脳塞栓モデル (図 1: 自家血で作成した血栓をカテーテルを用いて中大脳動脈に投与し閉塞する Okuboらのモデル) を使用し、脳虚血後 1 時間で tPA 療法を行う tPA 1h 群、4 時間で行う tPA 4h 群、tPA 療法を行わない永久閉塞群 (PMCAO) 群を作成した (図 2)。虚血 24 時間後の中大脳動脈領域の大脳皮質を試料として、抗 Ang1 抗体、および抗 RECA1 抗体 (血管内皮細胞のマーカー)・抗 GFAP 抗体 (アストロサイトのマーカー)・抗 PDGFR 抗体 (周皮細胞のマーカー) を用いたウエスタンブロット (WB) および免疫染色を行った。また tPA 療法後の脳出血や脳浮腫に対する Ang1 の効果を検証するため、tPA 4h 群に対し、組み替え Ang1 蛋白 (COMP-Ang1) 30  $\mu$ g ないし偽薬 (COMP 蛋白 30  $\mu$ g) を経静脈的に投与し、虚血 24 時間後の脳出血量、脳浮腫および脳梗塞体積、神経学的予後について検討した。

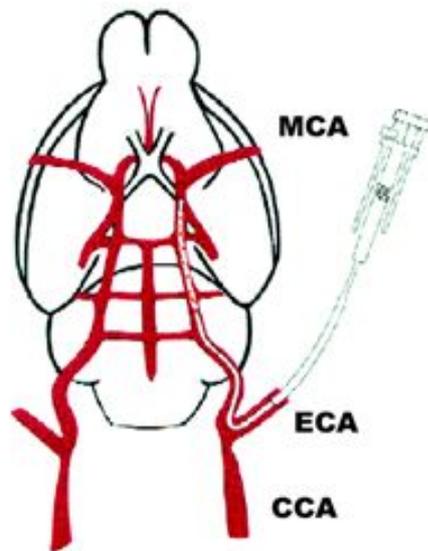


図 1: ラット脳塞栓モデル

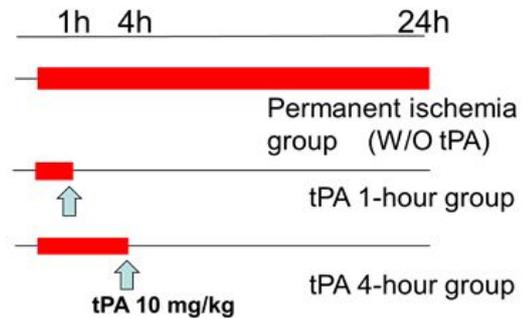


図 2: 薬剤投与プロトコール 時間は脳虚血からの経過を表す

4. 研究成果

免疫組織染色では血管内皮細胞と Ang1 は共有せず、血管の外側に Ang1 発現が認められた。周皮細胞、また神経細胞と共有が認められ、これらの細胞に発現していることが示された (図 3)。

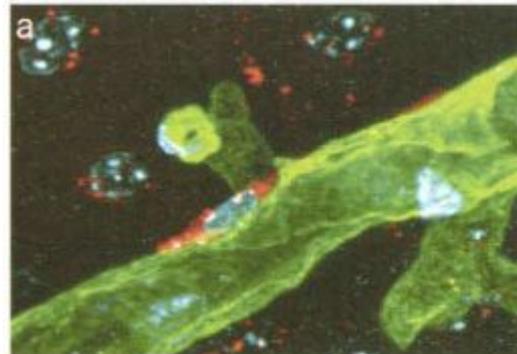


図 3: 血管内皮細胞のマーカーである RECA1 (緑) の外側に Ang1 (赤) の発現が認められる

WB では Ang1 蛋白発現量は Sham 群と比較し、いずれの群においても低下した ( $P < 0.05$  図 4)。一方、Ang1 陽性血管数は tPA 4h 群、

PMCAO 群では Sham 群, tPA 1h 群と比較し有意に低下した (いずれも  $P < 0.05$ , 図 5). さらに tPA 4h 群において COMP-Ang1 を投与したところ ( $N=11$ ), 周皮細胞における取り込みが認められ, 偽薬群 ( $N=9$ ) と比較して脳出血量および脳浮腫が抑制された ( $P = 0.005$  および  $0.007$ , 図 6). また, 有意差は認めなかったが, 神経機能予後は改善の傾向が見られた (図 7). Ang1 補充療法は tPA 療法に伴う出血合併症を抑制する血管保護療法の標的分子として有望であると考えられた.

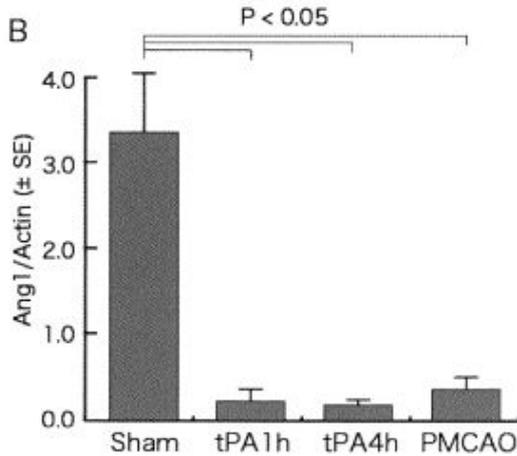


図 4: Ang1 蛋白発現量は脳虚血後に低下した

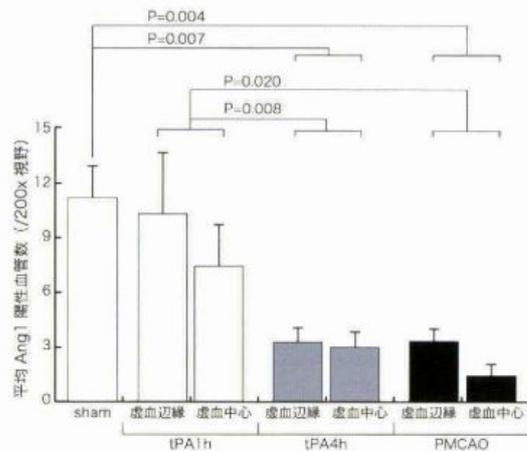


図 5: Ang1 陽性血管数は Sham 群・tPA 1h 群と比較し tPA 4h 群と PMCAO 群で有意に低下した

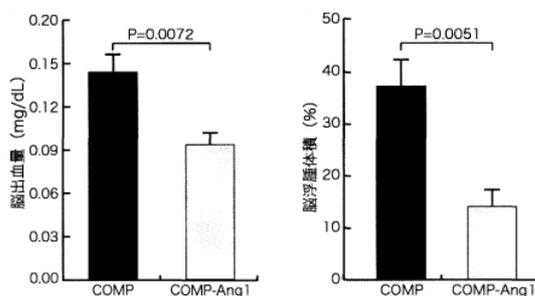


図 6: COMP-Ang1 投与により偽薬群と比較して脳出血量および脳浮腫が抑制された

D

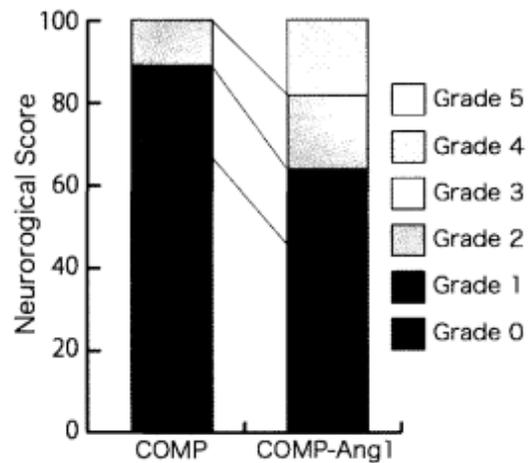


図 7: COMP-Ang1 投与により偽薬群と比較して神経機能予後は改善の傾向が見られた

## 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 1 件)

1. Kawamura K, Takahashi T, Kanazawa M, Igarashi H, Nakada T, Nishizawa M, Shimohata T.

Effects of angiotensin-1 on hemorrhagic transformation and cerebral edema after tissue plasminogen activator treatment for ischemic stroke in rats.

PLoS One. 査読有り 2014 Jun 4;9(6):e98639. doi: 10.1371/journal.pone.0098639. eCollection 2014.

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Masato Kanazawa, Effects of Angiotensin-1 on Hemorrhagic Transformation and Cerebral Edema after Tissue Plasminogen Activator Treatment for Ischemic Stroke, American Academy of Neurology Annual Meeting, 2014 年 4 月 30 日、フィラデルフィア (米国)

2. Takayoshi Shimohata, Effects of angiotensin-1 on hemorrhagic transformation and cerebral edema after tissue plasminogen activator treatment for ischemic stroke, International Stroke Conference, 2014 年 2 月 12 日、サンディエゴ (米国)

〔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

下畑 享良 (SHIMOHATA, Takayoshi)  
新潟大学・脳研究所・准教授  
研究者番号：60361911

(3)連携研究者

金澤 雅人 (KANAZAWA, Masato)  
新潟大学・医歯学総合病院・助教  
研究者番号：80645101