

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861266

研究課題名(和文)t-PA静注療法の未来への探求

研究課題名(英文)Search to the future of the IV t-PA therapy

研究代表者

高木 俊範(TAKAGI, Toshinori)

岐阜大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00452152

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：急性期脳梗塞に対するt-PAという薬剤を用いた血栓溶解療法は、脳出血という合併症のためにその治療可能時間が3時間以内と厳しく制約されている。我々は今回、塩酸ファスジルがその出血性梗塞を減少することをマウスモデルを用いて示した。t-PAという薬剤自体が血管内皮に対し毒性を持つものに対し、塩酸ファスジルは血管内皮細胞を保護することで出血性梗塞を予防することが示された。この結果は、脳梗塞治療の治療可能時間が今後延長できる可能性を示している。

研究成果の概要(英文)：As for the thrombolysis therapy using intravenous t-PA for the cerebral infarction, the treatable time is strictly limited within 3 hours after onset because of complications called cerebral hemorrhage. We showed that fasudil decreased the hemorrhagic transformation using a mouse model. It was shown that fasudil prevent hemorrhagic infarction by protecting vascular endothelium whereas t-PA itself had the toxicity for vascular endothelial cells. These results shows the possibility that treatable time of the cerebral infarction can be extended in the future.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：t-PA静注療法

1. 研究開始当初の背景

脳卒中は日本人の死因第3位の疾患であると共に、「寝たきりになる原因」の3割近くが脳卒中に起因する。脳卒中の中でも脳梗塞患者は脳卒中患者全体の約7割を占めるようになっており、その治療は重要な課題であった。

2005年10月より発症3時間以内の急性期脳梗塞患者に対して日本でも血栓溶解(t-PA静注療法)治療が始まり、その治療により恩恵を受けられる患者さんが出てきている。しかしこの治療法は、治療可能な時間が短く、実際には全ての脳梗塞患者の約2%程度の患者のみにしか適応になっていない。これは、治療開始時間が少しでも遅くなると、血管が再開通した際に出血性梗塞を引き起こしてしまい、逆に重篤な傷害を引き起こすからである。

この出血性梗塞のメカニズムを検討し、出血性梗塞を抑制する作用を持つ薬剤の効果を示すことができれば、治療可能時間の延長ができると考えられる。出血性梗塞を抑制する薬剤の併用により治療の恩恵を受ける患者数の増加が期待できる。

2. 研究の目的

t-PA静注療法による出血性梗塞を抑制する薬剤の検討を行うと共にそのメカニズムの検討を行う。

3. 研究の方法

血栓溶解療法(t-PA静注療法)による出血性梗塞モデルを作成して、t-PA単独投与とファスジル併用時の評価(死亡率の改善、神経症状の悪化率の低下など)を行った。具体的には、栓子を用いたマウス一過性中大脳動脈閉塞により脳虚血再灌流障害を誘発させた。虚血時間は6時間とし、t-PAは虚血中の6時間、ファスジルは虚血直後に3mg/kgを腹腔内投与した。対照群、単独治療群(t-PA群)、併用療法群の3群において、脳梗塞体積、出血量、神経行動学的評価と死亡率を検討した。またラットを用いて尾切除時の出血時間を検討した。次にそのメカニズム検討のため、脳組織サンプルをWestern blotを用いて検討を行った。

更なるメカニズム検討は、In vitroの手法を用いて行った。具体的には、ヒト血管内皮細胞を用いて6時間の低酸素・低グルコース負荷を行い、t-PA投与およびファスジルとの複合治療における死細胞率を検討した。さらに、同じくヒト血管内皮細胞を用いて、低酸素・低グルコース処置後に細胞を回収し、ウエスタンブロットを用いてタンパク発現量を検討した。

4. 研究成果

t-PA静注により出血量は増加したが、ファスジルとの複合治療は出血量を減少した。t-PAおよびファスジルは脳梗塞体積には影響を及ぼさなかった。またファスジルは7日後の神経学的所見を改善し、死亡率も低下させた。ファスジルの出血時間に与える影響を検討した結果、t-PA投与により出血時間は延長するが、ファスジルの追加投与では特に影響が認められなかった。このことから、ファスジルは止血機構に直接影響することなく、t-PA静注に伴う出血性梗塞を減少させるといえる。そのメカニズムの検討では、ファスジルはeNOSを上昇させ、血管内皮を保護していると考えられた。

次にヒト血管内皮細胞を用いて6時間の低酸素・低グルコース負荷を行い、t-PA投与およびファスジルとの複合治療における死細胞率を検討した。その結果、t-PA投与は明らかに死細胞を増加させるが、ファスジルとの複合治療では、その死亡率が改善した。そのメカニズムの検討のため、同じくヒト血管内皮細胞を用いて、低酸素・低グルコース処置後に細胞を回収し、ウエスタンブロットを用いてタンパク発現量を検討した。結果、t-PAはeNOSを減少し、ファスジルはその減少を抑制するとともに、t-PAによるMMP-9の上昇も抑制した。以上の結果から、ファスジルは血管内皮におけるeNOSの上昇ならびにMMP-9の抑制により、血管内皮を保護することにより、t-PAによる出血性梗塞を抑制していることが示された。

次にファスジルが脳出血を抑制しうるか、コラゲナーゼ誘発マウス脳出血モデルを用いて検討した。結果、ファスジルは10mg/kg投与で脳出血量が減少した。神経学的評価にても、ファスジルはコラゲナーゼ誘発脳出血による神経脱落症状を軽減していた。この結果は、出血性梗塞だけでなく、脳出血の出血量を抑制する可能性がある。こちらは今後そのメカニズムを検討していく。

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7件)

- ① Takagi T, Kato T, Sakai H, Nishimura Y: Early Neurologic Improvement Based on the National Institutes of Health Stroke Scale Score Predicts Favorable Outcome within 30 Minutes after Undergoing Intravenous Recombinant Tissue Plasminogen Activator Therapy. *J Stroke Cerebrovasc dis* 23: 69-74, 2014 査読有り
doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2012.09.013.
- ② Takagi T, Kitashoji A, Iwawaki T, Tsuruma K, Shimazawa M, Yoshimura S,

Iwama T, Hara H: Temporal activation of Nrf2 in the penumbra and Nrf2 activator-mediated neuroprotection in ischemia-reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* 72: 124-133, 2014 査読有り doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.04.009.

③ Takagi T, Mishiro K, Shimazawa M, Yoshimura S, Iwama T, Hara H: The phosphodiesterase III inhibitor cilostazol ameliorates ethanol-induced endothelial dysfunction. *Curr Neurovasc Res* 11: 302-311, 2014 査読有り <http://www.eurekaselect.com/124521/article>

④ Nakano Y, Suzuki Y, Takagi T, Kitashoji A, Ono Y, Tsuruma K, Yoshimura S, Shimazawa M, Iwama T, Hara H: Glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B (GPNMB) as a novel neuroprotective factor in cerebral ischemia-reperfusion injury. *Neuroscience* 277: 123-131, 2014 査読有り doi:10.1016/j.neuroscience.2014.06.065.

⑤ Mishiro K, Imai T, Sugitani S, Kitashoji A, Suzuki Y, Takagi T, Chen H, Oumi Y, Tsuruma K, Shimazawa M, Hara H: Diabetes mellitus aggravates hemorrhagic transformation after ischemic stroke via mitochondrial defects leading to endothelial apoptosis. *PLoS One* 9: e103818, 2014 査読有り doi: 10.1371/journal.pone.0103818.

⑥ 高木俊範, 吉村紳一: rt-PA 治療後の血管内治療-RCTの結果から。分子脳血管病 13: 47-52, 2014 査読有り http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=ae6moceb/2014/001301/010&name=0047-0052.j&UserID=133.66.118.108&base=jamas_pdf

⑦ 榎本由貴子, 吉村紳一, 高木俊範, 辻本真範, 石澤錠二, 岩間 亨: 緊急脳血管内治療時における抗血小板薬 loading dose 投与後の薬効解析. *JNET* 8:251-258, 2014 査読有り <http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=cf5jneth/2014/000805/001&name=0251-0258.j&UserID=133.66.118.108>

[学会発表] (計 4 件)

① 高木俊範, 三代圭介, 辻本真範, 今井貴彦, 永嶋一紀, 嶋澤雅光, 吉村紳一, 小澤 修, 岩間 亨, 原 英彰: コラゲナーゼ誘発脳出血に対するシロスタゾールの作用. 第 40 回日本脳卒中学会総会. リーガロイヤルホテル広島 (広島県・広島市),

2015. 3. 27

② 高木俊範, 吉村紳一, 榎本由貴子, 江頭裕介, 山上 宏, 坂井信幸, 岡田 靖, 北川一夫, 木村和美, 棚橋紀夫, 瓢子敏夫: 術前 t-PA 静注療法が急性期再開通療法後出血に与える影響-RESCUE Japan Registry より-. 第 30 回日本脳神経血管内治療学会学術総会. パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市), 2014. 12. 6

③ 高木俊範, 三代圭介, 今井貴彦, 嶋澤雅光, 岩間 亨, 原 英彰: エタノール誘発血管内皮障害に対するシロスタゾールの保護作用. 第 26 回日本脳循環代謝学会総会. 岡山コンベンションセンター (岡山県・岡山市), 2014. 11. 22

④ 高木俊範, 北庄司輝, 岩脇隆夫, 嶋澤雅光, 吉村紳一, 岩間 亨, 原 英彰: 転写因子 Nrf2 活性化剤による脳虚血再灌流障害に対する神経保護の検討. 第 73 回日本脳神経外科学会学術総会. グランドプリンスホテル新高輪 (東京都・文京区), 2014. 10. 9

[図書] (計 1 件)

① 高木俊範, 吉村紳一: 急性期脳梗塞に対する新しい再灌流療法. 循環器疾患最新の治療 2014-2015. 堀 正二, 永井良三編. P29-33, 南江堂, 東京, 2014

[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:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

岐阜大学医学部脳神経外科

<http://www.med.gifu-u.ac.jp/neurosurgery/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高木 俊範 (TAKAGI, Toshinori)

岐阜大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00452152

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：