

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461279

研究課題名(和文) Keap1/Nrf2システムの制御による新たな脳梗塞治療法の開発

研究課題名(英文) The new therapy for cerebral infarction by modulating Keap1/Nrf2 system

研究代表者

安部 貴人 (Abe, Takato)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：30365233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Keap1/Nrf2システムと脳梗塞の関係を検討するため、Nrf2システムに影響を与える物質であるdimethyl fumarate(DMF)、D-serineのマウス脳梗塞体積への影響を検討した。脳虚血再灌流モデルにおいて、マウスにDMFを再灌流10分後から朝・夕1日2回を4日間胃管から投与したところ、灌流後96時間、168時間共にDMF群において有意な梗塞体積の縮小を認めた。また、D-serine合成酵素であるserine racemase (SRR) ノックアウトマウスでは、脳虚血再灌流モデルにおける再灌流24時間後の梗塞体積が有意に縮小していた。

研究成果の概要(英文)：To investigate the effects of Keap1/Nrf2 system on cerebral ischemia, we tested whether dimethyl fumarate (DMF) and D-serine affect the stroke volume in mice middle cerebral artery occlusion model. DMF reduced stroke volume when it's administrated twice/day from 10 min after reperfusion. In serine racemase (SRR) null mice, in which the content of D-serine is markedly reduced, the stroke volume was significantly smaller than wild type mice.

研究分野：神経内科

キーワード：DMF

### 1. 研究開始当初の背景

脳梗塞は我が国では依然として死因の上位にランクされ、生前においても多くの患者に運動障害や痴呆などの後遺症をのこし、医療費全体に占める割合も大きい。そのためその正確な病態解明と治療法の開発は現代医療の急務といえる。

近年、脳血管障害発症後、数時間という超急性期に血栓を除去し再灌流することにより、虚血傷害を軽減しようという治療法(血栓溶解術、血管内脳外科手術)が行われている。しかし再灌流が得られたことによりむしろ炎症(post ischemic inflammation)が惹起され、虚血/再灌流障害 (ischemia/reperfusion injury)が生じる可能性が指摘されており、脳梗塞病巣の増悪過程における炎症性シグナルの重要性が注目されている。

COX2 や iNOS、MCP-1 などの炎症性サイトカイン・ケモカインや E セレクチン・ICAM1 などの接着因子の発現は虚血後 1~3 日をピークとして認められ、好中球や単球などの白血球細胞浸潤の惹起と併せて、脳梗塞病巣の増大に寄与することが明らかにされている。そして、therapeutic time window の観点からも、これらの炎症シグナルは脳梗塞において良い治療標的となると考えられている。研究代表者は、マウス中大脳動脈閉塞(MCAO)モデルにおいて、脳梗塞病巣の増悪過程における炎症性シグナルの活動性が、梗塞体積、機能予後に相関し、また TLR 受容体のリガンドや、wnt シグナルの構成分子である LRP6 がそれらの炎症サイトカイン遺伝子の発現を制御していることを報告した。しかし、post ischemic inflammation を効率的に制御し、実際の臨床の場で血栓溶解療法後の虚血/再灌流障害の進展を抑制する治療法はまだ開発されていない。

Nrf2 は脳内においては主としてアストロサイトに発現する転写因子である(J Biol Chem. 278: 12029-12038, 2003)。Nrf2 は、各種ストレス時における抗炎症、酸化ストレス防御遺伝子群の発現を制御しており、脳虚血時には神経保護的に働くと考えられている。非ストレス状態の細胞において Nrf2 は細胞質に存在し、Keap1 により抑制されているが、細胞が親電子性物質、活性酸素、小胞体ストレスや血管ずり応力の刺激を受けると、Nrf2 は Keap1 の抑制から開放されて活性化される。その後 Nrf2 は核に移行し、抗炎症、酸化ストレス防御遺伝子群の発現を促進する。

Nrf2 を発現しているアストロサイトはニューロン(シナプス)と微小血管の間で両者を橋渡しするように存在し、シナプス形成の促進、血液脳関門の形成、神経栄養因子の産生などニューロンをサポートするさまざまな役割を果たしている。研究代表者はこれまで神経系培養細胞を用い、ニューロンとアストロサイト間における脳エネルギー代謝の細胞間コンパートメンテーションについて

研究を行い、その結果、アストロサイトは神経興奮時のグルタミン酸の取り込み、K<sup>+</sup>のバッファリングなどエネルギー代謝面でも大きな役割を担っていることを明らかにした(Abe et al. J.Cereb.Blood Flow Metab.26:153-160, 2006)。脳虚血時にも、アストロサイトが Keap1/Nrf2 system の活性化により post ischemic inflammation を抑制し、神経保護的に働いている可能性が十分に考えられる。

また、我々のグループはすでに、細胞外グルコース濃度の上昇がアストロサイト解糖系のシャント経路であるペントースリン酸経路(PPP)活性を亢進させ、結果として活性酸素除去に働く還元型グルタチオン(GSH)の合成を促進することを報告した。そして細胞外グルコース環境の変化と PPP とを結ぶシグナルとして転写因子である Keap1/Nrf2 system が推測されている。

### 2. 研究の目的

近年、脳虚血再灌流障害の原因として、脳梗塞病巣における炎症性シグナルの重要性が注目されている。転写因子 Nrf2 はアストロサイトに発現し、各種ストレス時における抗炎症、酸化ストレス防御遺伝子群の発現を制御しており、脳虚血時には神経保護的に働くと考えられている。

dimethyl fumarate (DMF)は自己免疫性脳脊髄炎マウスにおいてアストロサイト内の Keap1/Nrf2 system を活性化し抗炎症・細胞保護作用を呈し、神経保護に働くことが報告されており(Brain 2011: 134; 678-692)。海外での臨床治験でも再発寛解型多発性硬化症患者において、年間再発率、障害進行率、MRI 上の病変数を有意に低下させた。DMF は海外での臨床治験では多発性硬化症の再発予防に対し有効性が証明されているが、これまで脳梗塞における有効性を検討した報告はない。

本研究では、脳虚血時のアストロサイトにおける Keap1/Nrf2 システムの役割を明らかにし、DMF 投与によりその制御を行い新たな治療法の確立を目指す。

逆に Keap1/Nrf2 system を抑制し、神経障害を増悪させる可能性のある因子として、NMDA 受容体 co-agonist である D-セリンの効果を検討した。

### 3. 研究の方法

動物モデルとしては、小泉モデルとして知られるナイロン系による一過性中大脳動脈閉塞モデルを用いる。成熟雄性マウスをイソフルレン吸入麻酔下に、頭皮を切開し、頭蓋骨上にレーザードップラープローブを固定、その後頸動脈を露出する。外頸動脈より、6-0 ナイロン糸より作成した塞栓系を挿入、内頸動脈方向に反転した後、内頸動脈内をウィリス動脈輪の中大脳動脈起始部まで挿入する(図1)。レーザードップラーにより血流の

変化をリアルタイムに観察すると、塞栓系の膨大部がちょうど中大動脈起始部に到達した瞬間に血流が急落する(図2)。その位置に塞栓系を20分間定置し脳虚血を作成、その後塞栓系を抜去し血流を再開させる。

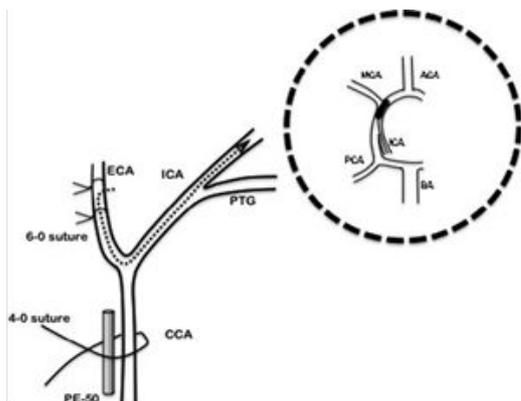


図1 . MCAO における塞栓系の挿入法

この手法において、平均血流低下率が手術前の85%以下、再灌流率が80%以上であれば再灌流3日後の梗塞体積が安定し、ほぼ50mm<sup>3</sup>となることわかっている。

研究代表者はコーネル大学神経生物学教室にて3年間当モデル作成に従事し十分な経験があり、90%以上の手術がこの基準をみたす。またこの手法は既に当施設で長く実験に用いられてきた方法であり、必要な麻醉機、手術台、顕微鏡、レーザードップラーなどの設備はすでに所持している。

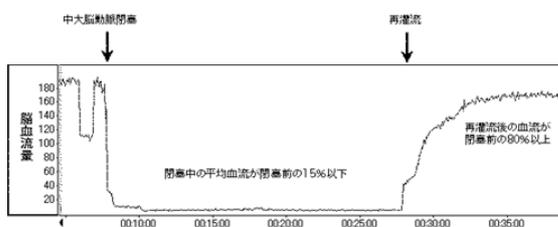


図2 マウス中大脳動脈閉塞モデルにおける手術中の脳血流変化

DMF 投与マウス、また D-serine 合成酵素である serine racemase ノックアウトマウス (SRR-/-) において、再灌流後経時的に脳を摘出、クライオスタットにて 600 μm 毎にスライスを採取、クレシルバイオレット染色により梗塞巣の体積の評価を行った。

#### 4 . 研究成果

##### 1 ) DMF のマウス脳梗塞体積への影響

Keap1/Nrf2 システムを活性化させるといわれる dimethyl fumarate(DMF)をマウスに投与し、梗塞体積への影響をみた。

溶媒のみを投与した vehicle 群(96 時間、168 時間)、DMF 30mg/kg を投与した DMF 群 (96 時間 : n=7、168 時間 : n=9) にわけ、suture

法による中大脳動脈閉塞再灌流 (MCA-O) モデルを作成し、梗塞体積を比較した。MCA-O においてはレーザードップラー血流計にて脳血流を測定しながらナイロン糸で作成した塞栓系を内頸動脈に挿入、ウィリス動脈輪の MCA 起始部まで挿入し MCA を閉塞し、20 分間留置した後に再灌流した。薬物投与は 96 時間群、168 時間群共に、再灌流 10 分後から開始として朝・夕 1 日 2 回を 4 日間とし、胃管からの投与とした。DMF 投与により MCA-O + 再灌流後 96 時間、168 時間共に DMF 群において有意な梗塞体積の縮小を認めた。

##### 2 ) D-serine のマウス脳梗塞体積への影響

D-serine 合成酵素である serine racemase ノックアウトマウス (SRR-/-) 群と WT 群間で、マウス脳虚血モデルにおける再灌流 24 時間後の梗塞体積を比較したところ、SRR-/- マウスにおいて有意 (p<0.05) に縮小していた (図3)。

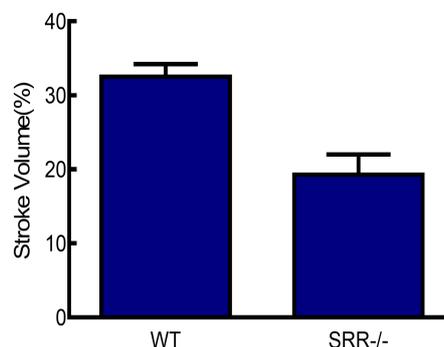


図3 . SRR-/- マウスにおける脳梗塞縮小効果

また、再灌流後経時的に虚血側大脳半球の D-serine 含有量を 2 次元 HPLC にて測定したところ、脳虚血後の組織において D-serine 含有量は 20 時間程度をピークに上昇を認め、SRR-/- マウスでは、WT に比べ 20 時間後の虚血巣における D-serine 量が約 10%まで低下していた (図4)。この結果より、D-serine は脳虚血時には神経障害を増悪させると考えられた。

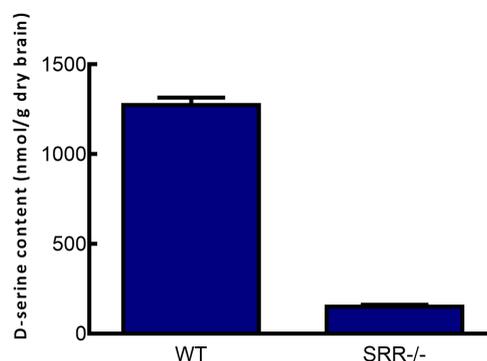


図4 . 再灌流 20 時間後の D-serine 含有量

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)

T. Abe, M. Suzuki, J. Sasabe, S. Takahashi,  
M. Unekawa, K. Mashima, T. Iizumi, K.  
Hamase, R. Konno, S. Aiso, N. Suzuki  
Cellular origin and regulation of D- and  
L-serine in in vitro and in vivo models of  
cerebral ischemia  
Journal of Cerebral Blood Flow &  
Metabolism、査読あり、34(12):1928-35  
doi: 10.1038/jcbfm.2014.164.

〔学会発表〕(計 3 件)

S. Takahashi, T. Iizumi, K. Mashima, K.  
Minami, Y. Izawa, T. Abe, T. Hishiki, M.  
Suematsu, M. Kajimura and N. Suzuki  
Cytoprotective role of microglia-derived  
nitric oxide induced by TLR4 stimulation  
in concert with astroglial  
pentose-phosphate pathway activation  
through the Keap1/Nrf2 system  
Brain 2017 (国際学会)  
2017年04月01日~2017年04月04日  
ベルリン(ドイツ)

南 和志、安部貴人、塚田直己、畝川美悠紀、  
高橋慎一、鈴木則宏  
マウス脳虚血再灌流モデルにおけるフマル  
酸ジメチルの神経保護効果  
第41回日本脳卒中学会総会  
2016年04月14日  
札幌

T. Abe, J. Sasabe, M. Suzuki, S. Takahashi,  
M. Unekawa, T. Iizumi, S. Aiso, N. Suzuki.  
MECHANISM REGULATING D-SERINE AND  
L-SERINE DURING TRANSIENT MIDDLE CEREBRAL  
ARTERY OCCLUSION IN A MOUSE MODEL  
World Stroke Congress  
2014年10月22日~25日  
イスタンブール(トルコ)

〔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

安部貴人(ABE, Takato)  
大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号：30365233

(2)研究分担者

高橋 慎一(TAKAHASHI, Shinichi)  
慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授  
研究者番号：20236285

(3)研究分担者

畝川 美悠紀(UNEKAWA, Miyuki)  
慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任助教  
研究者番号：10548481