

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861139

研究課題名(和文) TEMPO-RNPによる脳梗塞再開通療法後における再灌流障害と出血性脳梗塞の予防

研究課題名(英文) Prevention of reperfusion injury and hemorrhagic infarction after acute recanalization therapy for cerebral infarction using TEMPO-RNP

研究代表者

丸島 愛樹 (MARUSHIMA, Aiki)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：40722525

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：脳動脈閉塞に対する再開通療法は最も重要な脳梗塞治療であるが、再開通療法後に発生する活性酸素種は脳虚血再灌流障害を起こし、脳梗塞を悪化させる。脳虚血灌流障害を防ぐ治療法の開発として、ナノ粒子化活性酸素消去剤(TEMPO-RNP)を、マウス一過性脳虚血モデルに頸動脈投与し、脳神経血管保護効果を検証した。その結果、TEMPO-RNPは脳梗塞を縮小させ、血液脳関門障害を軽減させた。その機序は、脳動脈に投与されたTEMPO-RNPが脳虚血部の血液脳関門を通過し、脳血管に加え中枢神経細胞の保護であった。TEMPO-RNPは、脳虚血再灌流障害を抑制する新たな神経血管ユニット保護治療になると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Acute recanalization therapy is an important treatment for cerebral artery occlusion, but cerebral ischemia-reperfusion injury could cause a deterioration of cerebral infarction. We investigated neuro-endothelial unit protection effect of TEMPO-RNP (nitroxide radical-containing nanoparticles) for cerebral reperfusion injury in mice. Transient MCAO model mice received RNP or PBS through the common carotid artery. We revealed that intra-arterial TEMPO-RNP treatment decreased cerebral infarct size, protected neuronal cells and the BBB from reperfusion injury. RNP was detected on the endothelial cells and around the neuronal cells in the ischemic area. These results suggested that RNP could permeate the BBB at the first pass, remain in the ischemic area, and show ROS scavenging and neuro-endothelial unit protection effectively when injected intra-arterially.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：脳虚血再灌流障害 脳動脈閉塞症 脳梗塞 脳神経血管ユニット保護 RNP ナノ粒子 フリーラジカル消去剤 再開通療法

## 1. 研究開始当初の背景

研究開始時の 2014 年当初、脳梗塞急性期における再開通療法は、t-PA 静注療法が主体であり、血栓回収療法などの血管内手術による急性期再開通治療は新規デバイスの開発により成績の向上が期待されていたが、有効性は明確ではなかった。しかし、その後、MR CLEAN (Berkhemer OA et. al., MR CLEAN Investigators. N Engl J Med. 2015)を始めとする 5 つのランダム化比較試験により、有効性が明らかにされた。

現在、血栓回収療法などの急性期再開通療法の急速な普及により、発症 3 か月後の mRS0-2 の予後良好例が増えているが、再開通後に発生する活性酸素種は、脳虚血再灌流障害により脳梗塞の拡大や頭蓋内出血合併症を起こして予後を悪化させ得ることが課題である。発症 3 か月後の mRS3 以上の予後不良例は依然として 54%を占め、頭蓋内出血合併症や脳梗塞拡大による死亡は 15.3%に認められている (Goyal M, et al.; HERMES collaborators. Lancet. 2016)。そのため、血栓回収による再開通療法後の脳虚血再灌流障害を防ぐ薬剤の開発は、急性期再開通療法の治療成績向上のために必須である。しかし、現在使用できる脳保護薬は国内で認可されているエダラボンの静脈投与のみであり、また、t-PA と血栓回収療法の Therapeutic time window の短さ、再灌流障害による脳梗塞の拡大、脳浮腫、頭蓋内出血合併症が問題である。

血栓回収療法の登場により、現在、脳主幹動脈閉塞症の再開通後に頸動脈や頭蓋内脳動脈に留置したカテーテルより直接薬剤を脳動脈内に投与することが容易となった。これにより、再開通後に直接脳動脈へ投与する新たな脳保護薬の開発が期待できる。そこで、本研究では、我々が開発したナノ粒子化活性酸素消去剤であるニトロキシドラジカル含有ナノ粒子 (TEMPO-Radical containing Nanoparticles: TEMPO-RNP) を、再開通直後に頸動脈投与することにより、効果的に各種活性酸素種の発生を抑制し、血液脳関門と中枢神経細胞を保護し、虚血再灌流障害による出血性合併症や脳梗塞拡大を抑制できると考え、本研究計画を立案した。

TEMPO-RNP (図 1) の特徴は以下のとおりである。(引用文献、 )

粒径 40-60nm のミセル構造：脳虚血により血液脳関門が破綻した血管壁では、粒径の小さい TEMPO-RNP は血管外腔へ移行することができる。

高い血中滞留性と半減期の延長：

TEMPO-RNP の半減期は TEMPO 比べて 60 倍延長し、生体内では投与後 6 時間以上検出できる。

pH 応答性による酸性環境下での

TEMPO-RNP の崩壊：生体内では脳梗塞の酸性環境下 (pH 7.2 以下) において RNP が崩壊し、TEMPO によるフリーラジカル消去作用が効果的に行われる。

電子スピン共鳴法 (Electron paramagnetic resonance: EPR) による検出：脳梗塞へ集積した TEMPO のフリーラジカル消去作用を EPR で検出、評価することができる。

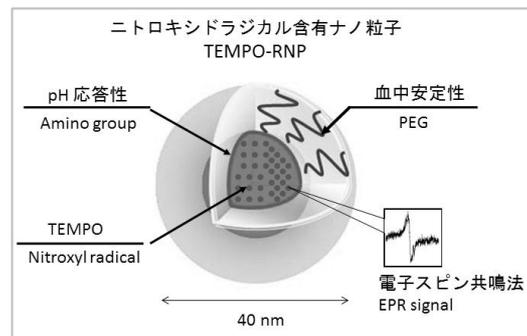


図 1

## 2. 研究の目的

これまで我々は、TEMPO-RNP が、脳虚血再灌流障害による脳梗塞の拡大を抑制する脳保護効果を示すことを報告した (Marushima et al. Neurosurgery, 2011、引用文献)。その後、TEMPO-RNP は脳梗塞巣の血管内皮に集積して、血管内皮保護効果をもつ可能性を突き止めた。そこで本研究では、rt-PA や血栓回収療法による再開通療法の副作用である脳虚血再灌流障害を、脳虚血再灌流直後に頸動脈カテーテルより TEMPO-RNP を直接動脈投与する動物モデルにより、TEMPO-RNP が脳主幹動脈閉塞症において脳梗塞を抑制する効果を検証し、新たな神経血管ユニット保護療法を開発するとともに、TEMPO-RNP が血液脳関門と中枢神経細胞を保護するメカニズムを解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

【ニトロキシドラジカル含有ナノ粒子：TEMPO-RNP の作製】

TEMPO-RNP は、内部にニトロキシドラジカル (Amino-TEMPO) を有するコア-シェルタイプのミセルである<sup>2,3</sup>。その構造は、親水性のポリエチレングリコールと、4-amino-TEMPO を側鎖に有する疎水性のポリスチレンを結合させた両親媒性ブロック共重合体である。

得られたブロック共重合体は、水溶液中で自己組織化させることでコア-シェルタイプのミセル粒子を形成する。TEMPO-RNPの平均粒径は、光散乱光度計を用いて測定する。作製は研究協力者と共に行った。

#### 【一過性脳虚血モデルの作製】

マウス一過性脳虚血モデルの作製及び以下の組織解析法は、これまで研究代表者が行った方法で行った (Marushima et al. Neurosurgery, 2011)。

麻酔：ケタラルル 70mg/kg とセラクタール 16mg/kg の腹腔内注射にて麻酔した。

マウス一過性脳虚血モデル：前頸部正中切開をおき、総頸・内頸・外頸動脈を露出させた。総頸動脈近位部と外頸動脈を結紮し、総頸動脈に小切開を入れた。そこから先端をシリコン加工したナイロン塞栓系を入れて内頸動脈遠位部へ導入し、中大脳動脈を閉塞させた。1 時間後に塞栓系を引き抜いて再灌流した。再灌流 20 分後に薬剤を経静脈投与した。術中、体温コントローラーによりマウスの体温を 37 に保った。

安楽死と摘出脳の処理：虚血再灌流 24 時間後に、ケタラルルの過量投与と断頭により安楽死させ、開頭して取り出した脳を冷却したイソペンタンに入れて急速凍結させた後に、-80 で保存した。

#### 実験 1 . TEMPO-RNP の最適な投与濃度の検証

マウス一過性脳虚血モデルにおいて、再灌流 20 分後に TEMPO-RNP を頸動脈投与した。TEMPO-RNP の濃度は、90, 27, 9, 0.9 mg/kg-BW とした。24 時間後に神経症状を評価し、安楽死後に脳梗塞の体積を比較した。

#### 実験 2 . 脳梗塞抑制効果の検証

マウス一過性脳虚血モデルにおいて、実験 1 で有効であった濃度 (9mg/kg-BW) の TEMPO-RNP、または PBS を頸動脈投与した。投与 24 時間後に断頭して、神経症状と脳梗塞体積を評価した。

#### 実験 3 . 血液脳関門保護効果の検証

マウス一過性脳虚血モデルにおいて、実験 1 で有効であった濃度 (9mg/kg-BW) の TEMPO-RNP、または PBS を頸動脈投与した。薬剤投与 30 分後に 2% Evans blue を 4ml/kg 腹腔内投与した。投与 24 時間後に断頭して、Evans blue の漏出量を定量評価することで、血液脳関門保護効果を検証した。

#### 実験 4 . 脳神経血管保護効果の検証

実験 2 の動物実験で得られた脳組織を用いて、TEMPO-RNP の神経血管保護効果を、以下の評価方法により検証した。

1. 神経細胞のスーパーオキシドアニオンの評価 (Dyhydroethidium)
2. DNA の酸化ストレス評価 (8OHdG)
3. 神経細胞のアポトーシスの評価 (TUNEL)
4. 血液脳関門の評価 (Occludin)

#### 実験 5 . フリーラジカル消去能の評価

実験 2 の動物実験で得られた脳組織を用いて、ヒドロキシラジカル( $\cdot\text{OH}$ )、アルコキシラジカル( $\text{RO}\cdot$ )、ペルオキシラジカル( $\text{ROO}\cdot$ )、スーパーオキシド( $\text{O}_2\cdot^-$ )の消去能を電子スピン共鳴法(EPR)により評価した。スピントラップ剤は CYPMPO を使い、その他の条件は以下の表のとおりである。

実験 6 . ローダミン標識 TEMPO-RNP を用いた脳梗塞病巣における TEMPO-RNP の集積の評価  
一過性脳虚血モデルにローダミン標識 TEMPO-RNP を頸動脈投与した。再灌流 3 時間後に断頭し、TEMPO-RNP が血管壁と血管外腔の中枢神経細胞にどのように集積、局在しているかを、蛍光抗体法により評価した。

Table II

Free radical	Spin trap	Precursor/Sensitizer	UV/VL	Irradiation time	Proportion of sample
$\cdot\text{OH}$	CYPMPO	$\text{H}_2\text{O}_2$ 10mM	UV	5s	1.7%
$\text{O}_2\cdot^-$	CYPMPO	Riboflavin 20 $\mu\text{M}$	VL	60s	3.4%
$\text{RO}\cdot$	CYPMPO	AAPH 10mM	UV	5s	3.4%
$\text{ROO}\cdot$	CYPMPO	tBHP 10mM	UV	10s	1.7%

UV; ultra violet (300-400nm) VL; visual light (500-600nm)  
AAPH; 2,2'-azobis-2-methyl-propanimidamide, dihydrochloride,  
tBHP; tert-butyl hydroperoxide  
CYPMPO; 5-(2,2-dimethyl-1,3-propoxycyclophosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline N-oxide

## 4 . 研究成果

### 実験 1

マウス一過性脳虚血モデルに対し、90, 27, 9, 0.9 mg/kg-BW の異なる濃度の TEMPO-RNP を頸動脈投与したところ、9mg/kg-BW の濃度の TEMPO-RNP が最も神経症状が改善し、脳梗塞を抑制した。その為、9mg/kg-BW の濃度の TEMPO-RNP を用いることとした

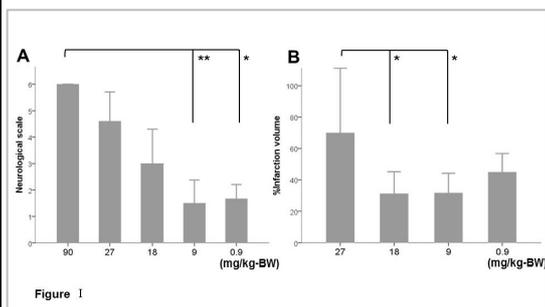


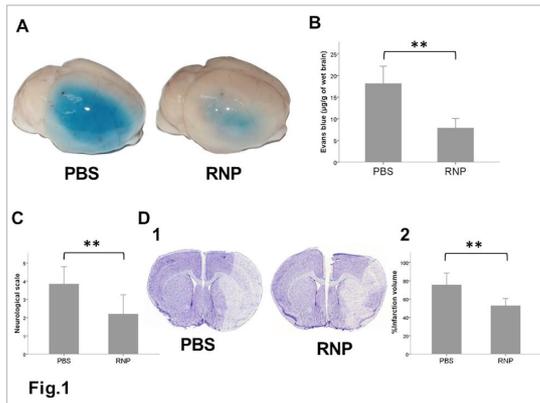
Figure 1

### 実験 2

TEMPO-RNP の脳梗塞抑制効果の検証では、TEMPO-RNP は PBS に比べて有意に神経症状を改善し、脳梗塞体積を抑制した。(Fig.1 C,D,E)

### 実験 3

TEMPO-RNP の血液脳関門保護効果の検証では、TEMPO-RNP は PBS に比べて有意に Evans blue の漏出量が少なく、一過性脳虚血による決英気脳関門障害を抑制した。(Fig.1 A,B)

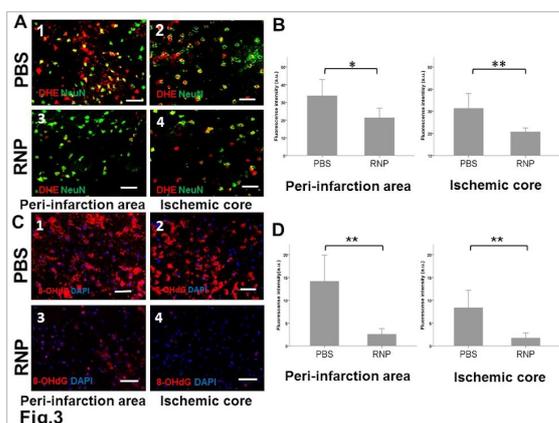


### 実験 4

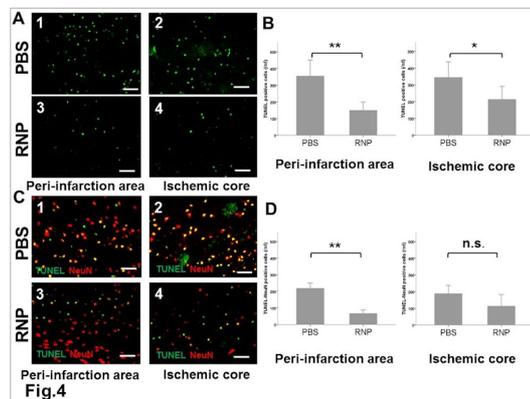
TEMPO-RNP の脳神経血管保護効果に関する検証では、TEMPO-RNP は PBS に比べて以下の効果を示した。

実験 4 - 1 . 神経細胞のスーパーオキシドアニオンの発現を抑制した。(Fig.3 A,B) (Dyhydroethidium)

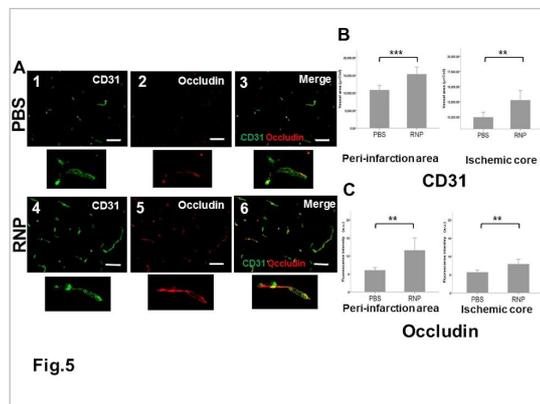
実験 4 - 2 .DNA の酸化ストレス損傷を抑制した。(Fig.3 C,D)(8OHdG)



実験 4 - 3 . 神経細胞のアポトーシスを抑制した。(Fig.4 A,B,C,D)(TUNEL)

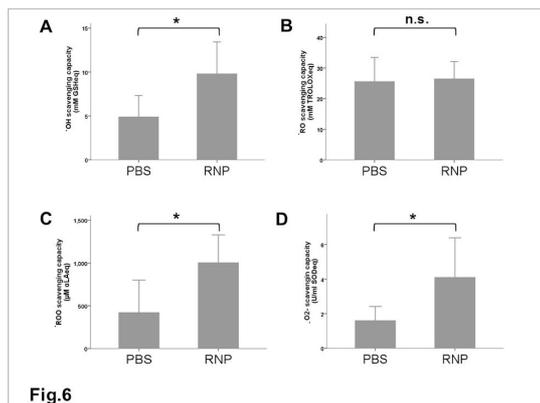


実験 4 - 4 . 血管内皮障害、及び血液脳関門を構成している Occludin の障害を抑制した。(Fig.5 A,B) (Occludin)



### 実験 5

フリーラジカル消去能の評価では、TEMPO-RNP を投与した脳は PBS に比べて有意にヒドロキシラジカル( $\cdot\text{OH}$ )、ペルオキシラジカル( $\text{ROO}\cdot$ )、スーパーオキシド( $\text{O}_2\cdot^-$ )のフリーラジカル消去活性を示した。(Fig. 6)



### 実験 6

ローダミン標識 TEMPO-RNP を用いた脳梗塞病巣における TEMPO-RNP の集積の評価では、ローダミンの蛍光は脳動脈壁に認められた。微量なローダミンの検出は Anti-Rhodamin 抗体を用いて検出したところ、TEMPO-RNP は血管壁の

みならず、血管外腔の神経細胞などの中枢神経細胞の周囲にも認められた。TEMPO-RNP は一過性脳虚血により開いた、または破綻した血液脳関門を通過し、血管外腔にも修正記述することが明らかとなった。(Fig.2)

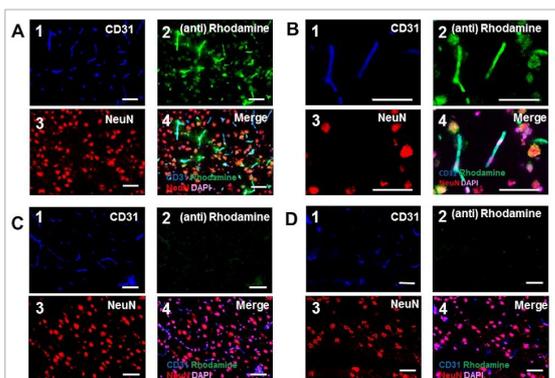


Fig.2

以上より、マウス一過性脳虚血モデルに対して、TEMPO-RNP の頸動脈投与は、PBS に比べて有意に神経症状の軽減、脳梗塞の抑制、血液脳関門障害の抑制効果があることが明らかとなった。そのメカニズムは、TEMPO-RNP が、神経細胞のフリーラジカル産生を抑制すること、DNA の酸化損傷創外を抑制すること、神経細胞のアポトーシスを抑制すること、血管内皮、及び血液脳関門の Occludin の障害を抑制していることであることを明らかとした。また、TEMPO-RNP は頸動脈投与後に、脳梗塞中心部と周辺部において脳動脈壁のみならず、脳虚血により開いた血液脳関門を越えて、血管外腔にも集積し、神経細胞などの中枢神経細胞の周囲にも認められることが明らかとなった。粒径 40nm の非常に小さなナノ粒子である TEMPO-RNP (ミセル) は、脳虚血部の血液脳関門を通過して、脳血管と中枢神経細胞からなる脳神経血管ユニット保護効果を発揮したと考えられた。

これらの成果は、当研究開始後にランダム化比較試験で有効性が明らかとなった脳主幹動脈閉塞症に対する急性期再開通療法において、脳虚血再灌流障害を軽減し、脳梗塞を縮小させる新たな治療法として臨床応用可能な技術である。また、粒径 40nm の世界最小レベルのナノ粒子 (ミセル) が脳虚血領域において血液脳関門を通過して、血管外腔の中枢神経細胞周囲にも認められたことは、TEMPO-RNP が脳梗塞病巣に特異的に効果を発揮し得る薬剤であることを示唆した。

今後は、TEMPO-RNP と既存薬エダラボンとの比較試験、TEMPO-RNP が血液脳関門を越えて、中枢神経細胞の細胞質内や核内への移行、また、どのようにフリーラジカルの消去して

いるのか詳細な解析を加える予定である。

これらの成果は、2017 年 5 月 27 日に "Stroke" 誌に受理された。(引用文献)

#### <引用文献>

Marushima A, Suzuki K, Nagasaki Y, Yoshitomi T, Toh K, Tsurushima H, Hirayama A, Matsumura A: Newly synthesized radical-containing nanoparticles enhance neuroprotection after cerebral ischemia-reperfusion injury. *Neurosurgery*, Vol.68, 1418-1425, 2011

Yoshitomi T, Suzuki R, Mamiya T, Matsui H, Hirayama A, Nagasaki Y. pH-sensitive radical-containing-nanoparticle (RNP) for the L-band-EPR imaging of low pH circumstances. *Bioconjug Chem*. 2009 Sep;20(9):1792-1798.

Yoshitomi T, Miyamoto D, Nagasaki Y. Design of core-shell-type nanoparticles carrying stable radicals in the core. *Biomacromolecules*. 2009 Mar 9;10(3):596-601

Hosoo H, Marushima A, Nagasaki Y, Hirayama A, Ito H, Puentes S, Mujagic A, Tsurushima H, Tsuruta W, Suzuki K, Matsui H, Matsumaru Y, Yamamoto T, Matsumura A. Neurovascular unit protection from cerebral ischemia-reperfusion injury by radical-containing nanoparticles in mice. *Stroke* 2017, Accepted in 27<sup>th</sup> May, 2017

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計12件)

- Hosoo H, Marushima A (Corresponding author), Nagasaki Y, Hirayama A, Ito H, Puentes S, Mujagic A, Tsurushima H, Tsuruta W, Suzuki K, Matsui H, Matsumaru Y, Yamamoto T, Matsumura A. Neurovascular unit protection from cerebral ischemia-reperfusion injury by radical-containing nanoparticles in mice. *Stroke* 2017, Accepted in 27<sup>th</sup> May, 2017
- Hecht N, Marushima A, Nieminen M, Kremenetskaia I, von Degenfeld G, Woitzik J, Vajkoczy P. Myoblast-mediated gene therapy improves functional collateralization in chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke*. 46:203-11, 2015  
DOI:10.1161/STROKEAHA.114.006712.  
Epub 2014 Nov 11.
- Marushima A, Nakai Y, Ikeda G, Tsuruta

W, Tsurushima W, Suzuki K, Matsumura A. Cerebro-Cardiovascular Risk Factors are Equivalent for Retinal Ischemia and Cerebral Ischemia Patients with Carotid Artery Stenosis. Journal of Neurological Disorder and Stroke. 2:1045, 2014  
<https://www.jscimedcentral.com/NeurologicalDisorders/neurologicaldisorders-spidualischemicstroke-1045.php>

〔学会発表〕(計160件)

1. 細尾久幸, 丸島愛樹, 長崎幸夫, 平山暁, Sandra Puentes, 鶴嶋英夫, 鶴田和太郎, 鈴木謙介, 山本哲哉, 松村明: 新規活性酸素消去剤 TEMPO-RNP による脳虚血再灌流障害に対する neuro-endothelial protection 効果の検証. 日本脳神経外科学会第75回学術総会, 2016.9.30 (福岡国際会議場、福岡県、福岡市)
2. 丸島愛樹, 細尾久幸, 長崎幸夫, 平山暁, Sandra Puentes, 伊藤紘, 庭野亜美, 鶴嶋英夫, 鶴田和太郎, 鈴木謙介, 松井裕史, 松丸祐司, 山本哲哉, 松村明: 活性酸素消去剤封入ナノ粒子(RNP)による脳虚血再灌流障害に対する Neurovascular unit 保護効果. 第59回日本脳循環代謝学会, 2016.11.11 (あわぎんホール、徳島県、徳島市) (シンポジウム)
3. Hosoo H, Marushima A, Nagasaki Y, Hirayama A, Ito H, Puentes S, Tsurushima H, Tsuruta W, Matsui H, Suzuki K, Yamamoto T, Matsumura A: Neurovascular Unit Protection Using Nitroxide-Radicals Containing Nanoparticles (RNP) for Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury. 13th International Symposium on Thrombolysis Thrombectomy and Acute Stroke Therapy (TTST 2016 Kobe), 2016.11.1 (神戸国際会議場、兵庫県、神戸市 K)
4. 丸島愛樹, 小山泰明, 榎本有希, 下條信威, 松村英明, 鶴田和太郎, 滝川知司, 山本哲哉, 松村明, 井上貴昭: 脳梗塞急性期の再開通療法における脳組織酸素飽和度と酸化ストレス度評価の有用性. 第44回日本救急医学会, 2016.11.19 (グランドプリンスホテル新高輪、東京都、港区)
5. Marushima A, Hecht N, Nieminen M, Kremenskaia I, Woitzik J, Barrera RG, Banfi A, Vajkoczy P. Therapeutic angiogenesis using myoblast-mediated gene therapy in experimental EMS model of mouse 4<sup>th</sup> International Moyamoya Meeting

2015.7.2-4(Kaiserin-Friedrich-Haus, Berlin, Germany)

〔図書〕(計2件)

1. 丸島愛樹, 中居康展, 松村明: 線維筋性異形成(FMD)に合併した両側頸動脈解離の1例. 脳卒中症候学 症例編、西村書店、594-597、2016
2. 丸島愛樹, 鶴田和太郎, 松村明: 痙攣重積で発症したアテローム血栓性脳梗塞の1例. 脳卒中症候学 症例編、西村書店、146-149、2016

6. 研究組織

(1)研究代表者

丸島 愛樹 (MARUSHIMA Aiki)  
筑波大学医学医療系・講師  
研究者番号: 40722525

(3)研究協力者

長崎 幸夫 (NAGASAKI Yukio)  
筑波大学数理物質科学研究科・教授

平山 暁 (HIRAYAMA Aki)  
筑波技術大学保健科学部 東西医学統合医療センター・教授

鶴嶋 英夫 (TSURUSHIMA Hideo)  
筑波大学医学医療系・准教授

鶴田 和太郎 (TSURUTA Wataro)  
虎ノ門病院脳神経血管内治療科

鈴木 謙介 (SUZUKI Kensuke)  
獨協医科大学越谷病院医学部・教授

松丸 祐司 (MATSUMARU Yuji)  
筑波大学医学医療系・教授

山本 哲哉 (YAMAMOTO Tetsuya)  
筑波大学医学医療系・准教授

松村 明  
筑波大学医学医療系・副学長

プテンテス サンドラ (PUENTES Sandra)  
筑波大学システム情報系・助教

松井 裕史 (MATSUI Fumihiro)  
筑波大学医学医療系・講師

細尾 久幸 (HOSOO Hisayuki)  
筑波大学人間総合科学研究科・博士課程

ムハジク アルネラ (MUJAGIC Arnela)  
筑波大学人間総合科学研究科・博士課程

伊藤 紘 (ITO Hiromu)  
筑波大学人間総合科学研究科・博士課程