

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19960

研究課題名(和文) Nrf2活性化による脳虚血再灌流障害の軽減と治療可能時間の延長

研究課題名(英文) Nrf2 activator attenuates brain ischemia-reperfusion injury.

研究代表者

高木 俊範 (Takagi, Toshinori)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：00452152

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)：Nrf2活性化剤であるBardoxylone methyl (BARD)およびRS-9は一過性中大脳動脈閉塞モデルにおいて、脳梗塞体積を減少し、神経学的機能が改善することを示した。またワーファリン投与下に6時間の一過性脳虚血を負荷したモデルを作成し、BARDが出血性梗塞を減少し神経所見を改善することを示した。BARDは脳血液関門の透過性亢進を改善し、血管内皮細胞、周皮細胞の減少の抑制が認められた。以上より、BARDおよびRS-9によるNrf2活性化は、脳虚血再灌流障害に対し神経保護効果を持ち、脳血液関門を保護することが示された。

研究成果の概要(英文)：Bardoxylone methyl (BARD) and novel Nrf2 activator, RS-9 decreased cerebral infarction and improve neurological findings due to ischemia-reperfusion injury. In addition, BARD decreased hemorrhagic infarction and improve neurological findings under warfarin administration. BARD also attenuates hyper-permeability of blood brain barrier and ameliorates the injury of vascular endothelial cells and pericytes. These results demonstrated the neuroprotective effects of Nrf2 activator and protection of blood brain barrier.

研究分野：脳虚血、脳保護療法

キーワード：Nrf2 脳虚血再灌流障害 脳血液関門 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

脳卒中は日本人の死因第4位の疾患であると同時に、「寝たきりになる原因」の1位であり3割近くが脳卒中などの脳血管疾患である。また全医療費の1割近くが脳卒中診療に費やされている。脳卒中患者のうち、脳梗塞患者は約7割を占めている。

急性期脳梗塞治療は、2005年10月より発症3時間以内(現在は4.5時間以内)の血栓溶解(tPA静注療法)療法が始まり、本格的に治療が可能となったものの、未だその適応症例は5%程と報告されている。また2010年には血栓溶解療法の無効例・非適応例に対するカテーテルを用いた再開通療法が認可されたものの、予後を改善し得るというエビデンスは乏しい。また再開通療法自体の成績も充分というには程遠く、新たな治療戦略が急務と言われて久しい。

再開通療法は理論上最も有効と考えられるが、閉塞した血管の再開通は再灌流障害を来すことが知られている。また再灌流障害の主因は酸化ストレスである。よって、生体の持つ最も重要な抗酸化メカニズムである転写因子 Nrf2 の治療への応用が期待されている。近年、Nrf2 活性化剤が多数報告されるようになり、また Nrf2 には抗炎症作用が持つことも報告されている。さらに Nrf2 活性化剤のひとつである Bardoxylone methyl は腎疾患を対象に臨床試験も行われている。

本研究では、Nrf2 活性化による脳虚血再灌流障害の軽減ならびに治療可能時間の延長の可能性を検討し、Neurovascular unit (NVU) を包括的に評価する。

2. 研究の目的

現在の tPA 静注療法を含めた再開通療法が最も有用な方法と考えられるが、その予後に限界がある。世界的にも、脳梗塞急性期に再開通療法を受けられた患者が、3か月後にほぼ自立した生活を送れる確率は約4割である。さらに再開通療法の適応となる症例は全体の5%程しかない。

現在は以下の3点が問題と考える。

- (1) 虚血再灌流障害およびその主因である酸化ストレスに対する治療は未だ行われていない。
- (2) 治療可能時間の制限が脳卒中予後の改善を妨げている。
- (3) 過去にフリーラジカルスカベンジャーを含めた多数の脳保護療法の臨床試験が行われてきたが、すべて効果が否定されてきた。
→過去の脳保護療法はフリーラジカルの除去であった。今回は内因性の抗酸化メカニズムの活性化という別の側面からのアプローチである。

我々はこれまでに、脳虚血再灌流障害における自然経過での Nrf2 の発現レベルの推移を検討している。時間的には、虚血再灌流早期には Nrf2 の発現上昇は認められず、24時

間後にピークを迎える。また発現部位は、梗塞周囲の可逆的領域であるペナンプラに主に Nrf2 は発現していた。この結果より早期に Nrf2 を活性化することで、神経保護が可能ではないかと推測している

本研究の目的は、

- (1) Nrf2 活性化による脳虚血再灌流障害の軽減の検討

Nrf2 活性化剤の投与による、脳虚血再灌流障害による脳梗塞体積に与える影響を検討する。そのメカニズムとして、NVU の構成成分である神経細胞、アストロサイト、血管内皮細胞、周皮細胞、ミクログリアにおける Nrf2 の活性化ならびに細胞死を評価することにより、NVU 全体に対する保護効果を検討する。

- (2) Nrf2 活性化による治療可能時間延長の検討

Nrf2 活性化剤の投与による脳虚血発症後の治療可能時間の延長の可否を検討する。現在の tPA 治療は4.5時間以内が適応であるが、それを越えた時間に Nrf2 活性化剤を投与し、脳梗塞体積の縮小が得られる時間的限界を検討する。

3. 研究の方法

脳虚血再灌流障害は、栓子法による2時間の tMCAO により誘発し、Bardoxylone methyl (BARD) を再灌流の直前に静脈内投与する。対照群、BARD 治療群にて検討を行うが、BARD は投与量を 0.6mg/kg、2mg/kg、6mg/kg の3つ投与群で検証する。

本実験の基本的なプロトコールを下図に示す。具体的には、急性期の脳組織学的評価(脳組織の TTC 染色、Nrf2 および下流因子の Western blot と RT-PCR、NVU 構成成分に免疫染色)、虚血亜急性期(虚血後7日目)までの神経行動学的評価を行う。さらに治療可能時間の評価では、虚血時間を3時間、4.5時間、8時間に設定して検討を行う。

- (1) Nrf2 活性化剤投与による神経保護作用の検証ならびに最適投与量の決定

2時間の tMCAO モデルにおいて、再灌流直前に BARD を投与する。投与量は 0.6mg/kg、2mg/kg、6mg/kg で行い、24時間後の梗塞体積ならびに神経所見を評価し、その神経保護作用の確認および最適投与量を決定する。また他の Nrf2 活性化剤も同様の評価を行う。

- (2) Nrf2 活性化剤投与による虚血再灌流早期の Nrf2 および下流因子の評価

- a) トランスジェニックマウスを用いた BARD 投与による Nrf2 活性化の評価

Luciferase assay を用いて、BARD 投与による同一個体での Nrf2 の発現を評価する。投与前→脳虚血中→投与後1時間→投与後4時間→24時間後の時間経過を脳虚血群およびコントロール群それぞれ観察し、同時に脳血流を評価する。

b) BARD 投与による虚血再灌流早期での Nrf2 および下流因子の検証

BARD 静脈内投与後 1 時間、4 時間、8 時間後、24 時間後において、Nrf2 および下流因子の発現を RT-PCR および Western blot にて確認する。

(3) Neurovascular unit に対する Nrf2 活性化剤の与える影響の検証

NVU 構成成分である、神経細胞、アストロサイト、血管内皮細胞、周皮細胞、ミクログリアにおける Nrf2 活性化ならびに細胞死につき評価する。

(4) Nrf2 活性化剤投与による治療可能時間の延長の検討

上記までは虚血時間を 2 時間と設定しているが、この検討ではさらに 4.5 時間、6 時間、8 時間の虚血時間を設定し、24 時間後の梗塞体積ならびに神経所見を評価し、その神経保護作用を検討する。

4. 研究成果

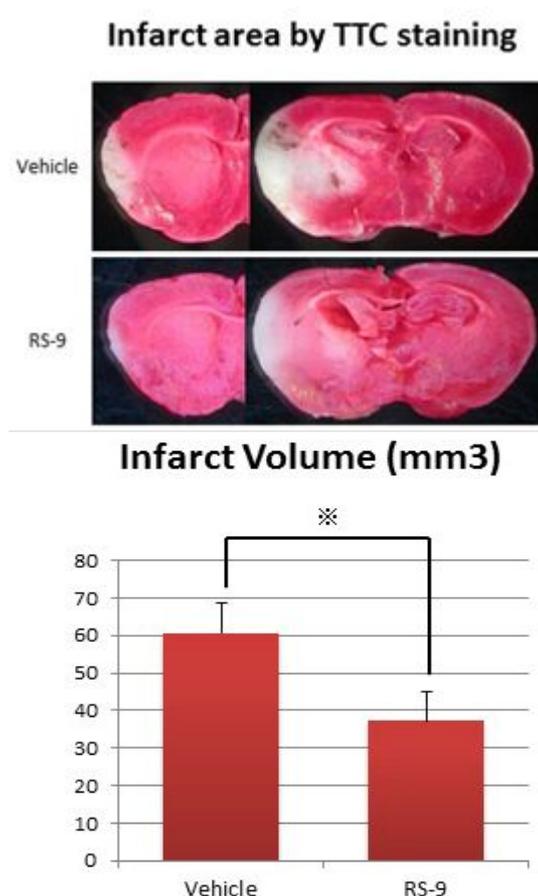
Nrf2 活性化剤である Bardoxylone methyl (BARD) 0.6mg/kg の静脈内投与が、2 時間の一過性中大脳動脈閉塞モデルにおいて、脳梗塞体積を減少し、神経学的機能が改善することを示した。脳虚血後 24 時間では、ウエスタンプロットにおいて Nrf2 活性化ならびに代表的下流因子である Hemeoxygenase-1 (HO-1) の活性化を認めた。

次に BARD による脳血液関門の保護効果につき検討を行った。ワーファリン投与下に 6 時間の一過性脳虚血を負荷したモデルを作成し、BARD 投与による脳梗塞体積、出血量、神経学的評価を行った。BARD は 6 時間の脳虚血後の脳梗塞体積は減少しなかったが、出血性梗塞を減少させ、出血量も減少していた。神経学的評価では、BARD の投与により神経所見の改善が認められた。BARD 投与では脳血液関門の透過性亢進も改善した。免疫組織学的評価およびウエスタンプロットでは、血管内皮細胞、周皮細胞の減少の抑制が認められ、両者において Nrf2 ならびに HO-1 の活性化が認められた。

また BARD の誘導体であり、より Nrf2 活性が強く細胞毒性の低い新規 Nrf2 活性化剤である RS-9 を用い、2 時間の一過性脳虚血モデルにおける脳梗塞体積ならびに神経学的機能を評価した。RS-9 0.2mg/kg の投与は脳梗塞体積を減少し、神経学的所見を改善した。また RS-9 の投与により、Nrf2 の活性化並びに HO-1 の活性化を認めた。RS-9 を用い、治療時間延長を目指して 3 時間後、4.5 時間後、8 時間後など再灌流までの時間を検討したが、有意な脳梗塞体積・神経機能の改善は得られなかった。

以上より、BARD および RS-9 による Nrf2 活性化は、脳虚血再灌流障害に対し保護効果を持ち、その効果は BBB の保護を含んでいる

ことが示された。



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 3 件)

Takagi T, Imai T, Mishiro K, Ishisaka M, Tsujimoto M, Ito H, Nagashima K, Matsukawa H, Tsuruma K, Shimazawa M, Yoshimura S, Kozawa O, Iwama T, Hara H. Cilostazol ameliorates collagenase-induced cerebral hemorrhage by protecting the blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab.* Vol. 37(1) 123-139, 2017、査読有
Imai, T., Takagi, T., Kitashoji, A., Yamauchi, K., Shimazawa, M., Hara, H. Nrf2 activator ameliorates hemorrhagic transformation in focal cerebral ischemia under warfarin anticoagulation. *Neurobiology of Disease.* 89: 136-146, 2016、査読有
Yamauchi K, Nakano Y, Imai T, Takagi T, Tsuruma K, Shimazawa M, Iwama T, Hara H. A novel nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) activator RS9 attenuates brain injury after ischemia reperfusion in mice. *Neuroscience.* 333: 302-10, 2016、査読有

[学会発表](計 1 件)

高木俊範、今井貴彦、三代圭祐、石坂光

絵、松川悠、鶴間一寛、嶋澤雅光、吉村
紳一、岩間亨、原英彰、Cilostazol
ameliorates collagenase-induced cerebral
hemorrhage by protecting the blood brain
barrier、第27回日本脳循環代謝学会総会、
富山国際会議場（富山県、富山市）
2015/10/30-31

岐阜薬科大学 薬効解析学

〔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

高木 俊範 (Takagi, Toshinori)
兵庫医科大学 医学部 助教
研究者番号：00452152

(4)研究協力者

原 英彰 (Hara, Hideaki)
岐阜薬科大学 薬効解析学 教授

吉村 紳一 (Yoshimura, Shinichi)
兵庫医科大学 医学部 主任教授

岩間 亨 (Iwama, Toru)
岐阜大学大学院医学系研究科 脳神経外科
教授

山内 圭太 (Yamauchi, Keita)
岐阜大学大学院医学系研究科 脳神経外科

江頭 裕介 (Egashira, Yusuke)
岐阜大学大学院医学系研究科 脳神経外科

今井 貴彦 (Imai, Takahiko)