

令和元年6月14日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19992

研究課題名(和文)脳虚血再灌流障害に対するスフィンゴリン脂質の保護効果

研究課題名(英文)Protective role of sphingo-lipid against brain ischemic re-perfusion injury

研究代表者

川堀 真人(Kawabori, Masahito)

北海道大学・大学病院・特任講師

研究者番号：50399870

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：スフィンゴリン脂質を使用し脳梗塞の再開通後の障害である虚血再灌流に対する保護効果を検証した。スフィンゴリン脂質の一種であるS1Pと同様の効果を持つ薬剤FTY720を一過性脳虚血モデルに投与することでその効果を確認した。そうすることでラットの梗塞巣の縮小や運動機能改善等の保護効果が確認され、その理由として炎症反応の強力な抑制および脳血液関門の構成タンパク質の細胞内移行を抑えていることが新たに証明された。脳梗塞に対して再開通療法が行われているが、FTY720はその際の障害を軽減できる可能性があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳梗塞に対する新たな治療法である再開通療法は多くの患者を救うことが出来る様になった。しかし新たな問題として再開通後に血流が急速に戻ることで傷ついた細胞がダメージを受ける虚血再灌流障害がクローズアップされている。本研究はその虚血再灌流障害を軽減できる方法の発見で有り、その機序まで深く踏み込んでいる。特に新規的な発見として脳梗塞再灌流時に生じる炎症をFTY720が急性期では無く亜急性期にブロックすること、また脳血液関門の崩壊を防ぐ効果があることを示すことが出来た。これは将来の新薬開発等に繋がる研究である。

研究成果の概要(英文)：Treatment against acute ischemic stroke has shown great advancement with thrombectomy. However, severe brain edema and subsequent brain damage may occur even after the rapid recanalization. Ischemic/reperfusion (I/R) injury is considered one of the major causes of the damage and recently draws increasing attention for novel therapeutic target. FTY720 (fingolimod), a widely known sphingosine-1-phosphate (S1P) receptor agonist approved as a treatment for multiple sclerosis due to its strong anti-inflammatory effect plays a variety of roles in neuroprotection including reduction of neuroinflammation. However, the role of FTY720 against I/R injury has not been fully elucidated. FTY720 significantly reduced infarction size and numbers of cell with apoptosis, and improved neurological score after I/R injury compared with the vehicle group. FTY720 significantly inhibits worsening of inflammation 9 days after insult. The present results suggest that FTY720 can ameliorates I/R injury

研究分野：脳神経外科学

キーワード：脳梗塞 フィンゴリモド 炎症反応

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳主幹動脈閉塞による脳梗塞は、発症後 90 日の段階で死亡もしくは重度介護状態 (Functionally dependent) になる確率が 60-90%にも及ぶ非常に重篤な疾患でありながら、今まではアルテプラゼ(rt-PA)静注療法のみが科学的有効性のある治療法であった。しかし 2015 年、血管内治療による血栓回収療法の有効性が複数の国際大規模ランダム化臨床試験において発表されたことで、今後本治療法の普及が予想される。その結果、脳血流再開に伴う神経所見改善が期待できるようになるが、反面、脳血流再灌流 (I/R) 障害の問題が今まで以上にクローズアップされることになると考える。脳虚血後の再灌流障害とは、再灌流が起きた際に組織内微小循環において 炎症反応・ 活性酸素・ グルタミンを含む興奮毒性を含む種々の細胞障害物質の産生亢進によって、血管内皮損傷・血小板/好中球活性化などが惹起されることで、結果血管内皮細胞障害(再閉塞: no reflow phenomenon)や遅発性神経細胞死(アポトーシス)・BBB 障害による浮腫増悪を含む複数の障害が発生しうる病態である。そもそも再灌流障害は脳のみに限らず、臓器移植後の血流再開時や心筋梗塞に対する血行再建術後など他の臓器でも注目されており、炎症に類似した側面を持つことが指摘されてきているが、その機序・治療法については依然不明な点が多い。その Breakthrough となりうる治療法として我々が今回着目したのは、スフィンゴ脂質(スフィンゴシン-1 リン酸: S1P)およびそのレセプターアゴニスト薬剤のフィンゴリモド (FTY720) である。以前は単に細胞膜構成成分と考えられていたスフィンゴ脂質であるが、ごく近年、細胞内外のシグナル伝達に関与し、細胞増殖・代謝制御・細胞保護効果があることがわかってきた。以降、セラミド・スフィンゴシン・スフィンゴシン-1-リン酸(S1P)等のスフィンゴ脂質代謝産物およびその代謝酵素(スフィンゴシンキナーゼ、SK)に対する多くの研究が行われ、特に S1P は細胞表面に存在する S1P receptor1 (S1P1) に結合し ERK/Akt 系等の Signaling pathway を通じて細胞保護作用(cell survival)や虚血耐性獲得等の Positive な効果を起こすことが証明されている。また既に本邦でも多発性硬化症に対して保険適応がおりている免疫抑制剤フィンゴリモド (FTY720) は、体内においてリン酸化され、S1P レセプターアゴニストとして機能していることが分かっており、心筋虚血における細胞保護効果についても報告されている。本研究に着目した理由は、本申請者が 2011-2014 に米国カリフォルニア大学サンフランシスコ校 (UCSF) に留学し、マイクログリアを中心とした脳梗塞の炎症制御メカニズム研究に従事した際に、心筋再灌流とスフィンゴ脂質に関する研究の第一人者である UCSF 循環器内科教授 Karl Linner 博士の Lab と共同研究を行う機会を得たことにある。研究の予備実験で、スフィンゴ脂質がマウス完全虚血モデルにおいてマイクログリア活性および神経細胞死を有意に抑制することを明らかにした。しかし、その効果は限定的であったため、本実験に至ることはなかった。その後スフィンゴ脂質の Review article を筆頭著者として執筆する中で、循環器領域で示されているスフィンゴ脂質は再灌流時において特にその細胞保護効果が強いことを知り、脳虚血再灌流モデルでのスフィンゴリン脂質の効果こそが検討されるべきものであると気づいた。実際これらについてはほとんど研究されておらず、さらに中枢神経における炎症反応の主体であるマイクログリアの S1P/フィンゴリモド投与下での動態に関しては全く不明であることがわかった。

以上より、

2. 研究の目的

脳虚血再灌流療法後のマイクログリアの活性化抑制や神経細胞死などの有害事象に対して S1P およびフィンゴリモドが有効である可能性について、本研究を通じて、その機序を含む詳細を検討し、将来の臨床治験および標準治療化に向けた検討を行いたいと考えている。

3. 研究の方法

8週オスSDラットを使用した。Vehicleグループ、低用量(0.5mg/kg)FTY720グループ、高用量(1.5mg/kg)FTY720グループを使用し、中大脳動脈の2時間一過性脳虚血モデルを作成した。脳梗塞モデルはシリコンフィラメントを用いて作成した。その後、1週間にわたって、神経学的評価を行い、その後、切片を用いて脳梗塞サイズ、BBBの破綻、炎症細胞およびアポトーシス細胞の免疫染色法を評価した。また神経炎症の経過を脳梗塞後2日目と9日目に動物用PETで測定した。細胞培養を用いたin-vitro研究として、Bovine Brain Microvascular Endothelial Cellを使用し、培養細胞を4時間の酸素栄養飢餓状態(Oxygen-glucose deprivation; OGD)4時間再灌流を行いOGDモデルを確立した。その後5つのグループに分け実験を行った。(1)コントロールグループ:OGDなし、(2)Vehicleグループ:OGDのみ、(3)FTY720グループ:OGD解除直前に100nMのFTY720投与、(4)FTY720-Pグループ:OGD解除直前に100nMのFTY720-P投与、(5)FTY720-Pと百日咳毒素(PTX:S1Pレセプターのアンタゴニスト)投与グループ:OGD解除直前に100nMのFTY720-PとPTXを投与。その上で、脳血液関門のtight junctionとadherens junctionの構成要素である、ZO-1, Occludin, Claudin-5, VE-cadherinの発現をリアルタイムPCRとWestern blottingで調べ、免疫染色で発現部位を調べた。シグナリングを調べるためS1Pレセプターの下流に存在するERK1/2の発現もwestern blottingで検討した。

4. 研究成果

FTY720投与により、脳梗塞のサイズの縮小(Figure 1A)、死亡率の改善(Figure 1B)、microgliaとmacrophage抑制効果(Figure 2A,B)は用量依存的に改善した。また運動機能回復の促進(Figure 1C,D)、BBB保護効果(Figure 3)、アポトーシス抑制効果(Figure 2C)に関してはFTY投与の低・高用量の両群でvehicleに比較し有意に改善が確認された。PETによる経時的な炎症反応の経過を観察し

たところ、FTY720投与は用量依存性に炎症反応の亜急性での悪化を抑制したことが分かった(脳梗塞後2日目の炎症は各グループで変わりなかったが、9日後ではFTY投与グループで有意に抑制され、特にFTY720高用量グループではほとんど炎症の進行が認められなかった)(Figure 4)。Real time PCR・Western blotting

でBBBのtight/adherens junctionの構成要素の発現を検討したが、FTY720およびFTY720-Pの投与を行っても改善は認められなかった。一方、tight/adherens junctionの細胞間隙での分布は通常の状態であれば、細胞間にこれらBBB構成要素タンパク質が局在しており、虚血

Figure1

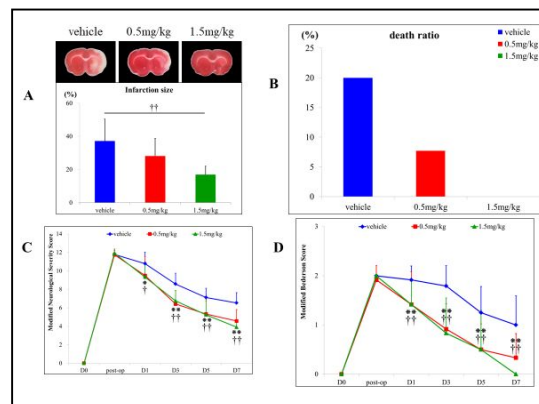


Figure2

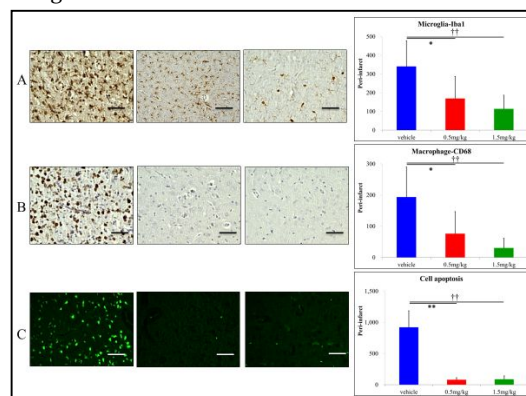
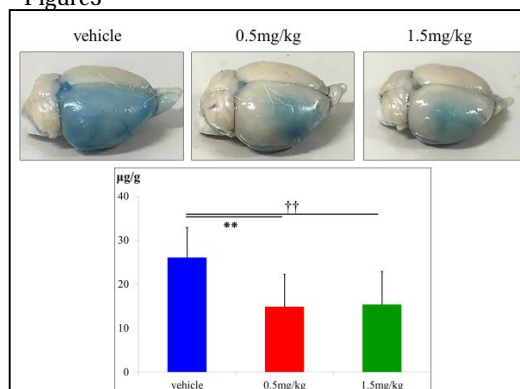


Figure3



負荷によって細胞内にこれらのタンパクが移動し、結果 BBB の破綻をもたらしていたが、FTY720-P を投与することで細胞内への移動を防ぐことが出来ることが確認された。この機序は FTY720 投与では得ることが出来なかった(Figure 5)。その理由として血管内皮細胞は十分な酵素を有していないことから FTY720 が FTY720-P に変換されなかったことが考えられた。またこの効果は S1P レセプターアゴニストの PTX を投与することでブロック出来、BBB 構成要素は S1P レセプターのシグナリングが関与していることが証明された。そしてその効果は S1P レセプター下流の ERK1/2 が関係していることも証明された。

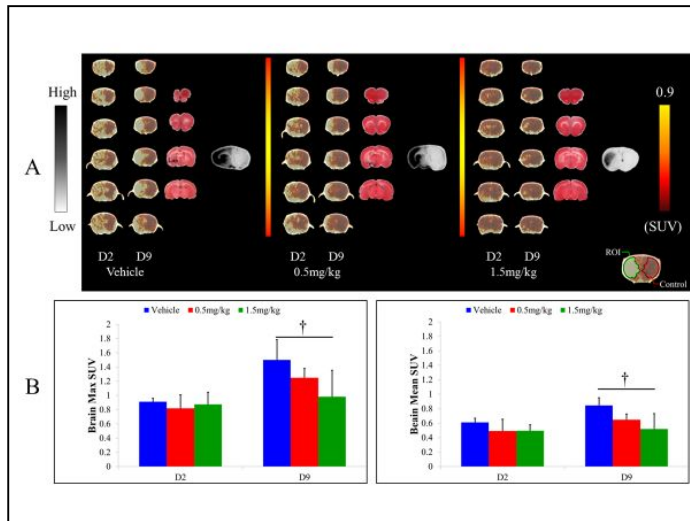


Figure4

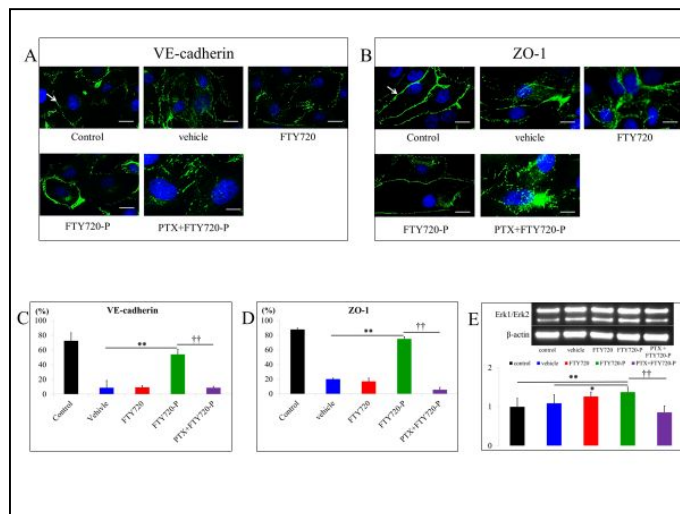


Figure5

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Zifeng Wang, Masahito Kawabori, Kiyohiro Houkin. FTY720 (fingolimod) ameliorates brain injury through multiple mechanisms and is a strong candidate for stroke treatment. Current Medicinal Chemistry, 査読有, E-pub ahead of print

〔学会発表〕(計1件)

Zifeng Wang, FTY720 (Fingolimod) Ameliorates Ischemia Reperfusion Injury In Experimental Stroke Model, International Stroke Conference 2019, 2019年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等 <https://kawabori-neurosurgery.com/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者
研究協力者氏名：王 シホウ
ローマ字氏名：Zifeng Wang

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。