

令和元年5月7日現在

機関番号：37111

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07300

研究課題名(和文) 脳梗塞進行度を反映したPentraxin3 のt-PA適応マーカーとしての確立

研究課題名(英文) Establishment of pentraxin3 as a t-PA adaptive marker reflecting the progression of cerebral infarction

研究代表者

中野 貴文 (Takafumi, Nakano)

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号：40804539

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、血管炎症性物質のペントラキシン3(PTX3)が脳梗塞の進行を予測するマーカーとして有用であるかを脳梗塞モデルマウスおよびヒト臨床検体を用いて検討した。その結果、脳梗塞発症から時間の経過に従って、血漿中PTX3濃度が上昇することが明らかとなった。脳梗塞に最も有効な治療薬のt-PAは脳梗塞の進行度により適・不適が決まる。PTX3と脳梗塞進行度の関係性が明らかになれば、よりの確にt-PAの適・不適を決定出来るようになる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳梗塞患者に対して、血栓を溶かすことができるt-PAを投与できるかどうかは、その患者の予後を大きく左右する。そのため、t-PA適応患者を見分ける基準が策定されることは、脳梗塞の後遺症を回避するために重要である。本研究成果をもとに、PTX3濃度と脳梗塞の進行度の関係性が更に明らかとなれば、脳梗塞発症時刻がわからない患者においても、ある程度の発症時刻を予測することができ、t-PAの適応患者の拡大に繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined whether the vascular inflammatory substance pentraxin 3 (PTX3) is useful as a marker for predicting the progression of cerebral ischemia using cerebral ischemic model mice and human clinical samples. As a result, we found that the plasma PTX3 concentration increases with the passage of time from the onset of cerebral ischemia. The most effective therapeutic agent for cerebral ischemia, t-PA, depends on the degree of progression of cerebral ischemia. If the relationship between PTX3 and the progression of cerebral ischemia is clarified, it will be easy to judge the appropriateness or inappropriateness of t-PA therapy.

研究分野：脳神経科学

キーワード：脳梗塞 PTX3 t-PA

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

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞を含む脳血管疾患は、総患者数が約 123 万人であり、脳梗塞による年間死亡者は約 7 万人と重篤な疾患である (厚生労働省平成 23 年「患者調査の概要」)。血栓溶解薬の tissue plasminogen activator (t-PA) は脳梗塞に対して、劇的な治療効果を発揮する。しかし、t-PA による強力な血栓溶解作用は投与が遅延すると、脳出血を誘発し、むしろ死亡率が上昇する。そのため、t-PA による脳梗塞治療は、脳梗塞発症後 4.5 時間以内と限定されている (脳卒中治療ガイドライン 2015)。このような「時間のみに基づく投与基準」では、脳梗塞発症時刻を問診で聞くしかいないため、t-PA を投与すべき患者と投与すべきではない患者のふり分けが困難である。よって、t-PA 投与を支持する生体内マーカーを発見し、t-PA 適応マーカーとして新たに投与基準を策定することで、t-PA 適応患者を拡大させ、より安全で適切に脳梗塞を治療できると考える。

我々は、t-PA 適応マーカーの候補として、pentraxin3 (PTX3) に着目した。PTX3 は炎症マーカーの代表例である CRP と同じ pentraxin ファミリーに属するタンパクである。CRP は主に肝臓で産生されるのに対し、PTX3 は血管内皮細胞で産生されるため、CRP と比べて血管炎症への特異性が高く、血管損傷を素早く把握するのに適している。更に、心血管疾患に関しては、PTX3 は IL-6 や TNF- α に比べて血管の局所炎症に対し、鋭敏に反応するという報告もある。¹⁾ 脳梗塞に対して t-PA を投与する際には、血管損傷の程度が脳出血誘発と関連すると考えられる。つまり、我々は、PTX3 は脳梗塞時の血管損傷の程度をいち早く反映するバイオマーカーとなり、t-PA 適応マーカーとしての可能性を持つと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、PTX3 は脳梗塞の進行度や重症度を反映し、t-PA の適応を判断するバイオマーカーとして有用であることを証明することを目的に、脳梗塞モデルマウスを用いて、脳梗塞後の血中 PTX3 濃度の変動と t-PA 投与による脳出血の有無に因果関係があるか、脳梗塞患者の血液を経時的に採取し、血中 PTX3 濃度と脳梗塞経過時刻に因果関係はあるか、および t-PA 適応マーカーとなりえるか (図 1)、の 2 点について検討を行う。

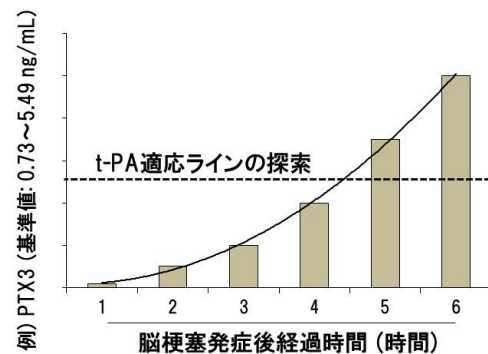


図1. PTX3によるt-PA適応マーカーの探索

3. 研究の方法

(1) 脳梗塞モデルマウスにおける脳梗塞後の PTX3 の体内動態変化の解明

体重 25-35g の 6 週齢 ddY 雄マウスの中大脳動脈 (middle cerebral artery: MCA) を閉塞し、脳梗塞モデルマウスを作製した。このモデルマウスを用いて、MCA 閉塞後 2 時間後、4 時間後、24 時間後の脳および血液を採取した。脳サンプルは Bradford 法によりタンパク濃度を 20 μ g protein に統一し、血液は遠心機にかけ血漿を取り出した。これらの脳サンプルおよび血漿サンプルを Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 法を用いて、PTX3 濃度を測定し、脳梗塞後の PTX3 の体内動態を確認した。

(2) 脳梗塞モデルマウスにおける t-PA 投与と梗塞巣体積、脳出血の有無確認

上記同様に脳梗塞モデルマウスを作製した。t-PA の投与が遅れると、脳出血が起きることを動物モデルでも証明するために、2 グループの検討を行った。グループ A: MCA 閉塞後 2 時間後に t-PA 10 mg/kg を尾静脈投与し、MCA 閉塞後 24 時間後に脳を取り出し、梗塞巣体積および脳出血量を Image J で測定した。グループ B: MCA 閉塞後 4 時間後に t-PA 10 mg/kg を尾静脈投与し、MCA 閉塞後 24 時間後に脳を取り出し、梗塞巣体積および脳出血量を Image J で測定した。

(3) ヒト脳梗塞検体での PTX3 測定

福岡大学病院救命救急センターに搬送された脳梗塞患者の血液を採取する (倫理委員会承認済み)。取得した血漿中の PTX3 濃度を PTX3 ELISA を用いて測定する。また、対象患者のカルテから、脳梗塞発症後の経過時間、t-PA 適応患者と非適応患者、各種検査値と脳卒中重症度評価スケールを抽出する。これらのカルテ記載事項と測定した血中 PTX3 濃度について、統計解析ソフト JMP 13 を用いて、相関があることを明らかにする。

4. 研究成果

(1) 脳梗塞モデルマウスにおける脳梗塞後の PTX3 の体内動態変化の解明

MCA 閉塞後 2 時間時点、4 時間時点における脳内および血漿中 PTX3 濃度を評価した。その結果、脳内 PTX3 濃度は sham 群、MCA 閉塞 2 時間経過群で変化はなかったが、4 時間経過群では有意な上昇が認められた (図 2) ($P < 0.05$, Tukey-Kramer test)。更に、血漿中 PTX3 濃度についても sham 群、2 時間経過群で変化はなかったが、4 時間経過群では有意な上昇を認めた (図 3) ($P < 0.05$, Tukey-Kramer test)。以上のことから、脳梗塞モデルマウスにおいて、脳梗塞発症から時間の経過に従って脳内 PTX3 濃度が上昇することが明らかとなった。また、同様に血漿中

PTX3 濃度も上昇することから、脳内の異変を末梢血で早期に反 d n できる指標として PTX3 は有用なマーカーであると考えられる。

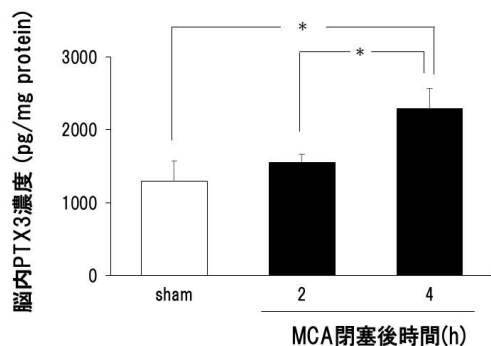


図2. MCA閉塞後の脳内PTX3濃度の経時的変化

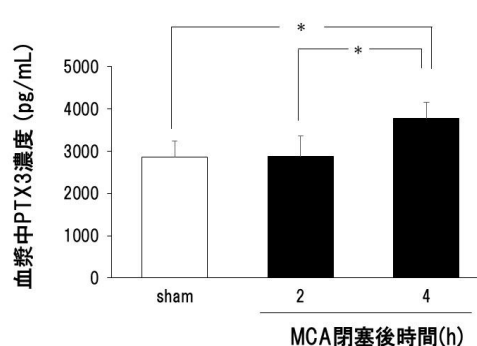


図3. MCA閉塞後の血漿中PTX3濃度の経時的変化

(2) 脳梗塞モデルマウスにおける t-PA 投与と梗塞巣体積、脳出血の有無確認

グループ A: MCA 閉塞後、PTX3 の上昇がみられない 2 時間時点で t-PA (10 mg/kg iv) を投与した際の梗塞巣体積は、vehicle 投与群と比較して有意に低下した (vehicle vs. t-PA; $91.8 \pm 9.8 \text{ mm}^3$ vs. $41.4 \pm 10.9 \text{ mm}^3$; $P < 0.05$)。また、脳出血は両群で認めなかった。

グループ B: MCA 閉塞後、PTX3 の上昇がみられる 4 時間時点で t-PA (10 mg/kg iv) を投与した際の梗塞巣体積は、vehicle 投与群と比較して変化を認めなかった (vehicle vs. t-PA; $99.8 \pm 10.1 \text{ mm}^3$ vs. $96.4 \pm 7.4 \text{ mm}^3$)。しかし、脳出血は vehicle 投与群に比べて t-PA 投与群で有意に高値を示した (vehicle vs. t-PA; $3.1 \pm 0.6 \text{ mm}^3$ vs. $10.1 \pm 0.5 \text{ mm}^3$; $P < 0.05$) (図 4; 写真)。

また、我々は t-PA 投与前に PTX3 抗体をマウスに投与し、

その後、t-PA 投与を行ったが、結果は脳出血有無の結果に大きな影響は与えなかった。

PTX3 は脳梗塞発症から上昇をはじめ、有意に高値になった時点で t-PA を投与すると t-PA による脳出血が誘発されることが明らかとなった。これらの結果より、動物実験においては PTX3 は t-PA の適応を判断するバイオマーカーとして有用であることが示唆された。

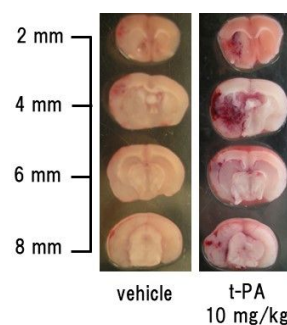


図4. MCA閉塞4時間時点での t-PA 投与による脳出血の有無

(3) ヒト脳梗塞検体での PTX3 測定

動物実験の結果をもとに、脳梗塞患者の血液検体を用いて、血中 PTX3 濃度と脳梗塞発症からの経過時間、重症度などに関連性があるかを検討した。その結果、PTX3 の濃度上昇と脳梗塞の進行具合には正の相関があすことが示唆された。PTX3 が脳梗塞に対して、特異的マーカーとなりえるか検討するため、PTX3 と同ファミリーである CRP と脳梗塞発症からの経過時間の相関関係を評価したが、CRP に関しては相関関係を認めなかった (図 5)。従って、PTX3 は炎症マーカーの中でも脳梗塞に対してより鋭敏に反応するマーカーであると考えられる。

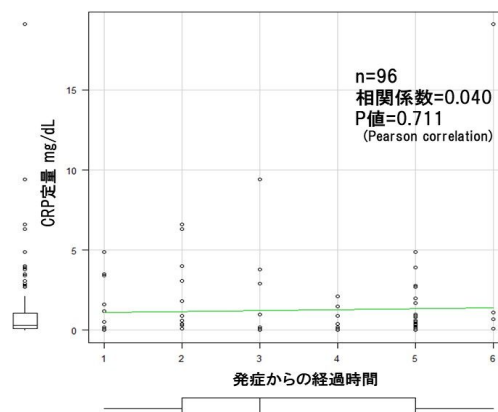


図5. 脳梗塞発症からの経過時間とCRP濃度の関係

<引用文献>

- Shiga T, et al. The Lipid 2007. 18:26-31
Nakano T, et al. Brain Res 2015. 1624:330-335

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

1. Nakano T, Nakamura Y, Matsuyama K, Irie K, Yasumura M, Hirata Y, Yamasaki M, Misumi K, Yamashita Y, Myose T, Matsuo K, Sano K, Kamimura H, Ishikura H, Egawa T, Mishima K. Long-term treatment with thrombomodulin improves functional outcomes after cerebral

ischemia even if administration is delayed. Thromb Haemost. 119:467-478, 2019 (査読有)
2. Nakano T, Nishigami C, Irie K, Shigemori Y, Sano K, Yamashita Y, Myose T, Tominaga K, Matsuo K, Nakamura Y, Ishikura H, Kamimura H, Egawa T, Mishima K. Goreisan prevents brain edema after cerebral ischemic stroke by inhibiting aquaporin 4 upregulation in mice. J Stroke Cerebrovasc Dis. 27:758-763, 2018 (査読有)

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 中野 貴文, 仲村 佳彦, 入江 圭一, 松山 清, 山崎 元貴, 安村 真子, 山下 郁太, 明瀬 孝之, 石倉 宏恭, 三島 健一, 江川 孝. ヒト遺伝子組み換えトロンボモジュリンの慢性期連日投与が脳梗塞の機能的予後に与える影響. 日本薬学会第 139 年会. 2019
2. 岡野 志のぶ, 中野 貴文, 仲村 佳彦, 入江 圭一, 山崎 元貴, 神崎 愛, 山下 郁太, 明瀬 孝之, 佐藤 朝光, 松尾 宏一, 佐野 和憲, 三島 健一. 脳虚血モデルマウスに対するアンチトロンビン 製剤の有用性. 日本薬学会第 139 年会. 2019
3. Nakano T, Nakamura Y, Irie K, Yamashita Y, Myose T, Takase Y, Matsuo K, Kamimura H, Ishikura H, Sano K, Egawa T, Mishima K. Long-term treatment with recombinant human soluble thrombomodulin improves ischemic brain damage via regulating systemic HMGB1 levels in mice. Neuroscience 2018. 2018
4. Nakano T, Irie K, Nakamura Y, Sano K, Yamashita Y, Myose T, Matsuo K, Ishikura H, Egawa T, Mishima K. Neuroprotective effect of recombinant human soluble thrombomodulin against cerebral ischemic stroke via regulation of high-mobility group box 1 in mice. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology. 2018
5. Nakano T, Irie K, Yamashita Y, Myose T, Sano K, Nakamura Y, Satho T, Kai M, Tominaga K, Kamimura H, Mishima K, Egawa T. Effect of delayed treatment with ADAMTS13 on cerebral ischemic injury compared with tPA. Neuroscience 2017. 2017

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：三島 健一、江川 孝、佐野 和憲、仲村 佳彦、入江 圭一、山下 郁太

ローマ字氏名：Mishima Kenichi、Egawa Takashi、Sano Kazunori、Nakamura Yoshihiko、Irie Keiichi、Yamashita Yuta

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。