

令和 2 年 4 月 6 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09746

研究課題名(和文) 神経分泌性ペプチドを標的とした脳梗塞急性期の新規治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapeutics for acute phase of cerebral infarction targeting neurosecretory peptides

研究代表者

山口 淳 (Yamaguchi, Atsushi)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：00314336

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：脳梗塞急性期の治療法は、血管再開通療法と神経保護療法に大別される。前者は超急性期(脳梗塞後～8時間以内)に血栓溶解療法や脳血管内治療が施行されるが、適応患者は限定されるため、急性期あるいはそれ以降の脳梗塞の病態解明や、神経保護薬などの治療法の開発は急務である。当該研究は、マウス脳梗塞モデルを用い、脳梗塞の急性期に誘導される神経分泌ペプチドの神経保護効果の検証と、急性期から慢性期に渡る長期的な脳梗塞の病態解析を施行した。ペプチドの神経保護効果は認めなかったが、脳梗塞後の炎症所見の長期的な持続(4週間)を認め、脳梗塞後の炎症制御が治療ターゲットとして重要である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳血管障害は日本人の死因の第4位であり、65歳以上の要介護患者の原因の第1位を占め、入院となる原因疾患の第1位である。なかでも脳梗塞は脳血管障害の約6-7割を占め、その予防法や治療法の開発は急務である。脳梗塞の超急性期の治療法である血管再開通療法の適応患者は限定されるため、急性期以降の病態解明や神経保護薬の開発も肝要である。当該研究ではマウス脳梗塞モデルを用い急性期に誘導される神経分泌ペプチドの神経保護効果の検証と、脳梗塞の長期的病態解析を施行した。脳梗塞後の長期的な炎症持続を認め、脳梗塞後の炎症制御が重要である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Treatment in the acute phase of cerebral infarction is roughly classified into revascularization therapy and neuroprotective therapy. In the former case, thrombolytic therapy or cerebrovascular therapy is performed during the hyperacute phase (within 8 hours after cerebral infarction), but the indication is limited. The development of treatments such as neuroprotective drugs is urgent. In this study, we performed a mouse cerebral infarction model to verify the neuroprotective effects of neurosecretory peptides induced during the acute phase of cerebral infarction and to analyze the pathology of long-term cerebral infarction from the acute to the chronic phase. Although no neuroprotective effect of the peptide was observed, long-term persistence of inflammatory findings after cerebral infarction (4 weeks) was confirmed, suggesting that inflammatory control after cerebral infarction may be important as a therapeutic target.

研究分野：神経科学

キーワード：脳梗塞

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

## 1. 研究開始当初の背景

脳血管障害は日本人の死因の第4位で、65歳以上の要介護患者の原因の第1位を占め、入院となる原因疾患の第1位である。なかでも脳梗塞は脳血管障害の約6-7割を占め、その予防法や治療法の開発は急務である。脳梗塞急性期の治療法は、血管再開通療法と神経保護療法に大別され、前者として超急性期に血栓溶解療法(tPA 静注療法)や脳血管内治療(脳血栓回収療法)が施行されるが適応患者は限定される。より多くの患者に投与可能な神経保護薬は、現時点では抗酸化剤のみであり新たな脳梗塞急性期の治療薬の開発が切望される。また、治療薬開発のためにも急性期以降の長期的な脳梗塞の病態解析が必要である。

## 2. 研究の目的

### (1) 長期的生存可能なマウス脳梗塞モデル確立

齧歯類脳梗塞モデルは、大きく全脳虚血モデル(Global Cerebral Ischemia model)と部分脳梗塞モデル(Focal Cerebral Ischemia model)に分類される。後者は中大脳動脈閉塞モデル(MCAO, middle cerebral artery occlusion model)、光凝固モデル(Photothrombosis model)、脳血栓モデル(thrombosis model)などがある。現在、中大脳動脈閉塞モデル(MCAO model)が主流でありヒトの病態に近いという長所がある一方で、永久的な閉塞モデル(permanent MCAO model)では24時間以上の生存は困難であり、一過性閉塞モデル(transient MCAO model)が用いられる。一過性閉塞モデルは酸化ストレスの影響が大きく、脳梗塞部位の個体差が大きい短所がある。

当該研究では、再現性が良く、個体差間の脳梗塞部位の変動が少なく、長期的な病態解析を施行するため長期生存が可能なマウス脳梗塞モデルを確立する。当該目的のため、ラットで確立され再現性が良く、長期生存が可能な光凝固モデル(Photothrombosis model)をマウスに応用する。

### (2) 長期的なマウス脳梗塞モデルの解析

現在の基礎医学研究では、脳梗塞急性期の病態解析研究が主流であり、急性期以降から慢性期にかけての長期的な脳梗塞の病態解析は乏しい。上述したように、超急性期に施行される血栓溶解療法などは適用患者が限られ、急性期以降の脳梗塞患者の治療法開発のためにも、長期的な解析が必要である。当該研究は、急性期から慢性期に至る長期的な病態解析(形態学的、遺伝子学的、Neurovascular Unit 概念に基づく解析)を施行する。

### (3) 神経分泌ペプチドの神経突起伸張作用・神経保護効果の検証

申請者は、内因性の分泌性因子を標的としたスクリーニングで、新たな脳梗塞治療薬候補として神経分泌性ペプチド VGF を報告した(引用文献#1)。本ペプチドは、脳梗塞巣周囲の回復可能な「Penumbra 領域」に誘導され、プロセッシングされて複数のペプチド断片となる。神経培養細胞を用いた全長による *in vitro* 解析で、神経突起伸張作用と虚血ストレスでの神経保護作用を確認したが、効能を有するプロセッシング後のペプチド断片は不明である。当該研究では、効能を有するペプチド断片の同定(*in vitro* 解析)、マウス脳虚血モデルを用いた検証(*in vivo* 解析)を施行し、神経分泌性ペプチドによる脳梗塞急性期の新規治療薬の可能性を探る。

## 3. 研究の方法

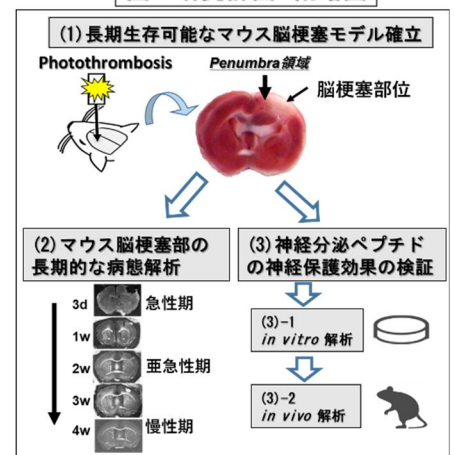
### (1) 長期生存可能なマウス脳梗塞モデル確立

当該研究では上述したように、長期的生存が可能で、再現性が良く、個体差間の脳梗塞部位の変動が少ないマウス脳梗塞モデルを確立する。そのため過去文献(引用文献 #2)よりラットで確立している光凝固脳梗塞モデル(Photothrombosis model)をマウスに応用する。このモデルは、光感受性物質 Rose Bengal(CAS #632-69-9, Sigma R3877-5G)を血管内(腹腔内)に投与し、頭蓋骨を露出し、脳梗塞を惹起する部位に pinpoint に頭蓋上から Cold light(SCHOTT KL1500 LCD)で光照射するものである。マウス用に、Rose Bengal 量と、光量や照射面積や照射部位(マウス脳皮質の感覚運動野 S1)を調節し最適な条件を検討する。

### (2) 長期的なマウス脳梗塞モデルの解析

当該研究では、急性期から慢性期に至る長期的な病態解析を施行する。特に、Neurovascular unit 概念に基づき、グリア細胞、脳浮腫に関する形態学的解析を施行する。また Real time-PCR 法を用いて、炎症性因子、神経再生・可塑性因子、神経栄養因子などの経時的な遺伝子発現解析を行う。

図1. 研究計画 概略図



### (3) 神経分泌ペプチドの神経突起伸展作用・神経保護効果の検証

神経保護作用を有する VGF ペプチド断片のスクリーニング(*in vitro* 解析)

当該研究室で確立しているラット褐色細胞腫由来 PC12 細胞を用いた化学的虚血(Chemical ischemia)ストレスに対する神経保護作用を利用したスクリーニングを施行する。

また、PC12 細胞は低血清培地による培養条件下で神経栄養因子 NGF を投与すると神経突起伸展(neurite outgrowth)が促進される。VGF は NGF 投与時に誘導され、神経突起伸展を促進することを我々は報告した(Sakamoto et al., 2015)。以上より、PC12 細胞に VGF ペプチド断片を投与し、神経突起伸展作用を評価することにより、VGF ペプチド断片のスクリーニングを施行する。

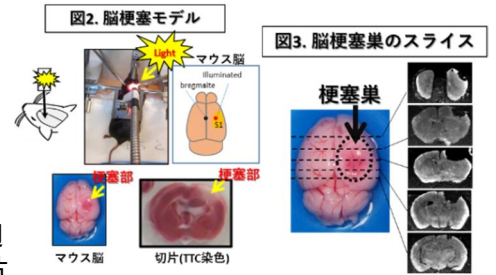
マウス脳虚血モデルを用いた解析 (*in vivo* 解析)

上記のスクリーニングで同定したペプチド断片を、マウス脳虚血モデルに投与して、その神経保護作用を評価する。

## 4. 研究成果

### (1) 長期生存可能なマウス脳梗塞モデル確立

ラットで確立している光凝固脳梗塞モデル(Stroke, 40 (1),248-53,2009)をマウスに適用した。腹腔内投与量は Rose Bengal 量 (150ul, 濃度 100mg/ml)が適量であり、投与後 5 分後に、Cold light(SCHOTT KL1500 LCD、レベル: Maximum)で、照射時間 15min とした。光源の投射部位は、マウスの感覚運動野(S1)に相当する大泉門(bregma)の横 2 mm の部位とした(図 2)。以上の条件で、図 3 の様な皮質梗塞が再現性良く惹起され、その後の長期生存(4 週間以上)を確認した。更に当該脳梗塞モデルは脳梗塞直後に軽度の片麻痺を認めた。



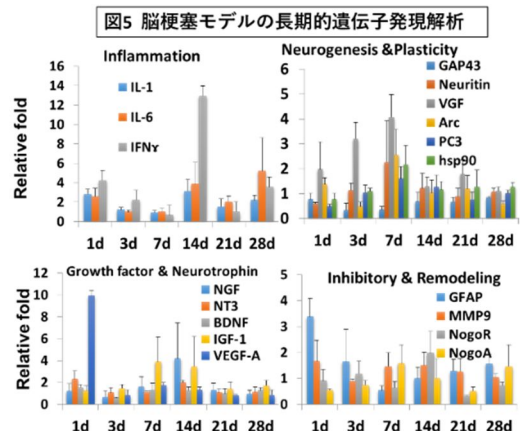
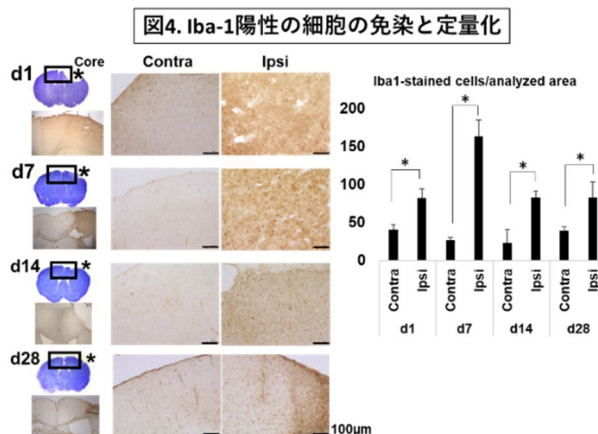
### (2) 長期的なマウス脳梗塞モデルの解析

#### 形態学的解析

脳梗塞後の炎症ではミクログリアの活性化が報告されている。ミクログリアを検出するための抗 Iba-1 抗体を用いて免疫染色を施行した(図 4)。脳梗塞後 1 日目より、脳梗塞巣周囲に Iba-1 陽性のミクログリアの集簇(破壊された脳血管関門から侵入してくるマクロファージも含まれる)を認めた。強拡大では、アメーバ状の活性化ミクログリアの形態を呈した。単位面積あたりのミクログリアの数をカウントすることで定量化したところ、脳梗塞後 7 日目に最大数となった。興味深いことに、ヒト脳梗塞の慢性期に相当する脳梗塞後 28 日目にも Iba-1 陽性細胞の相対的な増加を認め、急性期から慢性期の長期間に渡り炎症反応が持続していることが示唆された。

#### 遺伝子発現解析

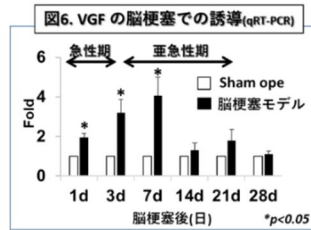
急性期から慢性期の長期的な病態解析として、炎症性因子(IL-1, IFN $\gamma$ , IL-6)、神経新生・可塑性因子(GAP43, Neuritin, VGF, Arc, PC3)、神経栄養因子(NGF, NT3, BDNF, IGF1, VEGF)、軸索伸展阻害・再構成因子(NogoA, NogoR, MMP9, GFAP)などの遺伝子発現を Real-time PCR 法で解析した(図 5)。上述の形態学的解析では、脳梗塞後 7 日目をピークに Iba-1 陽性細胞の増加を認めたが、炎症性因子の遺伝子発現変化として急性期(1-3 日目)と亜急性期(14 日目)の発現ピークを認めた。また、脳梗塞後 7 日目以降に、栄養因子、神経再生因子や神経回路リモデリング因子の遺伝子発現誘導を認めた。更に脳梗塞後の急性期～亜急性期(~7 日)に VGF 遺伝子の有意な発現誘導を認めた(図 6)。





## 運動機能評価

当該モデルは、脳梗塞直後に軽度の片麻痺を認める。片麻痺による運動麻痺を評価するために、Rota rod test, Grid walk, Cylinder test により運動機能を評価した(図 7)。しかし、脳梗塞後 3~7 日の間に軽度の片麻痺は改善し運動麻痺は検出できなくなった。この結果より、治療薬候補のスクリーニングには当初使用予定であった運動機能評価は使用しなかった。



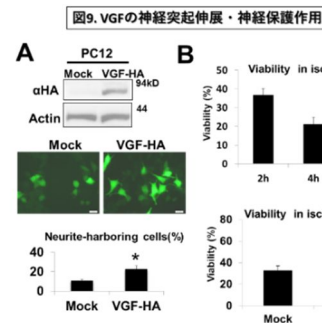
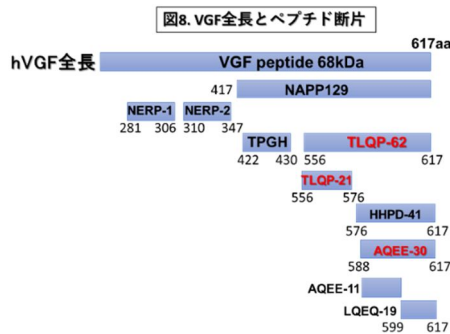
## (3) 神経分泌ペプチドの神経突起伸張作用・神経保護効果の検証

### 神経保護作用を有する VGF ペプチド断片のスクリーニング(*in vitro* 解析)

上述したように神経分泌ペプチド VGF は脳梗塞の急性期~亜急性期(1-7 日)に遺伝子発現誘導される全長 617 アミノ酸(68kD)のタンパク質(図 8)である。

当該研究グループは、既に PC12 細胞に VGF を強制発現すると神経突起伸張作用を示す(図 9 A)ことを報告している(引用文献#1)。同様に、*in vitro* 系で VGF を強制発現する事で虚血ストレス下での生存率が上昇することを示した(図 9 B)。

VGF は、実際は神経細胞内でプロセッシングされ複数のペプチド断片となって分泌される。我々はその中で、過去文献より TLQP-62、TLQP-21、AQEE-30 の 3 つのペプチド断片に着目した(図 8)。この 3 つのペプチド合成を外注依頼して以下のアッセイに用いた。



### -1,神経突起伸張アッセイ

ラット褐色細胞腫 PC12 細胞は、通常培地(DMEM+10% FBS)から低血清培地(DMEM+2% FBS)に培地交換すると細胞増殖が停止(細胞周期停止)する。この状態で神経栄養因子 NGF(100ug/ml)を添加すると神経突起伸張が誘導される。この系を用いて、低血清培地(DMEM+2% FBS)で、上記 3 つの VGF 由来のペプチド(TLQP-62, TLQP-21, AQEE-30)を各 40nM 濃度で投与した。NGF は陽性コントロール(positive control)であるが、NGF 投与時に神経突起伸張が惹起されるが、AQEE-30, TLQP-21, TLQP-62 を投与しても形態学上は神経突起伸張を認めなかった。

### -2,神経保護作用の検証

*in vitro* における虚血ストレス暴露法として、培地よりグルコースを除き、Azide とグルコース阻害剤(2-deoxy glucose)を投与する方法(CI, Chemical Ischemia)が用いられる(図 11)。当該研究では、96well plate で PC12 細胞を培養し、24 時間後に TLQP-62, TLQP-21, AQEE-30 を投与した状態で、PC12 細胞を Chemical ischemia に暴露した。3 時間後に、MTT Assay により生存率を Plate reader を用いて測定した。

まず、濃度依存性(各 10, 20, 40, 80nM)を評価したが、各ペプチドとも 10nM が最も効果を示す予備結果を得た。この結果を元に、生存率を測定したところ、TLQ-P21, AQEE-30 (各 10nM)で有意に Chemical stress 暴露時の生存率を上昇させる結果を得た(図 12)。

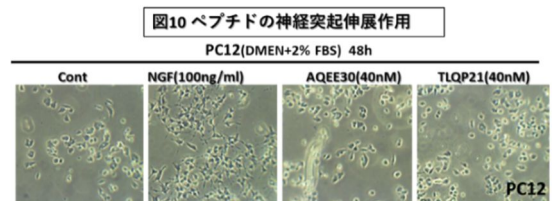
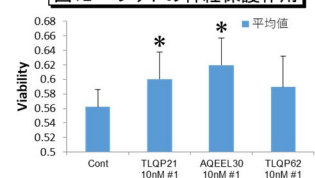


図11 虚血ストレス(Chemical Ischemia)



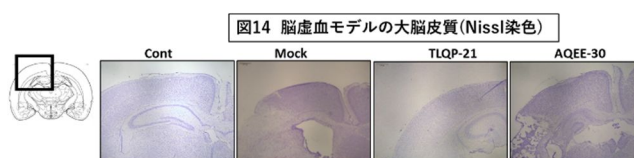
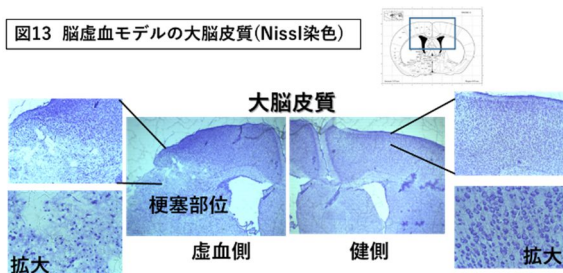
図12 ペプチドの神経保護作用



### マウス脳虚血モデルを用いた神経保護作用の解析 (*in vivo* 解析)

上記の *in vitro* 解析により、TLQ-P21, AQEE-30 (各 10nM) で神経細胞保護作用を示す可能性が示唆されたことから *in vivo* 解析を施行した。当初は、Photothrombosis model を解析に用いる予定であったが、非常に高価であるペプチド量の制限があり、既に他論文で確立されている生後 1 日の脳虚血マウスモデルを用いた (引用文献 #3, #4)。生後 1 日を低酸素に暴露して脳虚血を惹起するモデルである。

マウスに予め TLQ-P21, AQEE-30 の 2 ペプチドを腹腔内投与し脳虚血ストレスに暴露した。脳虚血マウスにおける神経保護作用の評価法は、薄切脳切片を作製し、Nissl 染色法で神経細胞の形態を評価する方法である (引用文献#3)。脳皮質や線条体など 8 部位の障害程度を評価し合計点で定量化する。しかし、図 14 に示すように TLQ-P21, AQEE-30 投与により control と比較して改善効果は認めなかった。



#### <引用文献>

- #1, Sakamoto et al., Transl Stroke Res, 6 (4), 301-8 Aug 2015
- #2, Stroke, 40 (1), 248-53, 2009
- #3, Brain Research 810 1998. 114-122
- #4, Neuroscience 352 (2017) 88-96

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tatsuya Jitsuishi, Seiichiro Hirono, Tatsuya Yamamoto, Keiko Kitajo, Yasuo Iwadate, Atsushi Yamaguchi	4. 巻 10 (1)
2. 論文標題 White Matter Dissection and Structural Connectivity of the Human Vertical Occipital Fasciculus to Link Vision-Associated Brain Cortex	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 820
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-57837-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Atsushi Yamaguchi *, Tatsuya Jitsuishi, Takashi Hozumi, Jun Iwanami, Keiko Kitajo, Hiroo Yamaguchi, Yasutake Mori, Masaki Mogi, Setsu Sawai	4. 巻 in press
2. 論文標題 Temporal expression profiling of DAMPs-related genes revealed the biphasic postischemic inflammation in the experimental stroke model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 山本達也、朝比奈正人、桑原聡、山口淳	4. 巻 36
2. 論文標題 PETおよびfMRI	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 60,62
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 山本達也、朝比奈正人、桑原聡、山口淳	4. 巻 36
2. 論文標題 電気生理学的検査	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 63,65
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 實石達也, 廣野誠一郎, 山本達也, 北城敬子, 小宮山政敏, 岩立康男, 山口淳
2. 発表標題 背側と腹側の視覚伝導路を連絡する神経伝導路の白質解剖
3. 学会等名 第124回 日本解剖学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口 淳, 廣野 誠一郎, 山本 達也, 北城 敬子, 岩立 康男, 實石 達也
2. 発表標題 腹側と背側視覚伝導路を連結する鉛直束(VOF)の白質解剖と神経束構成
3. 学会等名 第42回 日本神経科学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----