

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K10850

研究課題名(和文)血液凝固第九因子由来のペプチドによる外傷性脳損傷の治療

研究課題名(英文)The function of activation peptide of coagulation factor IX

研究代表者

日だい 智明(HIDAI, Chiaki)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：70228732

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：血液凝固第IX因子は、通常は血漿タンパクとして全身を循環しているが、出血部位では血液凝固反応に参加する。凝固反応で第IX因子が活性化される時には、そのactivation peptideと呼ばれる部分が切断され、activation peptideの機能は第IX因子の活性化制御と考えられてきた。我々の研究室では、これまでに、activation peptideに強い血管透過性抑制があることを発見した。本研究では、化学合成されたactivation peptide (F9-AP)が、脳挫傷モデルラットの脳内血管の物質透過性を抑制し、神経学的な予後を著名に改善することを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳挫傷では、受傷後、数週間から数年間かけて二次的な炎症反応が生じ、一次的損傷より二次的損傷の方が大きな影響を及ぼすこともある。こうした、二次的な反応を抑制することで、脳挫傷の予後を改善できることが、炎症に関わるタンパクの遺伝子改変マウスを用いた研究によって示唆されている。F9-APは脳血管の血管透過性を抑制して二次的炎症反応を抑え、脳挫傷の器質的・機能的予後の改善をもたらすと考えられた。脳挫傷だけでなく、脳梗塞等に伴う脳障害において二次的な脳の障害が起きている。本研究によって示されたF9-APの効果は、脳挫傷のみならず、脳梗塞等の難治性脳損傷の薬物治療に期待を抱かせる。

研究成果の概要(英文)：Blood coagulation factor IX is normally circulated throughout the body as a plasma protein, but it participates in the blood coagulation reaction at the site of bleeding. When factor IX is activated in the coagulation reaction, its activation peptide is cleaved, and the function of the activation peptide has been considered to be the regulation of factor IX activation. In our laboratory, we have found that the activation peptide has a strong inhibitory effect on vascular permeability. In the present study, we found that a chemically synthesized activation peptide (F9-AP) suppressed the substance permeability of intracerebral blood vessels in a rat model of cerebral contusion and markedly improved the neurological prognosis.

研究分野：細胞生理学

キーワード：脳挫傷 炎症 血管透過性 血液脳関門 凝固第IX因子 activation peptide

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

TBI の病態や治療を研究し新たな治療法を発見することが社会的に求められている。わが国では年間およそ 27 万人の外傷性脳損傷 (Traumatic brain injury、TBI) 患者が発生し、若者の主要な死亡原因になっている。また多くの患者が後遺症に苦しんでいる。しかし残念ながら、現状では有効性が確認された TBI の治療薬はない。

TBI では、衝撃による一次的な組織破壊が引き金となり、二次的な組織の傷害が数週間続く。その後、重症例では数か月から数年にわたり慢性的に病状が進行する場合がある。動物実験ではマウスの遺伝子改変や薬物治療により TBI の病巣容積が半分以下に減少するため、一次的な物理的損傷よりも二次的な傷害の方が臨床上の意味が大きい可能性がある。従って、二次的な反応による障害の抑制は、TBI の治療にとって大きな意味がある。

二次的な反応では、炎症、浮腫、虚血などが病状悪化の要因として挙げられる。二次的な炎症反応にはミクログリアが関与している 1)。ミクログリアは外傷により活性化し、創部とその周辺に遊走していく。ミクログリアの活性化には二つのタイプがある。M1 は古典的な活性化で、炎症を起こすように働く。貪食能は亢進し、活性酸素 (ROS) や NO の産生は増加する。それに対して、M2 は炎症を制御する活性化である。制御性 T 細胞を誘引し、治療のための血管新生を刺激する。活性化されたミクログリアは、傷や患者の条件によってプラスにもマイナスにも働くと考えられているが、その詳細はよくわかっていない。

TBI で生じる浮腫には二つの機序がある 2)。一つは、受傷から 24 時間続くアストロサイトの障害による浮腫であり、もう一つは blood brain barrier (BBB) の障害による浮腫である。BBB 障害による浮腫は 2~3 日かけて進行し、2 週間程度持続する。BBB の傷害は血管内皮だけでなく血管傍細胞やアストロサイトの異常によっても起こる。浮腫の原因物質として VEGF や NO、IL-1beta、IL-6、が知られているが、それらの物質の TBI における功罪については相反する報告があり、定見がない 3)。BBB の障害は、浮腫を起こすだけでなく、普通なら血管内にしか存在しない、分子量の大きなタンパクの血管外漏出につながる。それらの中には、細胞障害性を持つものもあり、二次的な細胞障害に関与している。

TBI の複雑な病態を理解するために、遺伝子発現プロファイルの解析や遺伝子多型に関する研究が行われてきた 4)。健全なコントロールの脳と TBI の脳での発現遺伝子を比較すると、TBI の二次的な反応では toll-like receptor/NF- κ B の系と JAK/STAT の系が活性化していた。それらの系に関連する遺伝子の中で治療のターゲットになる遺伝子を探すには、TBI の重症度に影響を与える遺伝子多型の情報が役立つ。そのような遺伝子として apolipoprotein E、BCL-2、IL-1beta、IL-6、eNOS などが報告されている。また、単一の遺伝子ではなく、一群の遺伝子の発現を制御する因子として miRNA の解析も行われている。TBI の脳では多くの miRNA 発現量が変化しているが、中でも miR-21 は eNOS の発現に関与しており、予後との関係が注目されている。これらの遺伝子や核酸は TBI の悪化因子であり、抑制による治療効果が期待できる。

申請者の研究室は血液凝固第 IX 因子(FIX)について研究してきた 5),6),7)。その結果、FIX は凝固反応に必須のタンパクというだけでなく、細胞にも作用すると判明した 6)。凝固時に FIX が活性化される際に切り取られる 44 個のアミノ酸からなる activation peptide (F9-AP) には、NO 発生の抑制を介して細胞基質間接着と細胞間接着を強化する作用が見つかった。これらの作用のため、F9-AP は血管透過性を抑制し、敗血症モデルマウスに静脈内投与すると肺水腫の発生が抑えられる 7)。本研究では、FIX を TBI の二次的反応に関与する新たな候補タンパクと位置づけた。

2 . 研究の目的

本研究は、物理的な力による脳損傷に引き続いて起こる二次的な組織障害プロセスの解明と治療法の開発を目的として行われる。TBI で生じる二次性炎症では、血管から遊走する白血球や漏出する血漿タンパクが働いている。F9-AP は血管透過性を抑制することにより、TBI 後の二次的炎症反応を抑制し、神経学的予後に影響を与える可能性がある。本研究では、TBI モデルラットの解析により二次性変化の病態を明らかにし、F9-AP の治療効果について検討する。

3 . 研究の方法

Wister-Kyoto ラットで Controlled Cortical Impact (CCI) による TBI モデルを作製する。治療群では 300 μ g/kg のペプチドを PBS に溶解して、尾静脈より連日投与する。コントロール群では PBS を投与する。Sham 手術群、コントロール群、F9-AP 治療群に対して、神経学的評価、組織学的解析を行い、比較検討する。脳血管の物質透過性を評価するため、脳の湿重量の測定や、エバンスブルーの静注によるアルブミン透過性を評価する。また、血漿タンパクの血管外漏出を評価するために、脳組織内の IgG、フィブリノーゲン、トロンビンの免疫染色を行う。ラットの脳から等間隔に切片を作製し、CCI により生じた陥凹部の容積を算出する。

4 . 研究成果

TBI モデルラットに F9-AP を連日静注し、その効果について検討した。神経学的検査では、F9-AP 治療群はコントロール群と比較して有意に改善した。Beam walking 8)による評価では、術後 3 日目にコントロール群ではゴールまで 1 頭も渡り切れなかったのに対し(0/6 頭)、F9-AP 治療群では全頭が渡り切った (5/5 頭)。この効果は観察を終了する 13 日目まで持続していた (図 1)。

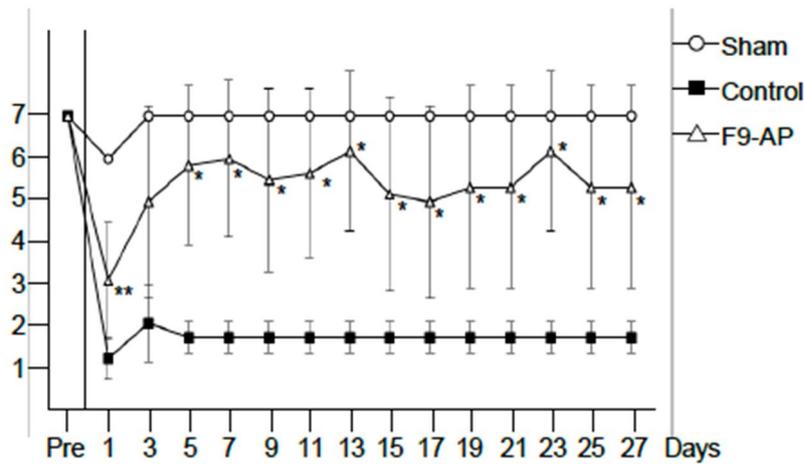


図1 Beam walk test の経過

F9-AP は、受傷 1 日後の脳浮腫の発生を有意に抑制しただけでなく、アルブミン透過性も抑制されていた (図 2)。また、F9-AP 治療群では、脳組織内の IgG、フィブリノーゲン、トロンピンはコントロール群に比して、有意に抑制されていた。

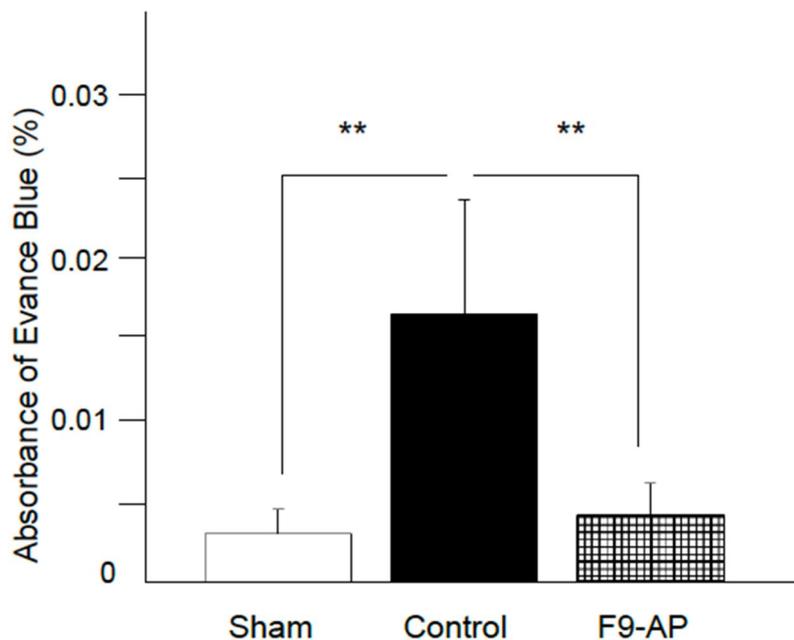


図 2 エバンスブルーで評価したアルブミンの血管外漏出量

F9-AP 治療群の CCI による陥凹部の容積はコントロールより著しく小さく、二次的反応による組織破壊の 82% が抑制された (図 3)。コントロールでは、叩打部の陥凹が、叩打の方向に広がるのではなく、大脳皮質下組織に沿って横方向に広がっていた。TBI 周囲の組織標本による観察では、F9-AP 投与群で神経細胞の数が有位に多く、神経細胞保護作用が確認された。

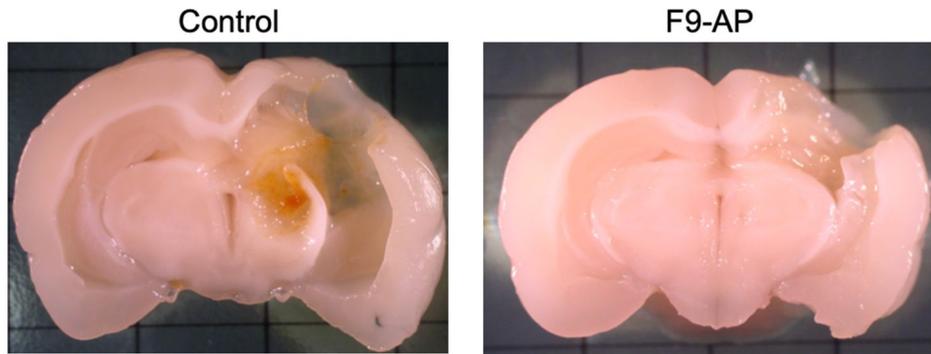


図3 叩打部の陥凹

本研究により、F9-APの投与は、TBIモデルにおいて脳組織の著しい保護効果を示し、形態のみならず、機能においても、予後の改善をもたらした。治療効果は受傷後早期から現れたため、この時にF9-APの投与が血管の物質透過性を抑制し、フィブリノーゲンやトロンビンなどの細胞障害性血漿タンパクの漏出を抑え、神経細胞障害の抑制に寄与していると推察された。

<参考文献>

- 1) Susanne M. Schwarzmaier and Nikolaus Plesnila, *Front Cell Neuroscience*, 2014, 8 1-7.
- 2) Shotaro Michnaga et al, *Int J Mol Sci*. 2015, 16, 9949-9975.
- 3) P. M Abdul-Muneer et al. *Mol Neurobiol*, 2015, 51, 966-979.
- 4) Cesar Reis et al. *Int J Mol Sci*. 2015, 16, 11903-11965.
- 5) Tomomi Ishikawa et al. *Biosci Rep*. 2016, 36, e00340.
- 6) Hisataka Kitano et al. *Cell Biol Int*, 2015, 1162-1172.
- 7) Atsushi Mamiya et al. *Translational Res*, impress.
- 8) Feeney D. M. et al. *Science*. 1982, 217, 855-7.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hisataka Kitano, Yoh Masaoka, Atsushi Mamiya, Yusuke Fujiwara, Toshio Miki, Chiaki Hidai.	4. 巻 35
2. 論文標題 Combination Cancer Therapy of a Del1 Fragment and Cisplatin Enhanced Therapeutic Efficiency In Vivo.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 779-791
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/invivo.12318	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yuusuke Fujiwara, Hisataka Kitano, Atsushi Mamiya, Chiaki Hidai, Shinichiro Kokubun
2. 発表標題 Coagulation factor IX peptide regulates endothelial barrier function and improves prognosis in traumatic brain injury (TBI) model
3. 学会等名 American Society of Cell Biology（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤原祐輔、真宮淳、北野尚孝、日台智明
2. 発表標題 A coagulation factor IX peptide regulates endothelial barrier function in brain
3. 学会等名 口腔科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤原祐輔、真宮淳、北野尚孝、日台智明
2. 発表標題 ラット頭部外傷モデルにおける血液凝固第IX因子由来ペプチドの治療効果
3. 学会等名 日本生理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤原祐輔、真宮淳、北野尚孝、日台智明
2. 発表標題 ラット頭部外傷モデルにおける血液凝固第IX因子由来ペプチドの治療効果
3. 学会等名 日本口腔科学会
4. 発表年 2018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
研究協力者	渡辺 麻友 (WATANABE Mayu)	日本大学・NUBIC (32665)	
研究協力者	北野 尚孝 (KITANO Hisataka) (50424726)	日本大学・医学部・准教授 (32665)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------