

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K16582

研究課題名(和文) オステオポンチンとロイシンリッチ 2グリコプロテインを標的とした脳梗塞治療の開発

研究課題名(英文) Development of therapy about ischemic stroke with osteopontin and leucine-rich alpha2-glycoprotein

研究代表者

尾崎 友彦(Ozaki, Tomohiko)

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教員

研究者番号：00723123

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：マウスを用いたスレッドモデルにより10分間の一過性中大脳動脈(preconditioning)の閉塞の48時間後に中大脳動脈領域でのLeucinerichalpha 2 glycoprotein 1(LRG1)の発現の亢進を免疫染色で認めた。Vivo研究ではiPS細胞から脳オルガノイド作成を行い42日目、70日目のLRG1のRNA発現を調べ、iPS細胞の発現量を1とした時にLRG1は42日目には約4倍、70日目には約3倍の発現量を認めた。その他血管新生に影響を及ぼすと考えられるHIF1 α に関しては70日目で約1.6倍、VEGF-Aに関して70日目で約4倍の発現となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Vivo modelにおいて一過性の低灌流を起こすことにより血管新生因子であるleucine-rich alpha2-glycoprotein (LRG)がその低灌流領域で発現すること、またvivo modelにおいてiPS細胞がその脳オルガノイドの発生過程でiPS細胞の発現量を1とした時にLRG1は42日目には約4倍、70日目には約3倍の発現量を認めた。このようにLRGが虚血や発生過程で発現することが確認でき今後脳梗塞治療研究につながると考えられる。社会的意義に関しても今後さらに研究が進めばLRGが関わる血管新生により脳梗塞治療に繋がる土台の結果が得られたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We performed 10 minutes transient occlusion of middle cerebral artery (MCA) in mouse and showed upregulation of Leucinerichalpha 2 glycoprotein 1(LRG1) in the MCA area using immunostaining after 48 hours from transient occlusion. This results showed possibility that angiogenesis occurred after transient ischemia in brain. In vitro, we made brain organoids using iPS cell. LRG1 RNA expressed four times and three times compared with iPS cell in Day42 and Day 70 respectively. In addition, we investigated the molecules related angiogenesis. HIF1 α RNA expressed 1.6-fold in Day 70 and VEGF-A expressed four times in Day 70 compared with iPS cell.

研究分野：脳虚血

キーワード：血管新生 ロイシンリッチ 2グリコプロテイン

1. 研究開始当初の背景

脳卒中(脳梗塞、脳出血、くも膜下出血)による死亡者は年間約 13 万人で、寝たきりや認知症の原因の第 1 位となっており、高齢化が進む中、重大な社会的問題となっている。近年、血栓溶解剤(t-PA)をはじめ再灌流療法の進歩により急性期脳梗塞に対して一筋の光明が見いだされたが、再灌流療法が可能な時間的制約により、その恩恵に預かれる症例は数%でしかなく有効な脳保護薬の開発が急務である。

さて、神経細胞は虚血に脆弱であるが、その様な環境下では、様々な遺伝子発現が誘導され、虚血ストレスに対して応答していることが報告されている。このような生体作用を有効に活用し、神経細胞を虚血に対して抵抗できる様に誘導することは急性期脳梗塞治療の再灌流療法が可能な時間的制約の緩和など、新規脳梗塞治療戦略の開拓において有望である。申請者は、血管内皮細胞に存在する P2X4 受容体に着目し、平成 27,28 年度科学研究費若手(B)「脳虚血時の P2X4 受容体を介した血管内皮による虚血耐性獲得メカニズムの解析」の助成を受け、一過性脳虚血を P2X4 受容体が感知することで中大脳動脈閉塞(MCAO)後 48 時間後には神経保護分子であるオステオポンチン(OPN)の発現が上昇し、神経細胞が虚血耐性能を獲得するメカニズムを報告した。さらに、このような実験動物から得られた知見のヒトでの再現性も確認している。これは頸部腫瘍や大型の脳動脈瘤など、手術時に頸動脈の遮断の可能性のある症例の術前検査として、頸動脈を一時的にバルーン付きカテーテルで遮断し、脳血流を一過性に低下させ、神経症状や反対側からの血流を確認するバルーン閉塞試験(BOT)を利用して検証している。BOT 前後に末梢血を採取し一時閉塞前と一時閉塞 48 時間後の末梢血で OPN の血中濃度を確認すると、一時閉塞の 48 時間後に OPN の上昇傾向を認めており、一過性脳虚血による OPN の上昇は、実験動物のみならず、ヒトにも見られる普遍的な現象であることが確認された(上図右)。さらに前述のヒト血液サンプルのタンパク変動をプロテオミクス解析で網羅的に調べ、血管新生作用の報告がある leucine-rich alpha2-glycoprotein(LRG)の発現が BOT 後に上昇することが確認できた。血管新生による側副血行路の発達は脳血流を維持し、脳梗塞に対して脳保護に働く。

2. 研究の目的

本研究ではこれらの結果を発展させ、OPN の臨床応用にむけての最適な投与方法の決定、LRG を介した血管新生メカニズムの解明を目指し、2 つの防御機構から脳梗塞に対する新たな治療法の確立を目標とする。

3. 研究の方法

われわれは leucine-rich-alpha2-glycoprotein(LRG)による血管新生を生じさせる刺激(preconditioning)として一過性脳虚血を作成することを選択した。マウスを用いたスレッドモデルにより一過性に中大脳動脈閉塞、再灌流させ 10 分間の一過性中大脳動脈(preconditioning)の閉塞の 48 時間後に、中大脳動脈灌流領域での LRG1 の発現を免疫染色を用いて調べた。Vitro 研究では iPS 細胞から脳オルガノイド作成を行う研究を行い脳オルガノイド 2 日目、42 日目、70 日目の Leucine-rich-alpha 2 glycoprotein(LRG1)の RNA 発現を調べた。

4. 研究成果

本研究は、血管新生作用の報告がある leucine-rich alpha2-glycoprotein(LRG)が脳の血管においても血管新生作用があるかを検証し、また神経栄養因子の報告をもつオステオポンチンの効果も加え、その血管新生作用と神経栄養因子が脳梗塞において脳保護にどのように寄与するかを解明を目指したものである。

われわれは LRG による血管新生を生じさせる刺激(preconditioning)として一過性脳虚血を作成することを選択した。一過性脳虚血モデルの確立を目指した。具体的には、マウスを用いたスレッドモデルにより一過性に中大脳動脈閉塞、再灌流させるモデルで 10 分間の一過性中大脳動脈(preconditioning)の閉塞の 48 時間後に 60 分の中大脳動脈閉塞を作成することとした。上記に並行して、preconditioning を行なった 48 時間後に、一過性に閉塞させた中大脳動脈の灌流領域での LRG1 の発現を免疫染色を用いて調べた。その結果、前記灌流領域で LRG1 の発現の亢進を認めた。その後 Vitro 研究もおこない、iPS 細胞から脳オルガノイド作成を行う研究を行っており、その実験系を用いて脳オルガノイドの 42 日目ならびに 70 日目の Leucine-rich-alpha2

glycoprotein(LRG1)の RNA 発現を調べた。結果として iPS 細胞の発現量を 1 とした時に LRG1 は 42 日目には約 4 倍、70 日目には約 3 倍の発現量を認めた。そのほか、同時に FoxG1 : 前脳のマーカー、PAX6 : radial glia のマーカー、TBR1 : layer のマーカー、CTIP2 : layer のマーカー、SATB2 : upper layer のマーカー、VGluT1 : 興奮性ニューロンのマーカー、NKX2-1 : 腹側前脳のマーカー (interneuron を産生)、HIF1-、VEGF-A の RNA 発現量も調べた。HIF1 に関しては 2 日目と 42 日目では 1 倍を下回ったが 70 日目で約 1.6 倍、VEGF-A についても 2 日目と 42 日目では 1 倍を下回ったが 70 日目で約 4 倍の発現となった。そのほか、70 日目で FoxG1 は約 432 倍、PAX6 は約 186 倍、TBR1 は約 1195 倍、CTIP2 は約 14 倍、SATB2 は約 27 倍、VGluT1 は約 148 倍、NKX2-1 は約 6 倍 42 日目と 70 日目で発現上昇を認めた。

学術的意義に関して、Vivo model において一過性の低灌流を起こすことにより血管新生因子である leucine-rich alpha2-glycoprotein(LRG)がその低灌流領域で発現すること、また vitro model において iPS 細胞がその脳オルガノイドの発生過程で iPS 細胞の発現量を 1 とした時に LRG1 は 42 日目には約 4 倍、70 日目には約 3 倍の発現量を認めた。このように LRG が虚血や発生過程で発現することが確認でき今後脳梗塞治療研究につながると考えられる。社会的意義についても今後さらに研究が進めば LRG が関わる血管新生により脳梗塞治療に繋がる土台の結果が得られたと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sawada Haruna, Ozaki Tomohiko, Nakajima Shin, Kidani Tomoki, Kanemura Yonehiro, Nishimoto Keisuke, Yamazaki Hiroki, Taki Kowashi, Fujinaka Toshiyuki	4. 巻 50
2. 論文標題 Tension pneumocephalus following cranioplasty with a titanium plate: a case report	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of International Medical Research	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/03000605221076032	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 Ozaki Tomohiko, Fujinaka Toshiyuki, Kidani Tomoki, Nishimoto Keisuke, Yamazaki Hiroki, Sawada Haruna, Taki Kowashi, Kanemura Yonehiro, Nakajima Shin	4. 巻 Publish Ahead of Print
2. 論文標題 Coil Embolization of Unruptured Cerebral Aneurysms Using Stents in Small Arteries Less Than 2 mm in Diameter	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 538-546
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1227/NEU.0000000000001876	査読の有無 有
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 Nishizawa Naoki, Ozaki Tomohiko, Kidani Tomoki, Nakajima Shin, Kanemura Yonehiro, Nishimoto Keisuke, Yamazaki Hiroki, Mori Kiyoshi, Fujinaka Toshiyuki	4. 巻 13
2. 論文標題 Stent infection and pseudoaneurysm formation after carotid artery stent treated by excision and in situ reconstruction with polytetrafluoroethylene graft: A case report	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Surgical Neurology International	6. 最初と最後の頁 24 ~ 24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.25259/SNI_1126_2021	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 Ozaki Tomohiko, Nakamura Hajime, Kishima Haruhiko	4. 巻 126
2. 論文標題 Therapeutic strategy against ischemic stroke with the concept of neurovascular unit	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 246 ~ 251
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuint.2019.03.022	査読の有無 有
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 Ozaki Tomohiko, Muramatsu Rieko, Nakamura Hajime, Kinoshita Manabu, Kishima Haruhiko, Yamashita Toshihide	4. 巻 72
2. 論文標題 Proteomic analysis of protein changes in plasma by balloon test occlusion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 397 ~ 401
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jocn.2019.12.005	査読の有無 有
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 Yamazaki Hiroki, Fujinaka Toshiyuki, Ozaki Tomohiko, Kidani Tomoki, Nishimoto Keisuke, Taki Kowashi, Nishizawa Naoki, Murakami Keijiro, Kanemura Yonehiro, Nakajima Shin	4. 巻 13
2. 論文標題 Staged treatment for ruptured wide-neck intracranial aneurysm with intentional partial coiling in the acute phase followed by definitive treatment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Surgical Neurology International	6. 最初と最後の頁 322 ~ 322
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.25259/SNI_529_2022	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 Yamazaki Hiroki, Ozaki Tomohiko, Kidani Tomoki, Fujimi Yosuke, Nonaka Masahiro, Umegaki Masao, Yokota Chisato, Fujinaka Toshiyuki	4. 巻 5
2. 論文標題 Coexisting filum terminale arteriovenous fistula and filum terminale lipoma treated with single-stage surgery: illustrative case	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Neurosurgery: Case Lessons	6. 最初と最後の頁 不明
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3171/CASE22474	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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------