

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17018

研究課題名（和文）1インテグリン-pMLC内皮透過性制御シグナルによる新規神経疾患治療法の確立

研究課題名（英文）beta1 integrin-pMLC endothelial permeability regulatory signaling as a novel therapeutic approach for neurological diseases

研究代表者

伊澤 良兼（IZAWA, Yoshikane）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：90468471

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：RITCもしくはTRITCの蛍光強度の増強・減弱の経時変化を半定量化し解析した。脳虚血モデル、およびトロンビン・1インテグリン阻害抗体の脳皮質下注入モデルのいずれにおいても、コントロール群と比較して、有意な血管透過性亢進を認めなかった。この理由として、マウス個体ごとの梗塞巣サイズの変動や、トロンビン・1インテグリン阻害抗体・生理食塩水のstereotaxic injection後にてんかん発作様の症状を認めることがあり、マウス毎に血管外漏出レベルのばらつきが大きくなったことに起因すると考えられた。さらなる評価のため、サンプル数の増加や、実験手法の改善等を検討中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳梗塞、脳出血、脳血管性認知症、そのほか様々な神経疾患では、脳血管の構造の脆弱化をきっかけとして、脳神経組織の機能障害が進むことが知られている。しかし、脳血管の脆弱化を示す一つの指標である「血管透過性亢進」のメカニズムは十分に解明されていない。当研究によりマウスの脳の血管透過性の変化を、生存した状態で連続的に観察する手法が確立された。今後、神経疾患の治療法開発の動物モデルとして応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：The temporal changes in fluorescence intensity of RITC or TRITC were analyzed semi-quantitatively. In both the cerebral ischemia model and the subcortical injection model using thrombin/1 integrin inhibitory antibody, there was no significant increase in vascular permeability compared to the control group. This may be due to the variation in the size of the infarct foci among individual mice, and the occurrence of epileptic seizure-like symptoms after stereotaxic injection of thrombin/1 integrin inhibitory antibody or saline, resulting in the large variation in the level of extravascular leakage among mice. For future evaluation, we are considering increasing the number of samples and modifying the experimental method.

研究分野：脳血管障害

キーワード：血管透過性 血液脳関門 タイトジャンクション 1インテグリン neurovascular unit 脳血管障害

1. 研究開始当初の背景

令和元年版高齢者白書、平成 28 年度国民生活基礎調査にあるように、脳血管障害、及び認知症は、要介護状態となる原因疾患の第一位、第二位を占め、大きな問題となっている。血栓溶解療法や血管内治療など超急性期脳梗塞治療の進歩が目覚ましい一方で、脳梗塞の発症予防は、いまだ抗血栓療法と血圧管理に依存し、新規治療は久しく開発されていない。抗血栓療法は脳出血発症リスクと表裏一体であるなど、脳血管障害の治療で解決すべき課題は多く、脳血管性認知症に至っては治療法が存在しない。安全性と有効性を両立した脳血管障害、さらには脳血管性認知症に対する治療の確立は喫緊の課題である。

この課題の解決には「なぜ脳梗塞・脳出血、脳血管性認知症は生じるのか」という根本的な問題を解明しなくてはならない。すなわち、内皮に血栓が生じやすくなる機序、血管が破綻する機序、神経組織が機能しなくなる原因を究明する必要がある。

脳血管障害および脳血管性認知症の高リスク患者では、病理学的に血管内皮細胞間の間隙が拡大し、血管内皮透過性が亢進することが 1970 年頃から知られていた。頭部 MRI による評価でも、同様の高リスク患者群で脳血管透過性が亢進していることが報告されている(J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2010; 81: 192-7.)。このように脳梗塞、脳出血、脳血管性認知症の発症・病状悪化に、脳血管透過性の亢進の関与が示唆されているが「なぜ、そして、どのように脳血管透過性が亢進するのか、そして脳血管透過性は人為的にコントロール可能なのか」は明らかではない。これが当研究課題の核心となる学術的疑問である。当研究は、前述の社会的な課題に対する解決策を見出すべく、血管透過性調節メカニズムの解明、およびそれに基づく神経疾患の新たな治療法を模索することを背景としている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、血管透過性亢進メカニズム・病態の解明に取り組み、最終的に血管透過性制御による脳血管障害、あるいは神経疾患に対する新たな治療法を確立することである。

脳血管透過性の亢進機序として、第 1 に「トロンピンなどのプロテアーゼによる protease activated receptor(PAR)受容体活性化」、第 2 に「MMPs によるタイトジャンクションプロテインの分解」が主たる経路とこれまで考えられてきた。我々は「基底膜マトリックス-1 インテグリン結合の解離に起因する Rho kinase/Myosin light chain (MLC) kinase 活性化、リン酸化 MLC 増加を介した細胞内アクチン制御による内皮透過性の亢進」という第 3 の新たな血管内皮透過性亢進機序(図 1)を報告した(Izawa Y, et al. J Cereb Blood Flow Metab. 2018; 38: 641-658.)。この第 3 の経路による血管透過性亢進メカニズムの解明は、脳血管障害のみならず、血管透過性亢進が関与する疾患への新たな治療法を考える上で重要な示唆を与える。例えば、脳転移の多い乳癌が分泌する miRNA がこの第 3 の経路に作用して血管透過性を亢進させ転移を促進させることが最近報告されており、同シグナルの抑制による癌転移抑制手法への応用が考えうる。

このように内皮透過性調節の新機序が明らかになるなか、過去の大規模臨床試験において示された cilostazol、ticagrelor、argatroban など各抗血栓薬の出血リスクが、in vitro での血管内皮透過性亢進作用、リン酸化 MLC 産生促進作用と正の相関を示すことが示唆されている。これらの経緯から、1 インテグリン-リン酸化 MLC-細胞内アクチン骨格-タイトジャンクションに至る一連のシグナル連鎖を制御することにより、血管透過性亢進を抑制し、正常な血液脳関門の構造を維持することが、脳出血など脳血管障害の発症予防に有効ではないかとの着想に至った。さらには脳血管性認知症、多発性硬化症、転移性脳腫瘍など、血管透過性亢進が関与する幅広い神経疾患への治療法開発にも応用することが可能ではないかと想定している。

主に脳血管障害に関する国内外の研究において、血液脳関門に保護的に作用する薬剤の報告が散見されるが、脳血管障害急性期治療を念頭においた研究が多い。脳血管障害の発症「前」、あるいは発症「直後」における、プロテアーゼ活性化・1 インテグリン減少から、リン酸化 MLC 増加・アクチン骨格変化に至る一連の過程に着目し、血管透過性調節による脳血管障害予防治療・急性期治療、そして脳血管性認知症治療の確立を目標とする研究はほとんどない。当研究は血管内皮透過性亢進が病態に関与する様々な疾患の研究に重要な知見を与えるものと考えられる。

3. 研究の方法

本研究では、マウスを用いた in vivo の実験、あるいは、primary culture を用いた実験を予定した。実験計画申請にあたり、慶應義塾動物実験委員会の審査を受け、動物愛護の観点、環境保全の観点、ならびに動物実験等を行う者の安全確保の観点から策定された同実験委員会ガイドラインに則った動物実験プロトコルであることの確認を受け、慶應義塾動物実験計画・承認番号 08097-(19)、09058-(11)、16012-(3)として承認を得たうえで行った。遺伝子改変マウスを用いた実験プロトコルについては、遺伝子組換え実験安全委員会への申請を行い、これも慶應義塾大学医学部遺伝子組換え実験・承認番号 17-037-19 として承認を受けている。

具体的な研究手法としては、血管内皮細胞が蛍光標識された Tie2-GFP マウスを用い、田村変

法による中大脳動脈虚血再灌流モデルを使用する。このほか、血管透過性亢進誘発のために、in vitro 研究で解析済のトロンピンや抗 1 インテグリン抗体 (Ha2/5 抗体) の皮質下への stereotaxic injection を用いた。

血管透過性が亢進した後、左右頭蓋骨に観察窓 (頭窓) を作成し、中大脳動脈領域、あるいは注射部位近傍の皮質を二光子顕微鏡 (OLYMPUS FV1200MPE) を用いて、生存麻酔下で直接観察した。頭窓法は富田 (慶應義塾大学医学部神経内科非常勤講師) らが報告した手法に従い (J Cereb Blood Flow Metab. 2005; 25: 858-67.), Bregma から後方 2mm、外方 3mm を中心に、左右両側に観察窓 (頭窓) を作成し、中大脳動脈領域を生存麻酔下で直接観察した。二光子顕微鏡により脳表から 500 μ m の深部まで連続して三次元観察可能であり、動脈・細動脈・毛細血管レベルでの変化を生体内で連続的に評価した。血管透過性亢進の評価は 4~20kDa rhodamine 結合 dextran の血管外 (神経実質) への拡散を蛍光強度から定量化して行う予定とした。

4. 研究成果

Dextran の分子量は、in vivo 先行研究の結果や、in vitro 血管内皮細胞透過性に関する実験結果などから、Tie2-GFP マウスを用いる場合は、10kDa-RITC が最も適切であるとの結論に至ったが、COVID-19 の流行に伴い、同蛍光物質の入手が世界的に困難な状況となり、実験の継続が困難となった。そのため、代替策として 20kDa-TRITC を使用したが、血管壁の GFP 蛍光強度を基準として、脳実質の蛍光強度変化を測定・補正することが困難となった。

脳実質の透過性については、当初は一過性虚血誘導後、もしくはトロンピンや抗 1 インテグリン抗体 (Ha2/5 抗体) の皮質下への stereotaxic injection 投与直後から 4 時間程度までの測定を行ったが、control 群と比較して、明らかな血管透過性亢進の様子を確認することが出来なかった。そのため、過去の in vitro での先行研究から、トロンピンや抗 1 インテグリン抗体 (Ha2/5 抗体) の暴露による影響がより明確になると推定された 24 時間後に、蛍光物質投与後 3 時間まで、二光子顕微鏡で連続撮影した。

結果、RITC もしくは TRITC の蛍光強度が脳実質において変化する様子を連続的に捉えることに成功し、イメージ解析ソフトを用いて蛍光強度の増強・減弱の経時変化を、半定量化し解析した。しかしながら、脳虚血モデル、およびトロンピン・1 インテグリン阻害抗体の脳皮質下注入モデルのいずれにおいても、コントロール群と比較して、有意な血管透過性亢進を認めなかった。この理由として、マウス個体ごとの梗塞巣サイズの変動や、トロンピン・1 インテグリン阻害抗体・生理食塩水の stereotaxic injection 後にてんかん発作様の症状を認めることがあり、マウス毎に血管外漏出レベルのばらつきが大きくなったことに起因すると考えられた。一方で、トロンピン投与群においては、血管透過性の上昇幅が大きい傾向も観察されており、さらなる評価のため、サンプル数の増加や、実験手法の改善等を検討中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tang Chunhua, Unekawa Miyuki, Shibata Mamoru, Tomita Yutaka, Izawa Yoshikane, Sugimoto Hiroki, Ikeda Keiko, Kawakami Kiyoshi, Suzuki Norihiro, Nakahara Jin	4. 巻 40
2. 論文標題 Characteristics of cortical spreading depression and c-Fos expression in transgenic mice having a mutation associated with familial hemiplegic migraine 2	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cephalalgia	6. 最初と最後の頁 1177 ~ 1190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0333102420929028	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 Oyama Munenori, Iizuka Takahiro, Nakahara Jin, Izawa Yoshikane	4. 巻 20
2. 論文標題 Neuroimaging pattern and pathophysiology of cerebellar stroke-like lesions in MELAS with m.3243A>G mutation: a case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Neurology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12883-020-01748-7	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 -

〔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 富田裕, 畝川美悠紀, 伊澤良兼, 正本和人, 菅野巖, 中原仁
2. 発表標題 Analysis of red blood cell velocity in intraparenchymal capillaries and arterial diameter in mice.
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomita Y, Unekawa M, Izawa Y, Masamoto K, Kanno I, Nakahara J
2. 発表標題 Imaging of Cerebral Microcirculation and Expectations for Biomedical Engineering
3. 学会等名 第46回日本微小循環学会総会
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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