

平成 22 年 5 月 15 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008 ～ 2009
 課題番号：20791076
 研究課題名 (和文) 虚血性脳障害の分子機構における好中球エラスターゼの役割に関する検討
 研究課題名 (英文) The role of neutrophil elastase in the development of neuronal damage following transient forebrain ischemia.
 研究代表者
 平田 孝夫 (HIRATA TAKAO)
 山口大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号：40420533

研究成果の概要(和文):好中球エラスターゼの選択的阻害薬である ONO-5046 による海馬 CA1 の虚血性神経細胞死軽減は、カスパーゼ-3/7 の抑制と、血漿エラスターゼ活性およびその脳実質内移行の抑制を伴うことが明らかとなった。虚血で活性化された好中球エラスターゼが、ラットの前脳虚血による海馬 CA1 選択的神経細胞死の進展に関与し、特異的阻害薬 ONO-5046 がエラスターゼの脳実質細胞外領域への分布を抑制することで虚血性神経細胞傷害を軽減することが示唆された。

研究成果の概要 (英文): The present study suggests that neutrophil elastase possibly, but may not exclusively, derived from activated leukocytes contributes to the development of selective neuronal death in hippocampal CA1 after 8 min-forebrain ischemia in rats and that a specific neutrophil elastase inhibitor, ONO-5046, ameliorates neuronal damage via inhibition of neutrophil elastase distribution in the extracellular matrix after ischemia. Further study may be needed to determine the therapeutic time window for ONO-5046 and the effects of higher or repeated doses as well as the detailed mechanisms for interaction between neutrophil elastase and activation of caspase.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：蘇生学

1. 研究開始当初の背景

一過性脳虚血により海馬 CA1 のような虚血

に脆弱な部位で遅発性神経細胞死が引き起こされることが知られている。その機序とし

て、グルタミン酸の過剰放出、細胞内カルシウムの蓄積、活性酸素種の産生、脂質膜の変性など複合的要因が唱えられてきた。加えて、遅発性神経細胞死にインターロイキン (IL) -1 β , IL-6, 腫瘍壊死因子 (TNF) - α などの炎症性サイトカインの関与が示唆されている。炎症やさまざまな生体侵襲により活性化された好中球から放出される好中球エラスターゼは、さまざまな細胞外の間質基質や細胞表面の蛋白質の分解に関与する。最近の動物実験モデルで、虚血や外傷による中枢神経傷害に対し、好中球エラスターゼ阻害薬 ONO-5046, (Sodium *N*{2-[4-(2, 2-dimethylpropionyloxy) phenylsulfonamino] benzoyl} が保護的に作用することが報告され、好中球エラスターゼが中枢神経傷害の進展に重要な役割を果たす可能性が示唆されている。これらのことは、好中球エラスターゼの虚血性神経傷害における役割と阻害薬による修飾の解明により、虚血性脳障害に対する重要な治療戦略を提供できる可能性を示すものである。われわれは脳虚血後に血液中で活性化された好中球エラスターゼが脳実質内に分布し、神経細胞傷害を増悪させるという仮説を立て、一過性脳虚血後の海馬 CA1 の選択的神経細胞死の進展における炎症性反応の関わりを検討した。特に、好中球エラスターゼの活性化とその局在性が脳実質内で生じるかどうか、また、好中球エラスターゼ活性を薬理的に抑制することが神経細胞死の軽減につながるかどうかについて検討した。一過性脳虚血後の海馬 CA1 における選択的な神経細胞死は、全てではないが、アポトーシスとして特徴づけられるため、アポトーシスシグナルに関わるとされているカスパーゼ 3 活性の経時的な変化を測定した。

2. 研究の目的

好中球エラスターゼ阻害薬, ONO-5046 を用い、ラット一過性前脳虚血後の海馬 CA1 の神経細胞死が軽減されるかどうかを明らかにすることを目的とした。次に、虚血再灌流後血中エラスターゼが活性化するかどうか、また脳実質で好中球エラスターゼがどのように分布するかを明らかにし、さらに、好中球エラスターゼ活性抑制による細胞死の軽減と脳組織のカスパーゼ 3 の活性変化との関連を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

薬 剤

Sodium *N*{2-[4-(2, 2-dimethylpropionyloxy) phenylsulfonamino] benzoyl} aminoacetate tetrahydrate (ONO-5046) は小野薬品工業株式会社より提供された。ラットに ^{14}C で標識された ONO-5046 (^{14}C -ONO-5046) 10 mg/kg の単回静注後の血中放射能濃度から推定される血中半減期 [$t_{1/2}$ (2-60 分), $t_{1/2}$ (240-480 分)] はそれぞれ 15.6 ± 1.8 , 164 ± 51 分である。

動物および実験デザイン

研究のプロトコールは山口大学医学部動物実験倫理委員会の承認を得た。すべての実験で雄性 Wistar 系ラット (8~9 週齢, 体重 280~330g) を用い、8 分間の前脳虚血 (両側総頸動脈 8 分遮断+ 脱血による低血圧) を行なった。虚血再灌流直後に投与した好中球エラスターゼ阻害薬 ONO-5046 による海馬 CA1 領域における神経保護効果を評価した後、神経保護の機序を検討するため、血漿エラスターゼ活性、脳実質におけるエラスターゼ局在、およびカスパーゼ活性の経時変化を測定した。

前脳虚血

12 時間の絶食の後、イソフルラン 3% で麻酔し、気管挿管後イソフルラン (2%) および

亜酸化窒素 (70%) で麻酔を維持し、人工呼吸を行った (吸入酸素濃度 30%)。連続的な血圧モニターと動脈血液ガス分析のための採血用にポリエチレンのカテーテルをラット尾動脈に留置した。頭蓋骨近傍の温度を測定し、実験中は約 37°C に維持した。両側頸動脈を、後に一時的に遮断するため、注意深く剥離・露出した。ついで、脱血性低血圧や薬剤投与用に右外頸静脈からカテーテルの先端が右心房に位置するように留置した。虚血開始前に PaO₂ 90-140 mmHg, PaCO₂ 35-45 mmHg, pH 7.35-7.45, 血糖値 90-140 mg/dl に維持されていることを確認した。前脳虚血モデルは、Smith らの方法をわずかに修正して作成した。まずフェントラミン (0.01 mg) 静注により血圧を低下させた後、血管クリップで両側の頸動脈を遮断した。外頸静脈を介して右心房に留置したカテーテルから、血液を脱血あるいは輸血しながら平均動脈圧 (MABP) を 45~50mmHg に維持した。8 分間の虚血後血管クリップをはずし、脱血した血液を返血し、血液の色と十分な拍動で頸動脈の良好な再灌流を確認した。これらの虚血・再灌流操作が終了した後、カテーテルを抜去し創部を閉じ、麻酔を終了した。その後自発呼吸が再開して気管チューブを抜去し、温度管理が施された室内で自由にさせた。本研究で用いた前脳虚血モデルは、経過観察中の死亡はなく、海馬 CA1 領域の神経細胞に選択的な細胞死が引き起されるモデルである。

病理組織学的評価

36匹のラットを無作為に3つのグループ (コントロール群, ONO-5046 5mg/kg 群, ONO-5046 10mg/kg 群, 各群 n=12) に分けた。治療群では 5mg/kg あるいは 10mg/kg の ONO-5046 を 1ml の生理食塩水で溶解し、虚血再灌流直後に静注した。コントロール群で

は 1ml の生理食塩水のみとした。当初, 3つの投与量 (5, 10, 30mg/kg) で神経保護効果の検討を試みた。しかし, 30mg/kg は 1ml の生理食塩水で十分に溶解できなかったため, 治療群を 2 群のみとした。8 分虚血後再灌流 7 日後に 4% イソフルランで麻酔し, 経心臓的に, ヘパリン (4 単位/l) を添加した生理食塩水, つづいてパラホルムアルデヒドで脳を灌流固定した。次いでブレグマから 3.8 mm 尾側で, 背側海馬を含む冠状断切片組織標本 (6 μ m) を作製し, ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。光学顕微鏡を用い左右の海馬 CA1 における 1mm あたりの生存神経細胞を数え, その平均を算出した。生存神経細胞は, 核の萎縮やエオジン好染のクロマチン凝縮のないものとした。虚血しない同週齢のラット 8 匹を同様に灌流固定し, 海馬 CA1 における 1mm あたりの神経細胞を基準とし, 各実験群における海馬 CA1 生存神経細胞数/同週齢ラット神経細胞数比 (%) を算出した。

血中の好中球エラスターゼ活性の経時的変化

50 匹のラットを用いコントロール群と ONO-5046 10mg/kg 群における虚血後の血漿好中球エラスターゼ活性の経時的変化 (再灌流 15, 30, 60 分, 1 および 4 時間, 各測定ポイント n=5) を検討した。神経保護効果の検討で ONO-5046 5mg/kg 群より 10mg/kg 群の方でより強い保護効果を認めただので, ONO-5046 10mg/kg を選択した。右房に留置したカテーテルより 1ml 採血した (解析に比較的多くの血液が必要のため, 1 個体につき 1 サンプルとした) 後, EDTA を添加したスピッツで遠心分離 (3000x g, 3 分) し血漿を凍結保存した。好中球エラスターゼ活性の測定を三菱化学メディエンスの中央研究室で行なった。好中球エラスターゼに特

異性の高い合成基質 N-methoxysuccinyl-Ara-Ara-Pro-Val p-nitroanilide を用いた。血漿サンプルを 0.5M 塩化ナトリウムと 1mM の基質を含む 0.1M トリス塩酸バッファー (pH 8.0) で 37°C, 24 時間インキュベーションさせた後, p-ニトロアニリンの 405nm の吸光度を測定し, 基準値で補正した。

脳内における好中球エラスターゼに対する免疫組織化学染色

コントロール群と ONO-5046 10mg/kg の 2 群において, 虚血再灌流 4 時間および 8 時間後の好中球エラスターゼの局在を検討した (各群 n=6)。冷却したトリス塩酸バッファーに続いて冷却した 4%パラホルムアルデヒドで経心臓的に脳を灌流固定した。脳を取り出した後, 一晚, 固定液に漬けた。30%サッカロースを含んだリン酸バッファーに凍結保護剤を混合し, 液体窒素で冷却したヘキサンで組織を凍結させた。クライオスタットを用い, 10 μ m の冠状断切片を作成した。内因性ペルオキシダーゼに対し 0.3%過酸化水素を混合したメタノールでブロックした後, 非特異的抗原に対し 3%家兎血清を混合したトリス塩酸バッファーでブロックした。その後, エラスターゼ 1 次抗体 (100 倍希釈, SantaCruz 社製) を用い 4°C の庫内で一晚インキュベーションした。ビオチン-ストレプトアビジン酵素抗体法で supersensitive Multilink-HRP/DAB キット (BioGenex 社製) を用い 1 次抗体の検出を行なった後, ヘマトキシリンで対染した。染色行程は自動染色機 Optimax plus (BioGenex 社製) を使用した。

脳内のカスパーゼ活性の経時的変化

血漿中の好中球エラスターゼ活性と好中球エラスターゼの脳実質内分布を抑制することが神経細胞死にどのように関わるのか検

討するために, コントロール群, ONO-5046 10mg/kg 群で海馬 CA1 における虚血 4 時間および 8 時間後のカスパーゼ (カスパーゼ 3/7) 活性を生化学的に測定した (各時間 n=6)。海馬 CA1 の組織採取は以前にわれわれが報告した方法¹⁴⁾を用いた。採取した組織サンプルは解析を行なうまで -80°C で保存した。カスパーゼ-3/7 活性を Caspase GloTM 3/7 (Promega 社製) のキットを用い, 製品使用プロトコールを参考に発光計測法で測定した¹⁶⁾。すなわち, 凍結させた組織をタングステン炭化物ビーズと Mixer Mill MM300 (Rescht 社製) で破碎し, 低浸透圧性の抽出緩衝液 (25 mM HEPES, pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, and 1 μ g/ml each pepstatin, leupeptin, and aprotinin, and 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride) 中に溶解した。遠心分離 (12000 x g, 15 分, 4°C) 後, 上澄み液に含まれる蛋白を定量した。抽出した蛋白 (10 μ g/ml) を等量の Caspase-Glo 試薬に加え 96-well plate で 1 時間 (室温) でインキュベーションした。プレートリーダータイプのルミノメーター (EG&G Berthold 社製) で発光計測法により測定した。測定値を正常ラット (シャム群, n=6) を基準に比率 (%) で示した。

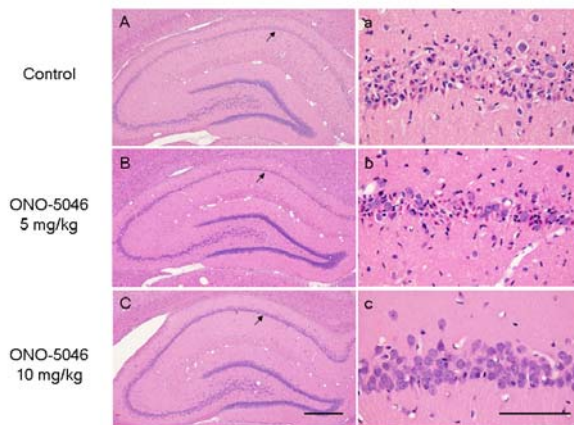
4. 研究成果

虚血再灌流 7 日における病理組織学的所見

図 1 にコントロール群, ONO-5046 5mg/kg 群, 10mg/kg 群における虚血再灌流 7 日の海馬 CA1 の光学顕微鏡所見を示し, 図 2 に生存神経細胞数比 (生存神経細胞数/同週齢ラット神経細胞数比) を示す。コントロール群では, 海馬 CA1 のほとんどの細胞が選択的に傷害され, 正常な細胞 (3.2% [0-10%]) はごくわずかであった。海馬の錐体神経細胞は萎縮し, クロマチンの凝縮に加え, 反応性の

グリオシスが観察された。ONO-5046 5mg/kg 群, 10mg/kg 群ではコントロール群に比べ傷害は軽く, 生存神経細胞比はそれぞれ, 31% [12-57%]と 69% [37-76]であった。虚血再灌流直後に投与された ONO-5046 10mg/kg は 5mg/kg と比べ一過性脳虚血による海馬 CA1 の神経細胞傷害をより強く軽減した。

図 1



血漿好中球エラスターゼ活性の経時変化

図 2 に一過性脳虚血後の血漿の好中球エラスターゼ活性変化 (コントロール, ONO-5046 10mg/kg 群) を示す。コントロール群では再灌流 60 分 (41 [36-68] nmol/ml, 中央値, [範囲]) まで時間依存的に上昇し, 4, 8 時間でそれぞれ 0 [0-1], 0 [0-4] nmol/ml に低下した。ONO-5046 10mg/kg 群では 60 分 (14 [11-25] nmol/ml) で軽度上昇傾向を示したが, その後 4 時間, 8 時間では 0 [0-7], 0 [0-15] nmol/ml に低下した。再灌流 60 分で ONO-5046 10mg/kg 群ではコントロール群と比較して, 有意に血漿中の好中球エラスターゼ活性が抑制された ($p = 0.009$)

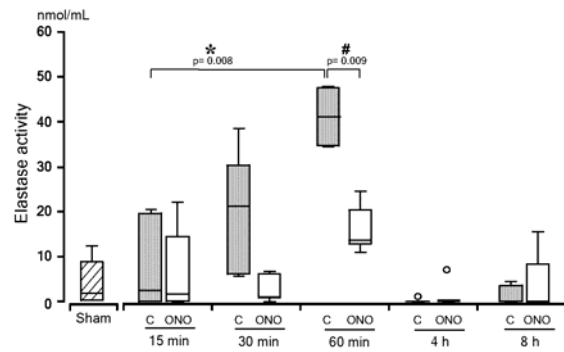


図 2

脳内における好中球エラスターゼ局在

図 3 に海馬領域の好中球エラスターゼに対する免疫組織化学染色を示す。シャム群 (図 3 A, a) と比較しコントロール (8 分前脳虚血) 群では, 再灌流 4 時間で海馬の血管内皮細胞とその周囲が濃く染色された (図 3 c) が, 海馬神経細胞層では染色されなかった (図 3 C)。再灌流 8 時間では, ネガティブコントロール (図 3 B, b) と比較して, 海馬神経細胞層において細胞外領域が濃く染色された (図 3 d)。一方, ONO-5046 10mg/kg 投与群では, 再灌流 4 時間で好中球エラスターゼに対する染色は血管内皮にとどまり, 血管外は染色されず (図 3 e), 再灌流 8 時間においても海馬神経細胞層において細胞外領域は染色されなかった (図 3 f)。

海馬におけるカスパーゼ-3/7 活性の経時的変化

図 4 に海馬 CA1 領域におけるカスパーゼ-3/7 活性の虚血後の経時的変化を示す。シャム群と比較してコントロール群ではカスパーゼ-3/7 活性が再灌流 8 時間 (145%, [114-190%] : 中央値, [範囲], $p = 0.003$) で有意に上昇した。ONO-5046 10mg/kg 群ではカスパーゼ活性の上昇は認められず, 8 時間ではコントロール群と比較して有意に低か

った (75%, [66-116%], $p=0.006$).

図 3

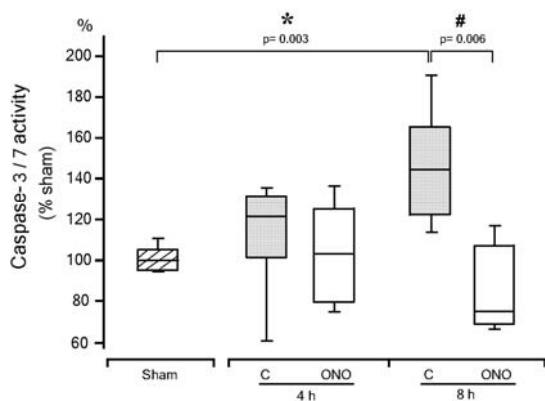
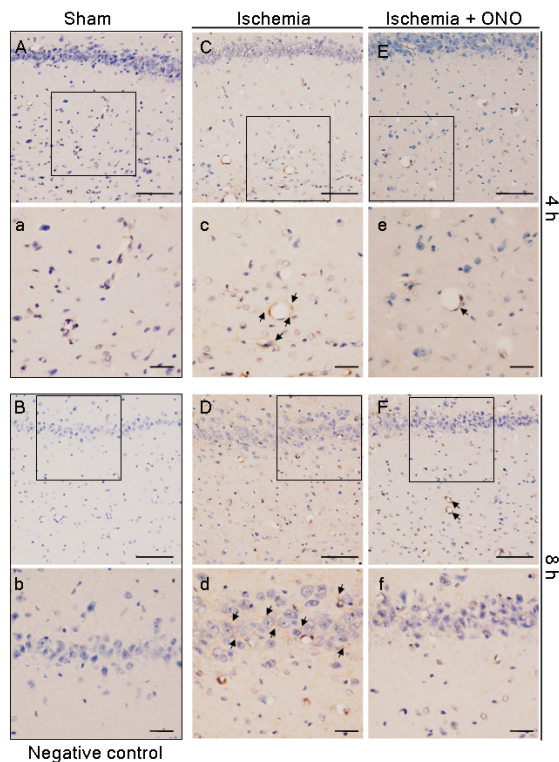


図 4

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Matayoshi H., Hirata T., Yamashita S., Ishida K., Mizukami Y., Gondo T., Matsumoto M., Sakabe T., Neutrophil elastase inhibitor attenuates hippocampal neuronal damage after transient forebrain ischemia in rats. 2009. Brain

Res. 1259, 98-106. 査読 有

[学会発表] (計 1 件)

- ① 平田孝夫, 又吉宏昭, 山下敦夫, 福田志朗, 石田和慶, 松本美志也, 坂部武史, 好中球エラスターゼ阻害薬 ONO-5046 はラット一過性脳虚血後の海馬 CA1 神経細胞死を軽減させる. 日本麻酔科学会 第 56 回 学術集会 2009 年 8 月 16 日 神戸

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平田 孝夫 (HIRATA TAKAO)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 40420533

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし