

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09350

研究課題名（和文）脳梗塞におけるPDGFナノ粒子を用いた新規治療の開発

研究課題名（英文）Development of novel treatment using PDGF nanoparticles for cerebral infarction

研究代表者

有村 公一（Arimura, Koichi）

九州大学・病院・講師

研究者番号：00638025

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：PDGF-BBを修飾したナノ粒子（PDGFB-NP）を培養ペリサイトに投与すると、コントロールと比較して著明にAktのリン酸化が認められた。PDGFB-NPを脳梗塞マウスモデルに投与したところ、PDGFB-NPはMAP2染色で確認される脳梗塞巣やその周囲に集積し、脳梗塞体積の縮小が認められた。またシリンダーテストにおいてPDGFB-NP治療群では有意な運動機能の改善が認められた。メカニズムを検討したところ、PDGFR陽性のペリサイトにおいてAktのリン酸化を介してNT-3の発現が有意に増加していた。さらにPDGFB-NPはアポトーシスの減少と、アストロサイトによる創傷治癒作用を促していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳卒中は我が国の死因の第4位、寝たきりの原因の第1位であり、超高齢社会を迎えるにあたりその対策は喫緊の課題である。脳梗塞の急性期治療は血栓溶解や血栓回収のtime windowを超過した患者に対する有効な治療はなく、新たな治療開発が望まれている。本研究によりdrug delivery systemを活用したnanoparticleによる新しい脳梗塞治療の可能性が見出された。

研究成果の概要（英文）：When PDGF-BB-modified nanoparticles (PDGFB-NP) were administered to cultured pericytes, marked phosphorylation of Akt was observed compared to controls. When PDGFB-NP was administered to a mouse model of cerebral infarction, PDGFB-NP accumulated in and around the cerebral infarction lesion confirmed by MAP2 staining, and reduced the cerebral infarct volume. In the cylinder test, a significant improvement in motor function was observed in the PDGFB-NP treatment group. We investigated the mechanism and found that NT-3 expression was significantly increased in PDGFR-positive pericytes via Akt phosphorylation. Furthermore, PDGFB-NPs reduced apoptosis and promoted wound healing by astrocytes.

研究分野：脳神経外科

キーワード：脳梗塞 nanoparticle PDGF drug delivery

1. 研究開始当初の背景

脳卒中は我が国の死因の第4位、寝たきりの原因の第1位であり、超高齢社会を迎えるにあたりその対策は喫緊の課題である。脳卒中のうち最も大きな割合を占める脳梗塞に対する治療においては、血栓溶解療法や血管内治療などの超急性期治療は近年めざましく発展したが、これらは時間的制約が厳しいため脳梗塞患者のごく一部にしか適用できない。これらの治療適応とならない患者は点滴治療やリハビリで加療するが、多くの場合後遺症で不自由な生活を強いられる。このような背景から、脳梗塞治療の現場では therapeutic time window の広い、効果的な治療の開発が望まれている。

申請者はこれまでに neurovascular unit 構成細胞の一つであるペリサイトに注目し研究を行ってきた。ペリサイトは人体の中で特に脳に多く存在する細胞で、血液脳関門の制御や血管新生において中心的な役割を果たしていることが明らかになってきている。様々な中枢神経疾患におけるペリサイトの働きが解明されてきているが、これまでに我々は脳梗塞においてペリサイトが神経保護作用、創傷治癒作用、酸化ストレス制御に深く関わっていることを明らかにし、さらにペリサイトが脳梗塞発症後急性期から慢性期にわたって持続的に活性化されていることを報告してきた。これらの知見よりペリサイトは脳梗塞の治癒過程において重要な役割を果たしており、その効果は慢性期まで持続的に発揮されていると考えられる。

一方ナノ粒子を用いた Drug delivery system (DDS)による治療は腫瘍領域などで研究・応用が進んでいるが、脳血管障害領域では実用化されていない。しかしナノ粒子には Enhanced permeability and retention (EPR)効果などで、病変部に長時間治療効果を発揮することが報告されている。我々はナノ粒子が脳梗塞巣に数日から1週間程度滞留することを確認しており、急性期から慢性期にわたり脳梗塞巣で働くペリサイトを活性化させるのに適した治療アプローチとなりうると考えた。

以上のような学術的背景より、脳梗塞において持続的に治癒過程に関与しているペリサイトを、ナノ粒子を用いた DDS により活性化させることで、多くの脳梗塞患者に適用可能な therapeutic time window の広い新規治療を開発できる可能性があると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的はナノ粒子を用いた DDS を用いて、ペリサイトを標的とした therapeutic time window の広い脳梗塞新規治療を開発することである。ペリサイトは前述のように脳梗塞において急性期から慢性期にかけての治療ターゲットとなりうるため、現在の超急性期再開通療法とは異なりさらに多くの脳梗塞患者に適用できる可能性がある。

また脳血管障害に対するナノ粒子を用いた DDS は未だ実用化されていないが、我々の作成したナノ粒子は病変部に長く滞留することを確認しており、ペリサイトに対する有効な治療アプローチとなる可能性がある。

本研究が実用化されれば、特殊な細胞培養などを必要とせず大部分の脳梗塞患者が対象となるような新規治療の開発に繋がると考えられる。

3. 研究の方法

・ PDGF 修飾ナノ粒子の作成

すでに PDGF-BB 及び蛍光物質(Alexa488)を修飾したナノ粒子は作成しており、血液中でも安定性の高い親水性ポリエチレングリコールと疎水性ポリアミノ酸から構成される高分子ポリマーによるミセル化ナノ粒子を用いる。脳梗塞の場合は梗塞巣において血液脳関門は破綻しており、上記の我々の予備実験のデータよりナノ粒子は脳梗塞巣に長時間にわたって分布する。

・ 虚血再灌流モデル

脳梗塞モデルは suture によるマウス中大脳動脈(MCA)一時閉塞モデルを用いる。マイクロドリルで側頭骨に小孔を穿ち MCA を露出させ、6-0 ナイロン糸を MCA の下に通して回転させることで一時閉塞させる。2 時間閉塞してから糸を抜去して血管を再開通させる。

再灌流時に頸動脈(カテーテルによる血栓回収療法後を想定)または尾静脈(血栓溶解療法後を想定)より PDGF-BB 修飾ナノ粒子を投与し、投与 3・7 日後に蛍光イメージングシステムで評価、最適な投与量を決定する。

・ 治療効果判定

虚血再灌流モデルと永久閉塞モデルそれぞれについて、脳梗塞後 3,7 日後に MRI もしくは TTC 染色で脳梗塞体積を測定し、コントロール群(薬剤非修飾ナノ粒子投与群)と比較する。また同時期に歩行解析やシリンダーテストによる運動機能の解析を行う。

・ 活性化細胞の確認

PDGF-BB 修飾ナノ粒子投与群とコントロール群で、免疫染色およびウエスタンブロットにより脳梗塞巣での PDGFR の発現量およびリン酸化について検討する。さらに Neurovascular unit を構成する内皮細胞・ペリサイト・アストロサイト・神経細胞について、それぞれの細胞マーカーとリン酸化 PDGFR の二重染色を行ってナノ粒子により活性化された細胞を確認する。

虚血再灌流・永久閉塞モデルで PDGF-BB 修飾ナノ粒子により活性化された分子を解析する。

・ PDGF-BB 修飾ナノ粒子投与群とコントロール群で、免疫染色およびウエスタンブロットにより脳梗塞巣での Akt や Erk、PLC などの発現及び活性化を検討し、活性化されているシグナル経路を解析する。

・ 続いて免疫染色・ウエスタンブロット・RT-PCR により脳梗塞巣での NGF や NT-3 などの神経栄養因子について解析し、神経細胞のアポトーシスを TUNEL 染色にて評価する。

・ Fibronectin・Collage などの創傷治癒関連蛋白や MMP-2,9 などの蛋白分解酵素の発現について検討する。またペリサイトは Blood-Brain barrier (BBB)の維持にも深く関与しているため、Evans blue を投与して BBB の機能についても検討する。さらにペリサイトは血管新生にも深く関与しているため、CD31 染色で脳梗塞巣における血管新生について解析する。

4 . 研究成果

2020 年度はまず PDGF-BB を修飾したナノ粒子を作成し、脳梗塞マウスモデルに投与した。Heat shock protein 16.5 による球殻状バイオテンプレートを作成し、PDGF-BB をナノ粒子表面に修飾した。

ペリサイト修飾ナノ粒子(PDGFB-NP)を培養ペリサイトに投与すると、ウエスタンブロットにおいてコントロールと比較して著明に Akt のリン酸化が認められた。またナノ粒子のサイズは 10nm 前後であり、PDGF-BB を修飾しても特に大きなサイズの変化は見られなかった。PDGFB-NP は MAP2 染色で確認される脳梗塞巣やその周囲に集積し、1 週間程度は集積が持続していた。

PDGFB-NP を脳梗塞モデルマウスに投与すると PDGFB-NP を脳梗塞モデルマウスに投与すると、コントロール群と比較して脳梗塞体積の縮小及び運動機能の改善が認められた。そのメカニズム

を検討したところ、梗塞巣及び梗塞巣周囲で Akt のリン酸化が認められ、コントロールと比較しても Akt リン酸化が upregulate されていた。また Akt リン酸化の起こっている細胞の一部は PDGFR にも陽性で、ペリサイトにおいて Akt が活性化されていることが示唆された。

2021 年度はそのメカニズムを検討したところ、梗塞巣及び梗塞巣周囲で Akt のリン酸化が認められていた。Akt リン酸化細胞を免疫二重染色で検討すると、主に PDGFR 陽性のペリサイトであることが判明した。また同部位において BDNF、NGF、NT-3 といった neurotrophin の発現を ELISA 法で調べると、PDGFB-NP 治療群において NT-3 の発現が有意に増加していた。さらに PDGFB-NP 治療群では梗塞巣や梗塞巣周囲における TUNEL 染色陽性のアポトーシス細胞がコントロールと比較して有意に低下していた。以上より PDGFB-NP は脳梗塞において梗塞巣や梗塞巣周囲でのアポトーシスを制御することにより神経保護効果を発揮している可能性が示唆された。

2022 年度は梗塞巣及び梗塞巣周囲で創傷治癒について解析を行った。GFAP の免疫染色を行ったところ、PDGFB-NP 治療群で脳梗塞巣周囲において GFAP 陽性の反応性アストロサイトの浸潤が認められ、PDGFB-NP 治療群ではアストロサイトによる創傷治癒作用が増強されていることが示唆された。

以上の結果により、PDGFB-NP は脳梗塞マウスモデルにおいて梗塞巣や梗塞巣周囲でのアポトーシスの制御および創傷治癒作用の増強を介して神経保護効果を発揮している可能性が示唆された。

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 0件）

1. 著者名 Soh Takagishi	4. 巻 8
2. 論文標題 Protein Nanoparticles Modified with PDGF-B as a Novel Therapy After Acute Cerebral Infarction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eNeuro	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/ENEURO.0098-21.2021	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 有村公一、高岸創、岩城克馬、西村中、奥田智裕、 榎原佐由子、村田正治、飯原弘二、溝口昌弘
2. 発表標題 PDGFナノパーティクルを用いた脳梗塞の治療開発
3. 学会等名 第63回日本脳循環代謝学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 脳梗塞治療用組成物	発明者 村田 正治、有村 公一、高岸 創、榎原 佐由子、飯原 弘二	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-074179	取得年 2020年	国内・外国の別 国内

〔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
研究分担者	村田 正治 (Murata Masaharu) (30304744)	九州大学・先端医療オープンイノベーションセンター・教授 (17102)	

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