

令和 5 年 4 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09388

研究課題名(和文) 部分再開通における脳梗塞進展の機序解明と治療法の開発

研究課題名(英文) Pathophysiological analysis and development of therapy in partial reperfusion in ischemic stroke

研究代表者

島村 宗尚 (Shimamura, Munehisa)

大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座教授

研究者番号：60422317

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)：マウスにおける部分再開通モデルを新規に作成した。部分再開通では、最終的な梗塞サイズは永久閉塞と同じであるが、3-24時間後の間に生じる神経細胞の変性が遅延し、3時間後でのアポトーシスを多く誘導することが示唆された。また、FITC標識デキストランは梗塞部位に到達可能であることから、梗塞部位への薬剤デリバリーが部分再開通では可能であると考えられた。LGR4は正常部位に比較し、3日目の梗塞部位では発現は低下しているものの発現は維持されていた。正常部位では神経細胞に、また、梗塞部位においては傷害神経細胞およびミクログリア・マクロファージに発現していたが、MHP1での治療効果は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳梗塞において、血栓回収療法が不完全な状態(部分再開通)では予後が改善せず、新たな治療法の開発が必要とされているが、その病態は明らかではなかった。新たに作成した部分再開通モデルマウスを用いた検討では、永久閉塞と比較すると部分再開通では神経細胞死が遅延し、アポトーシス細胞が増加すること、また、血液脳関門の破綻が軽度であり、静脈内に投与された薬剤の梗塞部位への到達が可能であることが示唆された。これらの結果から、部分再開通が脳梗塞において治療対象となること、また、薬剤開発のために必要な基礎的な病態が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In the present study, a novel model of partial recanalization in mice was developed. Partial recanalization was shown to induce more apoptosis at 3 hours, with delayed degeneration of injured neurons occurring between 3 and 24 hours although the final infarct size was the same as that of permanent occlusion. FITC-labeled dextran could reach the infarction site, suggesting that drug delivery to the infarction site is possible with partial recanalization. In partial realization, expression of LGR4 was downregulated in the infarct region but maintained at the infarction site on days 1 and 3 compared to the normal site. It was expressed on neurons at the normal region and on injured neurons and microglia/macrophages at the infarct region. Unfortunately, no therapeutic effect was observed with MHP1, which is a partial peptide of RANKL.

研究分野：虚血性脳血管障害

キーワード：脳梗塞 炎症 神経細胞死 血液脳関門 LGR4

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞急性期の病態解明および治療薬の開発は、完全再開通となる虚血再環流モデルおよび非再開通である永久閉塞モデルでの開発がなされてきた。しかし、血栓回収療法の出現によりこれまで研究がなされていなかった部分再開通症例が脳梗塞急性期において生じるようになったが、部分再開通に伴う低灌流状態における脳梗塞の病態進展の機序についての臨床および基礎研究はなされておらず、治療法の開発は困難であった。部分再開通と永久閉塞による病態の進展の機序に違いがあるのか、また、部分再開通への治療介入が可能なか明らかにするには、新規の動物モデルを用いた基礎研究が必要であった。

一方で我々は、RANKL (リガンド) /RANK (受容体) シグナルが、虚血再環流後に活性化されるミクログリア/マクロファージにおける TLR 関連炎症を抑制し、脳梗塞の悪化を抑制することを見いだし (Shimamura, et al. PNAS 2014)、RANKL 部分ペプチド MHP1 による治療効果を明らかにしたが (Shimamura, et al. Sci Rep 2018 ほか)、本ペプチドの新たな作用機序として血管内皮細胞における PKA, PKC 依存性の eNOS のリン酸化促進を BAEC (bovine aortic endothelial cells) で見いだしていた。MHP1 は RANKL の新たな受容体として報告されている leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 4 (LGR4) にも結合すること、LGR4 は cAMP/PKA/CREB に関与することから、本ペプチドが LGR4 を介した cAMP/PKA/CREB の促進にて eNOS を活性化する可能性を想定した。脳疾患における LGR4 の機能は未報告であるが、部分再開通において LGR4 が低灌流部分の血管内皮細胞のみに発現するようであれば、MHP1 による eNOS の活性化により低灌流部分に特異的な脳血流改善を期待でき、部分再開通における脳梗塞の進展を抑制できる可能性があることを想定していた。

2. 研究の目的

本研究では、マウス部分再開通モデルを確立し、病態機序と低灌流領域への薬剤のデリバリーの可能性を明らかにすること、部分再開通における LGR4 の発現と、治療標的分子としての可能性を、MHP1 を用いて明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

マウス部分再開通モデルの確立

申請時に FeCl₃ の中大脳動脈 (MCA) 塗布による MCA 遠位部の血栓閉塞 (dMCAo) 直後に総頸動脈 (CCA) を 15 分間閉塞し、その後に CCA を解除することにより、部分的に MCA が再開通して MCA 領域に低灌流領域が生じるモデルを新たに作成していた。しかし、本研究において n 数を増やして検討したところ、再環流後短時間で中大脳動脈が完全再環流するマウスや、全く再環流しないマウスなどのばらつきが多く、FeCl₃ 濃度、添加時間、総頸動脈閉塞時間の調整を行ったが、改善が認められなかった。そこで、dMCAo に 14 分間の総頸動脈閉塞を施し、マウスでの脳血流を Laser speckle image で脳血流と脳梗塞体積を観察し、部分再開通としてのモデルの妥当性を検討した。

マウス部分再開通モデルでの病態解析

部分再開通の病態を永久閉塞モデルと比較した。まず、虚血後 24 時間までの神経細胞死について Fluoro-jade C 染色で解析し、アポトーシスについて TUNEL 染色で確認した。次に、血液脳関門の状態については、マウス IgG に対する免疫染色で確認し、また、梗塞部位への薬物デリバリーの可能性と血液脳関門の確認については FITC を結合したデキストラン (70 kDa) を静注することによって検討した。さらに、*il6*, *tnf*, *il1b*, *mcp1*, *inos*, *cd11b*, *arg1* の発現の差異

について realtime RT-PCR にて解析した。また、LGR4 の発現を realtime RT-PCR と免疫染色にて検討した。

4. 研究成果

まず、脳血流を Laser speckle image で確認した。部分再開通モデルのコア領域を prS1, 周囲領域を prS2, 永久閉塞モデルのコア領域を S1, 周囲領域を S2 と設定した (図 1 A, B)。いずれの領域においても、総頸動脈の再開通後には、部分的に血流改善を認めていた (図 1C)。また、TTC 染色での解析では、永久閉塞に比較して脳梗塞サイズに差はなく (図 1D)、本モデルが、予後の改善が認められない TIC11-2a に該当する部分再開通であることが示唆された。

本モデルにおいて、FJC 染色を用いて神経細胞死を検討した。脳梗塞境界域で正常側の部位 (Inner) と梗塞側の部位 (Outer) について検討したところ、24 時間後においては部分再開通と永久閉塞間で神経細胞死には差異がないものの (図 2B)、Outer においては 3 時間の時点では、部分再開通において神経細胞死が抑制されていた (図 2C)。一方で、TUNEL 染色においては、Inner, Outer のいずれにおいても、特に 3 時間後の部分再開通の脳梗塞周囲領域に

において、TUNEL 陽性細胞が増加していることが明らかとなり (図 2E, F)、部分再開通においては超急性期にアポトーシス細胞が増加する一方で、細胞死が抑制されることが明らかとなった。

血液脳関門を評価するために IgG に対する免疫染色を施行したところ、3 時間後では部分再開通と永久閉塞間のいずれにおいても IgG の血管外漏出は認められなかったが、24 時間後においては血管外漏出が認められつつも、部分再開通の梗塞周囲領域において、IgG の血管外漏出が抑

図 1 部分再開通モデルの確立

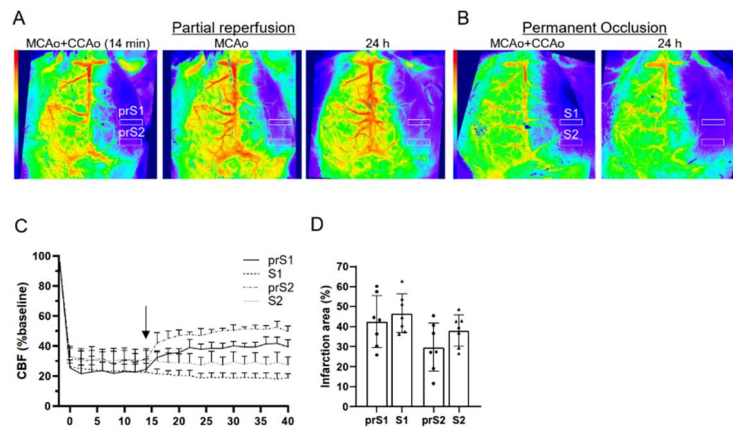


図 2 FJC 染色と TUNEL 染色

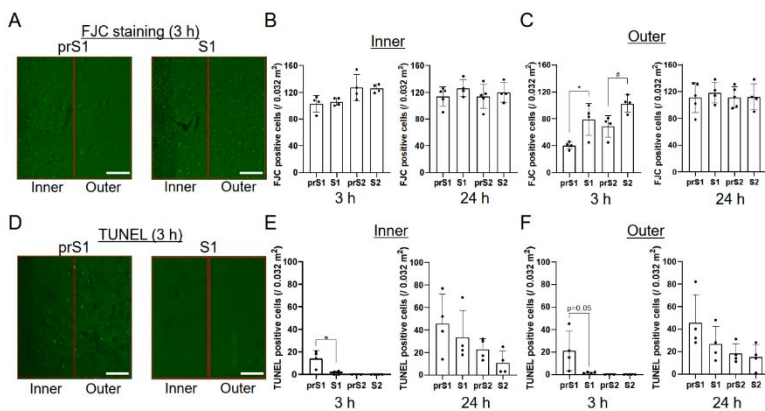
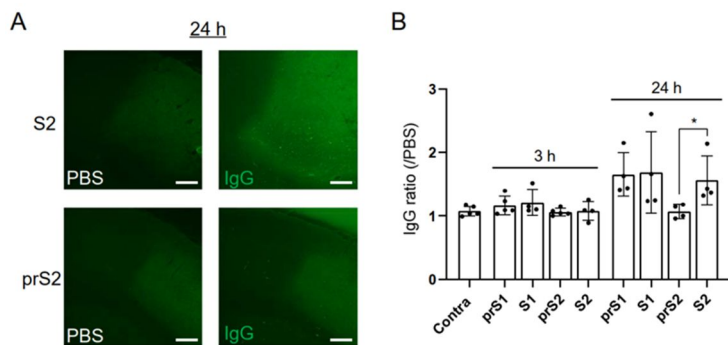


図 3 免疫染色による IgG の血管外漏出



制されていることが明らかとなった (図3)。次に、FITC 標識 dextran を頸静脈に静注し、2 分後の脳組織を検討したところ、永久閉塞では 24 時間後の梗塞部位における FITC 陽性血管が消失しているが、部分再開通モデルにおいては、FITC 陽性血管が一定数認められた (図4、図5A)。FITC 標識デキストランの血管外漏出については、特に梗塞周囲領域で強く認められた (図5B)。これらのことは、部分再開通においては、永久閉塞に比較し、梗塞部位への薬剤のデリバリーが可能であることを示唆している。一方で、部分再開通の血管周囲領域 (prS2) においては、虚血後 24 時間で IgG の血管外遊出が抑制されたにも関わらず、FITC 標識デキストランの血管外漏出が認められている。この相違は、IgG の評価では、血中タンパク質の血管外漏出の総和を見ていることに対し、FITC 標識デキストランは投与時の血管外漏出を見ているため、prS2 でも 24 時間後にはすでに BBB の破壊が始まっているが、BBB の破壊が遅延したため、IgG の蓄積は抑制された可能性がある。このように、部分再開通と永久閉塞では、血液脳関門の破綻の過程にも差があることが明らかとなった。

BBB の破綻は炎症性サイトカインの産生に影響を与えるため、炎症性サイトカインの発現を検討した。その結果、24 時間後において、*il1* と *il6* の発現が部分再開通のコア (prS1) で抑制されていた。*iNOS* や *arg1* などの M1, M2 マーカーに差が無かったことから、部分再開通はミクログリア・マクrophage の M1/M2 表現形には影響を与えず、炎症性サイトカインの発現を抑制できることが明らかとなった。

図4 部分再開通における FITC 標識デキストランの静注

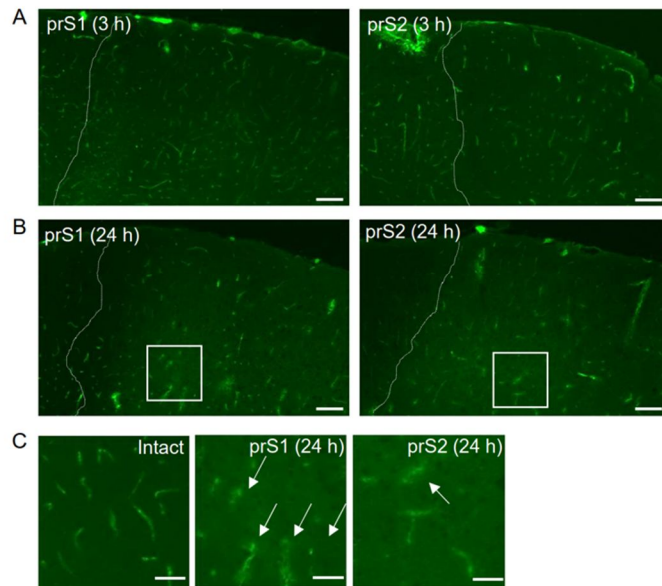


図5 FITC 陽性血管数と FITC 漏出血管数

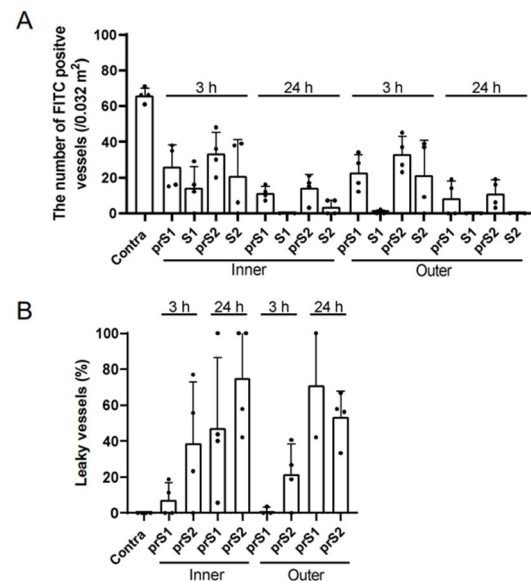
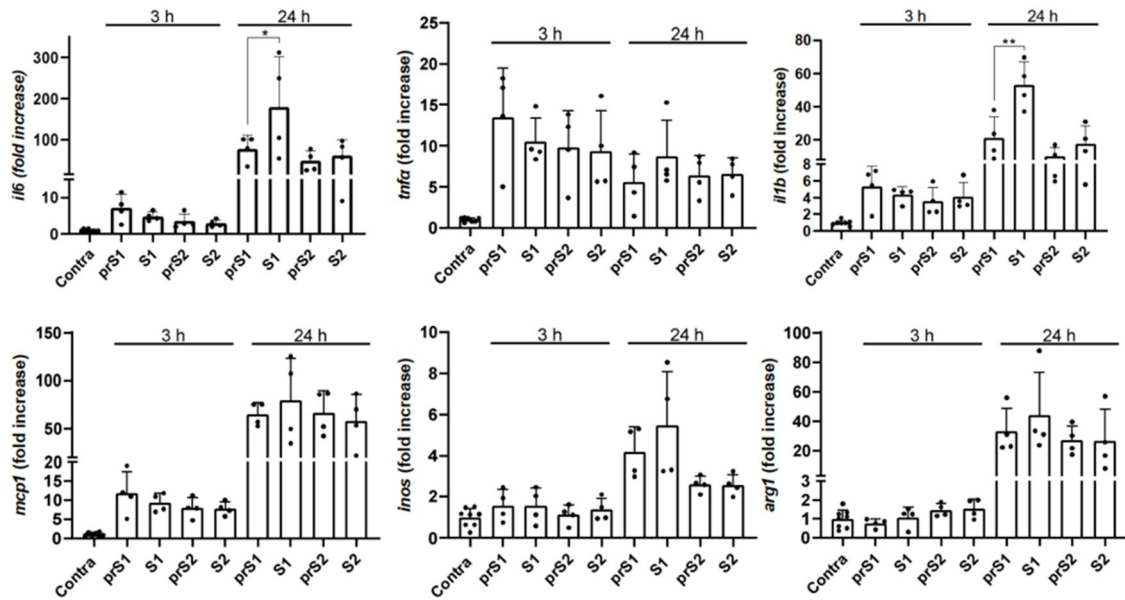


図 6 脳梗塞部位における炎症性サイトカインの発現



以上のことから、部分再灌流は永久閉塞とは異なる病態生理を持つことが明らかとなった。特に、部分再灌流から3時間後では梗塞外周部でアポトーシス細胞が増加し、神経変性が抑制されていることから、部分再灌流は、3時間後から24時間後の間に起きる傷害神経細胞の変性を阻止するには不十分であるが、神経変性を遅延させ、また、アポトーシスを多く誘導することが示唆された。アポトーシスは薬理的に阻止できる可能性があるため、神経保護という観点から、部分再灌流は治療の対象となりうる可能性が考えられた。また、部分再開通における炎症性サイトカインの減少は、壊死細胞よりも炎症反応を引き起こしにくいアポトーシス細胞の増加を反映していることが推測された。部分再開通ではデキストランが梗塞部位に到達可能であることから、梗塞部位への薬剤デリバリーが可能であり、部分再開通は今後の新規治療法開発の標的病態となりうると思われた。

次に、LGR4の発現を部分再開通モデルにおいて確認した。梗塞部位のrealtime RT-PCRでの検討では、正常部位と比較し、1日目、3日目の梗塞部位では発現は低下しているものの、LGR4の発現は維持されていた。免疫染色での検討では、LGR4は正常部位では神経細胞に、また、梗塞部位においては傷害神経細胞およびミクログリア・マクロファージに発現しており、申請時のBAEC細胞の検討から想定された血管内皮細胞でのLGR4の発現は認められなかった。この結果から、LGR4を介したeNOSの発現増加による部分再開通部位における血流増加をMHP1では期待できないと考えられたが、念のため、部分再開通直後に頸静脈内に投与し、Laser speckle imageで血流の変化を解析した。結果としては、部分再開通部位での血流の増加は認められなかった。一方で、LGR4はミクログリア・マクロファージに発現しているため、我々が一過性虚血モデルで報告してきたミクログリア・マクロファージにおけるTLR関連炎症抑制を介した治療効果も期待できると考え、脳梗塞サイズの計測も行って見たが、明らかな縮小効果は認められなかった。以上のことから、脳梗塞超急性期にMHP1を用いたLGR4を標的にした治療法は、部分再開通においては効果が無いことが明らかとなった。しかし、LGR4にはWnt/カテニンシグナルを促進させる作用もあることから、R-spondinなど、LGR4に関連する他のリガンドでの検討も今後必要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 島村宗尚
2. 発表標題 脳梗塞における部分再開通の病態解析
3. 学会等名 第11回日本脳血管・認知症学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 島村宗尚
2. 発表標題 部分再開通における脳梗塞の病態解析
3. 学会等名 第21回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 島村宗尚
2. 発表標題 Partial reperfusion delayed neuronal degeneration and BBB destruction in ischemic stroke model in mice.
3. 学会等名 第62回日本神経学術大会
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
研究分担者	中神 啓徳 (Nakagami Hironori) (20325369)	大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座教授 (14401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	林 宏樹 (Hayashi Hiroki) (20813364)	大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座講師 (14401)	

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