

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590114

研究課題名(和文)脳血管障害の病態に関わる脳血管周囲環境でのチロシンリン酸化シグナル解明と治療戦略

研究課題名(英文)Protein tyrosine phosphorylation in the neurovascular unit in cerebrovascular disease and therapeutic strategies

研究代表者

高木 教夫(Takagi, Norio)

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：50318193

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、脳梗塞後の脳血管障害に及ぼすタンパク質チロシンリン酸化の役割解明を試みた。その結果、一過性局所脳虚血後24時間目に脳血管及び脳血管外にMPO陽性細胞が顕著に観察され、好中球の浸潤が示唆された。この好中球浸潤はSrc阻害薬で抑制された。これに伴い、Nox subunit p67phox 量及びCOX-2量の増加もSrc阻害薬で抑制されたため、好中球浸潤と脳血管障害の上流にSrcが存在することが明らかとなった。さらに、血液脳関門の破綻はペリサイトに発現するチロシンリン酸化PDGFR-βの発現量によって調節されている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study sought to determine the role of protein tyrosine phosphorylation in the neurovascular unit after stroke. This study demonstrated that MPO-positive cells were increased in the surrounding brain capillaries after stroke, suggesting neutrophil infiltration. This infiltration was inhibited by src inhibitor. The increases in the levels of NOX subunit p67phox and COX-2 were also attenuated by src inhibitor. In addition, this study suggests that the pathophysiological alteration of the blood brain barrier after stroke may be regulated by tyrosine phosphorylation of PDGFR-beta in the pericytes.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：脳梗塞 脳血管 チロシンリン酸化

## 1. 研究開始当初の背景

体重の約 2%の重量にすぎない成人脳は、心拍出量の 15%に相当する血液の供給を受けている。すなわち、血液によって運搬される酸素やグルコースは脳にとって極めて重要な因子である。それゆえ、脳血管の障害は神経細胞の脆弱性とも関連し、他の臓器と比較し重篤な機能障害（脳血管性認知症、寝たきり等）を引き起こす。我が国の死因（第 4 位）や後遺症（寝たきり原因の第 1 位）を鑑みると、代表的脳血管障害である脳梗塞の治療薬開発は医療的・社会的急務と言える。しかし、脳梗塞病態の悪化を防御・改善する優れた薬物は創出されていないのが現状である。

脳梗塞後の脳血管で起こる様々な事象は、血管周囲の環境、すなわちペリサイトやアストロサイトの生理学的機能にも影響を及ぼすと考えられる。これら血管周囲環境の病態変化は、結果的に中枢高次機能の障害へとつながる可能性がある。申請者は、脳血管の機能的本体である血液脳関門に着目し、その構成タンパク質のチロシンリン酸化が脳梗塞後の血液脳関門機能に影響を及ぼすことを明らかにしてきた。すなわち、脳梗塞後の脳血管とその周囲環境で起こるチロシンリン酸化反応は、病態推移にかかわる極めて重要な事象であると示唆される。しかし、*in vivo* 脳梗塞病態における脳血管病変、とりわけ単離脳血管を用いた研究及び脳血管周囲の環境変化に着目し新たな薬物療法を指向する研究は極めて少ない。

申請者はこれまで脳梗塞後の脳血管病変発生にチロシンキナーゼの活性化が寄与することを明らかにし、脳梗塞後のチロシンリン酸化の機序解明及びチロシンキナーゼの標的分子の同定は脳梗塞病態の解明ばかりでなく、新たな治療戦略を築く基盤研究になり得ることを示している。さらに脳梗塞後の脳血管周囲環境の変化は脳血管機能に直接影響を与える一方、中枢高次機能を担う神経細胞・グリア細胞 (neurovascular unit : NVU) にも病態生理学的影響を及ぼすと考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究は、これまでの研究成果を踏まえ、虚血という事象に最初に遭遇する脳血管とその周囲環境を標的とした新規脳梗塞治療の戦略を提示できるのではないかと考えた。脳血管病変とその脳血管周囲環境変化を創薬ターゲットに据えることは、薬物送達の観点からも有利であり、治療薬開発に大きく貢献するものと考え、本研究は企画された。本研究では脳血管のみならず脳血管周囲に焦点をあて虚血性脳障害を引き起こすチロ

シンリン酸化を解析し、その結果を応用した新たな脳梗塞治療の可能性の提示を試みた。

## 3. 研究の方法

### (1) ラット中大脳動脈閉塞モデルの作製

临床上多く観察される脳血管障害あるいは脳卒中病態を鑑み、本研究ではラット中大脳動脈閉塞・再灌流モデルを用いた。具体的には、ハロタン 1.5% (Takeda Pharm. Co. Ltd., Osaka, Japan) を含む混合ガス ( $N_2O : O_2 = 3 : 1$ ) で麻酔導入後、ハロタン 1% で術中の麻酔を維持した。頸部正中線を切開後、右総頸動脈、右外頸動脈および右翼突口蓋動脈を周囲結合組織より剥離した。次いで、外頸動脈切開部位より外科用ナイロン糸を内頸動脈に向けて約 20 mm 挿入することによって、栓子先端部で中大脳動脈起始部を閉塞し、栓子近位部を絹糸で外頸動脈に固定した。動脈閉塞時間は一般的に行われている 90 分間とした。閉塞 1 時間後のラットの症状を観察し、歩行時に左側方への力に対する抵抗力が欠如しているラット、あるいは左旋回するラットのみを選出し、中大脳動脈閉塞 90 分目に再びラットを麻酔した後、栓子を抜去することで血流を再開させた。

### (2) 脳虚血病態の評価

脳梗塞後脳血管及びその周囲におけるチロシンリン酸化タンパク質とその病態生理学的意義を提示するためにチロシンキナーゼ阻害薬を用い虚血性脳障害を評価した。梗塞巣は TTC 染色法で評価した。脳血管の透過性を評価するために、FITC-albumin で脳内還流後、薄切切片を作製し血管外への FITC 漏出領域を測定することで血液脳関門機能を解析した。

### (3) Src family tyrosine kinase inhibitor, 4-amino-5- (4-chlorophenyl) -7- (t-butyl) pyrazolo [3, 4-d] pyrimidine (PP2) の静脈内投与

麻酔したラットの左大腿部を切開し、左大腿静脈を露出させた。中大脳動脈閉塞 80 分目から、5% dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解した PP2 (Src family tyrosine kinase inhibitor ; Biomol International, L.P., Philadelphia, PA, USA) を左大腿静脈より 30 mg/kg になるように syringe pump (CFV-2100, NIHON KOHDEN, Tokyo, Japan) を用いて 20 分間持続投与した (PP2 投与群)。一方、5% DMSO のみを投与したラットを vehicle 投与群とした。

### (4) 脳血管の単離

脳毛細血管のチロシンリン酸化タンパク質に着目するために、ラット脳から脳毛細血管を単離した。脳血管は Ficoll と dextran を用いた遠心分離法で脳梗塞後ラット脳か

ら単離した。脳梗塞後ラットからの脳毛細血管単離方法は申請者の既報で報告済みである【Biochem. Biophys. Res. Commun. 339:1197-1203, 2006】。

#### (5) Western immunoblotting

既存の方法で目的タンパク質を Western immunoblotting 法で解析した。

#### (6) 免疫組織染色

既存の方法で、免疫組織染色を行い、組織学的検討を行った。

### 4. 研究成果

(1)申請者はこれまでラット一過性中大脳動脈閉塞モデルを用い、Src family チロシンキナーゼの阻害薬が梗塞巣体積を軽減すること、この効果の一因に血液脳関門構成タンパク質 occludin 及び活性酸素発生にかかわる NADPH oxidase が関与することを明らかにしてきた。本研究では、まず FITC-albumin で脳内を還流後、薄切切片による血管外への FITC 漏出領域を測定することにより血液脳関門機能を解析した結果、再灌流後 24 時間目の FITC 漏出領域の出現とチロシンキナーゼ阻害薬による FITC 漏出抑制を確認した。さらに、ミエロペルオキシダーゼ (MPO) タンパク質の免疫組織学的手法により好中球の脳組織浸潤を評価することにより、一過性中大脳動脈閉塞後再灌流時の脳血管機能を解析した。その結果、再灌流後 24 時間目において、脳血管及び脳血管外に MPO 陽性細胞が著しく観察された。二重染色法により、この MPO 陽性細胞は GFAP 陽性細胞 (アストロサイト) あるいは NeuN 陽性細胞 (神経細胞) と merge しないことを確認し、これらの結果により、一過性脳虚血後の脳組織内への好中球浸潤が示唆された。引き続き、チロシンキナーゼ阻害薬の効果を検討したところ、単位視野あたりの MPO 陽性細胞数は顕著に減少した。これまでの結果を考え合わせると、一過性脳梗塞後の脳血管におけるチロシンリン酸化反応が血液脳関門の破綻と好中球浸潤に深く関与することが示唆された。

(2)次に、脳梗塞急性期の炎症反応が寄与する病態生理学的変化を把握するとともに、炎症反応誘発性酸化ストレスに及ぼす Src の役割について検討した。大脳皮質において Nox subunit p67<sup>phox</sup> 量は MCAO/R 後 24 時間目で naïve control 群と比較し顕著に増加した。この増加は Nox 活性化を介した ROS 産生が MCAO/R 後 24 時間目に生じていることを示唆させた。また、Nox は好中球に多く存在するため、この大脳皮質での p67<sup>phox</sup> 量の増加は前述した好中球由来である可能性が示された。炎症反応で発現が誘導される cyclooxygenase-2(COX-2)量は、再灌流後 24 時間目で顕著に増加し、炎症性サイトカイン

である IL-1 量は再灌流後 1 時間目で増加していた。IL-1 が p67<sup>phox</sup> や COX-2 より早期に増加していることから、IL-1 がその後の酸化ストレスやさらなる炎症反応を惹起する可能性を示した。また、Src family チロシンキナーゼ阻害薬の投与により、MCAO/R 後 24 時間目の mature IL-1 量は PP2 投与で変化しなかった。Mature IL-1 量は MCAO/R 後 1 時間目で増加するため、IL-1 量に及ぼす Src の関与は Src 阻害薬の投与時期をさらに検討する必要があるだろう。一方、再灌流後 24 時間目に観察された p67<sup>phox</sup> および COX-2 量の増加は PP2 投与によって抑制された。これらの結果から、再灌流後の NOX 増加による活性酸素種産生の上流に Src 活性化が関与している可能性を示した。

(3)次に Adherens junction に存在する VE-cadherin のチロシンリン酸化と血液脳関門の破綻機序との関連について検討した。その結果、BBB 破綻機序の 1 つとして Src を介する 731 番目チロシンリン酸 VE-cadherin が関与していることを示した。さらに本研究では、NVU 構成細胞のペリサイトに着目し、虚血/再灌流後の BBB 破綻のメカニズムの解明を試みた。その結果、cortical homogenates での PDGFR- タンパク質量が MCAO/R 24 時間目で減少すること、さらに、大脳皮質脳毛細血管画分においても PDGFR- タンパク質量が MCAO/R 6 および 24 時間目で減少することを示した。すなわち、MCAO/R 後にペリサイトの脱落が起きている可能性が考えられた。一方、本研究では組織学的検証により、MCAO/R 後 24 時間目の parietal cortex および temporal cortex で PDGFR- の著しい発現上昇が観察された。これらの結果は、ペリサイトの脱落によるものではなく、むしろ MCAO/R 後の BBB の破綻にペリサイトに発現する PDGFR- が関与することを示唆し、ペリサイトの BBB 機能維持能は PDGFR- の発現量によって調節されている可能性を示す結果であると考えられた。そして、その結果を裏付けるかのように、前述の FITC-albumin 漏出が MCAO/R 6 時間目から認められることから、時間的観点からも一致し、本研究で得られた結果はペリサイトの PDGFR- を介した機能異常であることが推察された。一方、ペリサイトは血管新生に重要な役割を持つことが明らかにされていることから、本研究結果は、生体内の虚血に対する反応として一部のペリサイトの PDGFR- の発現が増加し、Tie-2 あるいは内皮細胞との相互関係によって血管新生を促し、組織修復へのシグナル経路を活性化させている可能性が示唆された。また、脳梗塞急性期ではチロシンリン酸化 PDGFR- を介する Akt 経路の活性化が減弱し、特に梗塞領域では活性化ミクログリアの集積およびペリサイトの脱落を伴う NVU の崩壊が起きていることを示唆した。一方、ペナンプラ領域では、

PDGF-B-PDGFR- 経路が梗塞巣の拡大を阻止しNVUの機能維持に重要な役割を果たしている可能性を示した。治療標的を創出する上で、脳梗塞病態時のそのさらなる時間的・空間的把握および詳細なシグナルの解明が必要であると考えられた。

#### 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 2 件)

Takagi N (2014) Protein tyrosine phosphorylation in the ischemic brain. *J. Pharmacol. Sci.*, accepted.

Takagi N, Besshoh S, Marunouchi T, Takeo S, Tanonaka K (2012) Effects of metabotropic glutamate mGlu5 receptor antagonist on tyrosine phosphorylation of NMDA receptor subunits and cell death in the hippocampus after brain ischemia in rats. *Neurosci. Lett.* 530:91-96.

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

高木 教夫 (TAKAGI NORIO)  
東京薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号：50318193

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし