

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 16 日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的萌芽

研究期間：2012～2012

課題番号：24650188

研究課題名（和文） HSP27 蛋白質による新規脳梗塞治療法の開発

研究課題名（英文） Development of the new cerebral infarction therapy by HSP27 protein

研究代表者

志村 秀樹 (SHIMURA HIDEKI)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：50286746

研究成果の概要（和文）：HSP27 蛋白質による新規脳梗塞治療の臨床応用のための大量均一な活性型 HSP27 の産生法を確立するための研究をおこなった。大腸菌に過剰発現させ精製した脱リン酸化 HSP27 は脳保護活性が低いため大腸菌より合成した HSP27 蛋白質をリン酸化修飾し、脳保護効果のある活性型リン酸化 HSP27 蛋白質を合成した。マウス脳梗塞モデルの再還流 1 時間後投与にて対照群に比し脳梗塞巣が 52% に抑制された。大腸菌で大量生産した合成 HSP27 蛋白質を *in vitro* でリン酸化することにより活性型 HSP27 が大量合成可能であることが分かった。

研究成果の概要（英文）：We examined the method of producing activated recombinant HSP27 for future clinical application of the new cerebral infarction treatment by HSP27 protein. Dephosphorylated recombinant HSP27 which made and purified from Escherichia coli had low brain protection activity. The recombinant HSP27 protein was phosphorylated. Phosphorylated recombinant HSP27 had brain protection. Infarct volume was reduced by 52% in stroke model mice when phosphorylated recombinant HSP27 was administered. We developed the method of mass-producing activated phosphorylated recombinant HSP27 *in vitro*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：神経学

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：HSP27、脳梗塞、脳保護、

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞を主体とする脳血管疾患は我が国の死因の第 3 位、寝たきりの原因の第 1 位であり、新規脳梗塞治療薬の開発が急務である。また全医療費の実に 1 割近くが脳卒中診療に費やされており、新規脳梗塞治療薬の開発が医療経済に及ぼす影響もはかり知れない。脳梗塞は、脳血流低下によって種々の傷害機序がドミノ式に生じ、脳損傷が虚血中心部から虚血周辺部に損傷が拡大していく進行性の疾患である（神谷，阿部 臨

床神経，51：305－315，2011）。障害される細胞も神経、グリア、血管内皮細胞等多岐に渡り、細胞障害機序もアポトーシス、ネクローシス、酸化的ストレス、炎症に伴うもの等複雑なメカニズムが関与している。しかしながら現在脳梗塞急性期の治療薬は脳血流改善を主体とした抗血小板剤、抗凝固剤、抗血栓溶解剤である。細胞保護薬として使用可能な薬剤はエダラボンのみで、治療上不十分である。さらに現在までに虚血モデル動物を用いて神経細胞保護を目的

に開発された脳梗塞治療薬は臨床試験において十分な効果が得られておらず、画期的な新脳保護薬が近々登場する可能性も少ない (Ginsberg et al. Neuropharmacology. 55, 363-389 2008)。申請者らは新しい観点からの急性期脳梗塞治療薬の必要性を感じ、2004 年より多機能細胞死抑制物質を条件として脳梗塞治療薬の探索してきた。その中で申請者らが以前抗細胞死抑制効果のあることを報告した HSP27 が (Shimura H et al. J Biol Chem. 2004)、虚血モデルにおいて強力な脳保護作用を示すことが判明した。今後ヒト臨床応用のための汎用性を得るため、大腸菌で合成した HSP27 を *in vitro* でリン酸化し活性型 HSP27 を作成し、将来の臨床試験に備える。

2. 研究の目的

脳虚血モデルにおいて脳保護効果のある活性型合成 HSP27 蛋白質を作成する。非修飾 HSP27 をリン酸化酵素でリン酸化後、脳虚血モデルに投与し、脳保護効果を確認する。

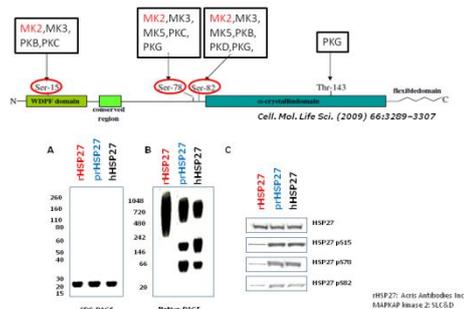
3. 研究の方法

大腸菌で合成・精製した HSP27 蛋白質をリン酸化酵素でリン酸化修飾し、虚血モデルにおいて脳保護効果のある活性型リン酸化 HSP27 蛋白質を作成法を確立する。

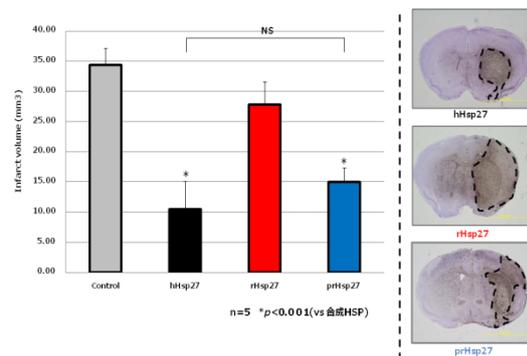
4. 研究成果

大腸菌に過剰発現させ精製した脱リン酸化 HSP27 は脳保護活性が低いため大腸菌より合成した HSP27 蛋白質をリン酸化酵素でリン酸化修飾し、虚血モデルにおいて脳保護効果のある活性型リン酸化 HSP27 蛋白質の合成した。合成 HSP27 を MAPK-activated protein kinase-2 で *in vitro* でリン酸化した。HSP27 Ser15, 78, 82 がリン酸化された。マウス 1 時間一過性脳虚血再還流モデルに再還流 1 時間後投与にて牛血清アルブミンを投与した対照群に比し脳梗塞巣が 52% に抑制された。このことより大腸菌で大量生産した合成 HSP27 蛋白質を *in vitro* でリン酸化することにより汎用性のあるリン酸化 HSP27 が大量合成可能であることが分かった。

合成HSP27のMK2によるリン酸化



リン酸化合成HSP27は虚血巣を縮小させる



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 8 件)

- ① Teramoto S, Shimura H, Tanaka R, Shimada Y, Miyamoto N, Arai H, Urabe T, Tanaka S, Hattori N. Human-derived physiological heat shock protein 27 complex protects brain after focal cerebral ischemia in mice. PLOS ONE in press 査読有
- ② Shimura H, Tanaka R, Urabe T, Tanaka S, Hattori N. Art and Parkinson's disease: a dramatic change in an artist's style as an initial symptom. J Neurol. 2012 May; 259(5):879-81. doi: 10.1007/s00415-011-6271-y. 査読有
- ③ Nagayama H, Kubo S, Hatano T, Hamada S, Maeda T, Hasegawa T, Kadowaki T, Terashi H, Yoshioka M, Nomoto N, Kano O, Inoue M, Shimura H, Takahashi T, Uchiyama T, Watanabe H, Kaneko S, Takahashi T, Baba Y; Young Japanese Expert Group for Parkinson's Disease and Movement Disorders: YJ-EXPANDS. Validity and reliability assessment of a Japanese version

of the Snaith-Hamilton pleasure scale. Intern Med. 2012;51(8):865-9. <http://dx.doi.org/10.2169/internalmedicine.51.671> 査読有

④ Kambe T, Shimura H, Ueno Y, Nishioka K, Tanaka R, Hattori N, Urabe T. Vivid Visual Hallucinations Manifested as the Initial Symptom in a Patient with Neurosyphilis. Psychosomatics. 2012 Sep 27. doi:pii: S0033-3182(12)00122-3.

⑤ Yamashiro K, Tanaka R, Nishioka K, Ueno Y, Shimura H, Okuma Y, Hattori N, Urabe T. Cerebral infarcts associated with adenomyosis among middle-aged women. J Stroke Cerebrovasc Dis. 2012 Nov;21(8):910. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2011.10.017. 査読有

⑥ Tanaka R, Shimada Y, Shimura H, Oizumi H, Hattori N, Tanaka S. Predominant vasogenic edema in a patient with fatal cerebral air embolism. J Stroke Cerebrovasc Dis. 2012 Aug;21(6):509-11. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2010.11.006. 査読有

⑦ Tanaka R, Kawanabe T, Yamauchi Y, Shimura H, Tanaka Y, Miyamoto N, Ueno Y, Urabe T, Hattori N, Tanaka S. Economy class stroke syndrome after a long drive. J Stroke Cerebrovasc Dis. 2012 Feb;21(2):155-7. doi:

10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2010.06.005. 査読有

⑧ Shimura H, Mizno Y, Hattori N. Parkin and Parkinson disease. Clin Chem. 2012 Aug;58(8):1260-1. doi: 10.1373/clinchem.2012.187054. 査読有 [学会発表] (計5件)

第38回日本脳卒中学会総会 2013年3月16日-18日

HSP27による脳梗塞モデルマウスにおける脳保護効果

1 順天堂大学医学部附属浦安病院 脳神経内科、2 順天堂大学 医学部 脳神経内科、3 順天堂大学 医学部 脳神経外科

志村 秀樹 1、寺本 紳一郎 3、田中 亮太 2、島田 佳昭 2、宮元 伸和 2、新井 一 1、卜部 貴夫 3、服部 信孝 2

脳保護効果を有する合成 HSP27 の開発について

1 順天堂大学医学部附属順天堂医院、2 順天堂浦安病院

島田 佳明 1、志村 秀樹 2、田中 亮太 1、寺本 紳一郎 1、新井 一 1、卜部 貴夫 2、服部 信孝 1

HSP27による脳保護効果のメカニズムに関する検討

1 順天堂大学 医学部 脳神経内科、2 順天堂大学医学部附属 浦安病院 脳神経内科、3 順天堂大学 医学部 脳神経外科

田中 亮太 1、志村 秀樹 2、寺本 紳一郎 3、島田 佳明 1、新井 一 3、卜部 貴夫 2、服部 信孝 1

ラット慢性脳虚血モデルにおける
L-carnitine の軸索可塑性の保護
1 順天堂大学医学部附属浦安病院
脳神経内科、2 順天堂大学 脳神経内
科

上野 祐司 1、志村 秀樹 1、服部
信孝 1, 2、卜部 貴夫 1

急性期脳梗塞患者におけるリバーロ
キサバン初期使用経験
順天堂大学医学部附属浦安病院脳神
経内科

渡邊 雅男、上野 祐司、田中 康
貴、志村 秀樹、中村 範行、卜部
貴夫

6. 研究組織

(1) 研究代表者

志村 秀樹 (SHIMURA HIDEKI)
順天堂大学医学部・准教授
研究者番号：50286746

(2) 研究分担者

田中 亮太 (TANAKA RYOTA)
順天堂大学医学部・准教授
研究者番号：40407284

(3) 連携研究者

服部 信考 (HATTORI NOBUTAKA)
順天堂大学医学部・教授
研究者番号：80218510

卜部 貴夫 (URABE TAKAO)
順天堂大学医学部・教授
研究者番号：60291663

