

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430053

研究課題名(和文) HSP27による新規脳保護療法の臨床実用化に向けた研究

研究課題名(英文) Phosphorylated recombinant HSP27 as a new neuroprotective agent for acute ischemic stroke

研究代表者

田中 亮太 (TANAKA, RYOTA)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：40407284

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：活性化型合成HSP27による脳梗塞急性期の脳保護効果を解析した。マウスの脳梗塞急性期モデルにおける活性化型合成HSP27の経静脈的投与は、24時間後の脳梗塞の体積を有意に縮小し、脳梗塞後の運動障害を有意に軽減させた。血栓溶解剤であるtPA併用時の脳梗塞においても、活性化型合成HSP27の投与は出血性梗塞を減少させ、血液脳関門の破綻を有意に抑制した。活性化型合成HSP27は脳梗塞急性期における酸化ストレス、炎症反応、アポトーシス、血管内皮障害などを抑制し、強力な脳保護効果を示した。活性化型合成HSP27は脳梗塞急性期の新たな脳保護薬として有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We studied the effect of activated (phosphorylated) recombinant HSP27 (prHSP27) as a new neuroprotective agent for acute ischemic stroke. Intravenous administration of prHSP27 resulted in the significant reduction of infarct volume and the improvement of neurological deficit than control in mice 24 hours after transient focal ischemia. When the thrombolytic agent tissue plasminogen activator (tPA) was co-administered, prHSP27 also attenuated the blood-brain barrier disruption significantly and the hemorrhagic transformation than control. Intravenous administration of prHSP27 could reduce the excessive oxidative stress, inflammation, apoptosis and neurovascular injury after focal cerebral ischemia. Activated recombinant HSP27 is useful as a new neuroprotective agent for acute stage of ischemic stroke.

研究分野：神経内科学

キーワード：HSP27 リン酸化 脳梗塞急性期 脳保護療法 tPA 血管内皮保護

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞急性期の治療は、発症 4.5 時間以内の経静脈的血栓溶解療法を主体としており、いかに早期に治療を開始することで患者の予後を改善できる。しかし実臨床においては脳梗塞全体のうち実際に血栓溶解療法を受けている患者は全体の 5%程度に過ぎない。その一方で脳梗塞に対する脳保護療法の期待は大きく、脳梗塞患者の予後を改善するだけでなく、血栓溶解療法の therapeutic time window を拡大する可能性がある。これまで様々な脳保護薬の開発が試みられてきたが、臨床に応用されているものはラジカルスカベンジャーのエダラポンのみであり、治療効果は十分とは言い難い。我々は多機能細胞保護効果を有する small heat shock protein HSP27 に注目し、研究を推進してきた(1)。HSP27 は分子シャペロンとしての機能以外に、抗酸化作用、抗アポトーシス作用、抗炎症作用など多機能細胞保護作用が報告されている(2)。これらの事実から HSP27 が脳梗塞急性期においても脳保護薬として有効性が高い可能性を考え実験を推進してきた。実際にマウス脳梗塞急性期モデルにヒトリンパ球から抽出した HSP27 (hHSP27) を静脈内投与すると、24 時間後の脳梗塞体積が有意に縮小し、神経機能障害を改善することを明らかにし報告してきた(3)。このようにヒトリンパ球から抽出した HSP27 はリン酸化修飾を受けており、強力な脳保護効果を発揮することが可能で臨床応用が期待される。しかしこれまでの抽出方法では大量安定供給が困難であり、現実的ではない。そのため HSP27 蛋白を用いた脳梗塞急性期の治療戦略には安定供給可能で、ヒト由来の HSP27 と同様の脳保護効果を持つ合成 HSP27 の開発が必要であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は多機能脳保護効果を持つ活性型合成 HSP27 の精製法を確立し、脳梗塞急性期に対する脳保護効果を検証することである。また活性型合成 HSP27 の脳保護作用の機序を明らかにし、最適な投与方法を確立していくことである。さらに tPA による血栓溶解療法時は出血性梗塞や梗塞内血腫の合併が症状悪化の大きな要因となっている。この tPA 併用時の脳梗塞における HSP27 併用のメリット、特に出血性変化の抑制や血液脳関門 (BBB) 障害に対する保護効果について解析し、活性型合成 HSP27 を用いた脳梗塞急性期の治療戦略を構築していくことを研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) 活性型合成 HSP27 の精製と脳梗塞急性期に対する脳保護効果に関する解析

ヒトリンパ球由来 HSP27 の強力な脳保護効果はリン酸化修飾を受けた活性型 HSP27 に由来すると推測されている。我々はリン酸化酵素である MAPKAP kinase 2 を用い大腸菌由来合成 HSP27 蛋白をリン酸化修飾し、活

性型合成 HSP27 (prHSP27) を精製。急性期脳梗塞モデル動物として、C57BL/6 (male, 8 weeks old, 20-23g) を吸入麻酔 (イソフルレン) 下に、一過性中大脳動脈閉塞再灌流モデルを作製 (1 時間虚血再灌流モデル)。梗塞 24 時間後に神経学的機能障害の程度を評価し、深麻酔下に脳を摘出し脳梗塞体積を解析。コントロールとして BSA 投与 (BSA 群)、ポジティブコントロールとしてヒト由来 HSP27 (hHSP27 群) を、その他非リン酸化合成 HSP27 (rHSP27)、リン酸化合成 HSP27 (prHSP27)、また hHSP27 と複合体を形成する HSP20、B crystalline を経静脈的に投与した群に分け、脳保護効果を確認する。また静脈投与された HSP27 の脳内分を解析するために、FITC でラベルした prHSP27 を作成し、同様の方法で投与。蛍光染色を用いて解析する。またアポトーシス、酸化ストレス、炎症性細胞浸潤などの影響に関して免疫組織染色にて定量的に評価。

(2) 血栓溶解剤 (tPA) 併用時の活性型合成 HSP27 の血液脳関門保護効果に関する解析

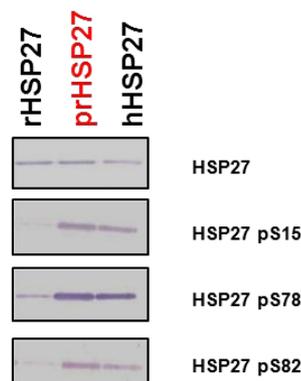
実験 (1) と同様に C57BL/6 の局所虚血再灌流モデルを用い、tPA 投与と prHSP27 の併用による脳保護効果、出血性合併症の差異について解析。梗塞 15 分前にブドウ糖を投与し高血糖状態を誘導。虚血再灌流と同時に tPA (10mg/kg) を経静脈的に投与。tPA の投与と同時にリン酸化合成 HSP27 (prHSP27) 投与し保護効果を解析する。対照として prHSP27 非投与群、BSA 投与群、prHSP27 単独投与群を作成し、各群における梗塞巣、出血性梗塞、血液脳関門 (BBB) の障害、MMP-9 蛋白の変化、死亡率などを解析。

4. 研究成果

(1) 活性型合成 HSP27 の精製と脳梗塞急性期に対する脳保護効果に関する解析

活性型合成 HSP27 (prHSP27) の作成

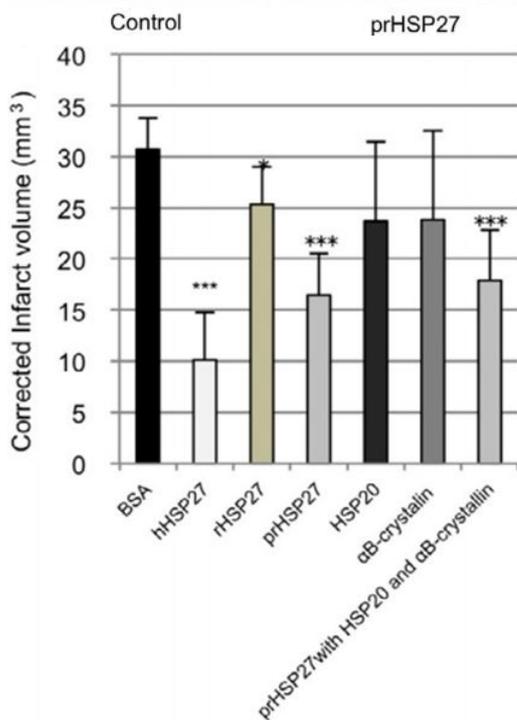
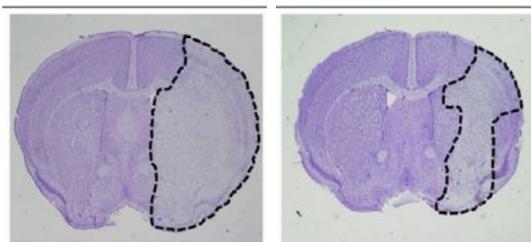
HSP27 のリン酸化酵素である MAPKAP kinase 2 を用い、invitro で合成 HSP27 をリン酸化修飾。prHSP27 はヒトリンパ球由来 HSP27 (hHSP27) と同様に 3 か所のリン酸化 site でリン酸化されており、多数の small oligomer を形成していることを immunoblot 法で確認した (図)。



経静脈投与された HSP27 の脳内局在
 マウス脳梗塞モデル後に経静脈的に投与された HSP27 の脳内局在を確認するために、FITC でラベルした prHSP27 (FITC-prHSP27) を経静脈的に投与した。FITC でラベルされた prHSP27 は NeuN 陽性ニューロンの細胞質内に確認された。この結果は経静脈投与された prHSP27 が BBB を通過し、最終的に神経細胞に取り込まれていると判断した。

prHSP27 の脳梗塞縮小効果と神経障害機能改善効果

活性型合成 HSP27 (prHSP27) の急性期脳梗塞に対する脳保護効果を検討した。梗塞巣は Cresyl Violet 染色法を用い、染色されない領域を梗塞巣として計測。BSA を経静脈的に投与したコントロール群に比し、hHSP27 群、prHSP27 群、prHSP27+HSP20+ B-crystallin 群では有意に梗塞巣の体積を減少させることを確認できた (図、グラフ)。



活性化させていない合成 HSP27 においても軽度梗塞巣縮小効果を認めたと、hHSP27 群、prHSP27 群、prHSP27+HSP20+ B-crystallin 群程有意なものではなかった。そしてヒト由来 HSP27 で複合体を形成している HSP20 や B-crystallin などと同時に投与しても更なる脳保護効果は得られなかった。これは活性型合成 HSP27 単独で十分な脳保護効果が得られることを意味している。梗塞 24 時間後の

神経学的機能障害の程度を Neurological deficit score や Neurological severity score を用いて評価したところ、hHSP27 群、prHSP27 群、prHSP27+HSP20+ B-crystallin 群で有意に神経障害が軽減されていることを確認した。これらのことからマウスの脳梗塞急性期において prHSP27 は hHSP27 と同様に脳保護効果を発揮し、脳梗塞急性期の機能予後を改善できることを確認できた。

prHSP27 の細胞保護効果について

各治療群の脳切片を作成し、それぞれの治療効果を免疫組織学的に評価した。合成 HSP27 投与群 (rHSP27 群) に比して、hHSP27 群、prHSP27 群では梗塞部の TUNEL 陽性細胞が有意に減少しており、またアポトーシス蛋白 (cleaved Caspase-3) 陽性細胞、酸化ストレスマーカー (8-OHdG) 陽性細胞、炎症性グリア細胞として iba-1 陽性マイクログリアの有意な減少が同様に確認できた。これらの結果から prHSP27 が hHSP27 と同様に梗塞後の様々な脳梗塞急性期の細胞障害応答のカスケードをブロックし、脳保護効果を発揮していることを確認した。

これらの結果から活性型合成 HSP27 はヒト由来 HSP27 と同様に急性期脳梗塞の体積を有意に減少させ、また神経機能障害を有意に軽減することが確認できた。

(2) 血栓溶解剤 (tPA) 併用時の活性合成 HSP27 の血液脳関門保護効果に関する解析

血栓溶解剤併用脳梗塞モデル作成

C57BL/6 マウスの局所虚血再灌流モデルを用い解析。梗塞 15 分前に 50%ブドウ糖を投与し、高血糖状態を誘導。1 時間の虚血再灌流後、tPA (10mg/kg) を投与。同時に prHSP27 を投与し (tPA+prHSP27 群)、非投与群 (tPA 群) との保護効果を比較解析した。コントロールとして BSA 投与群 (BSA 群)、prHSP27 単独投与群 (prHSP27 群) を用い、同様に比較検討を行った。

梗塞後の機能障害と生存率

Neurological severity score を用いた神経機能障害の程度は tPA 群に比して、prHSP27 群、tPA+prHSP27 群で有意に神経機能障害が軽減していた。また 24 時間後の生存率は BSA 群に比較して tPA 群で生存率が減少していたが、tPA+prHSP27 群では生存率が改善し、BSA 群よりも良好な経過をとっていた。

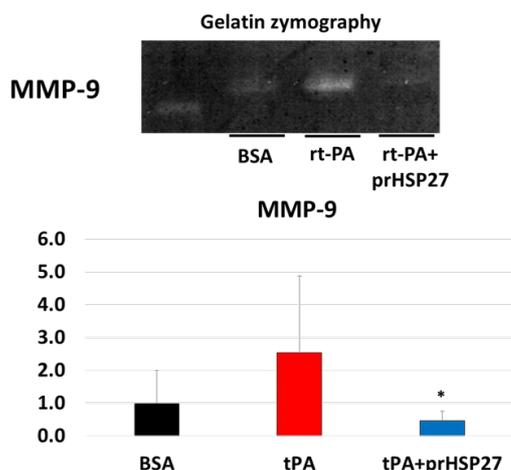
tPA 治療併用時脳梗塞後の出血性変化についての解析

脳梗塞 24 時間後の出血性変化を 2,3,5-トリフェニル塩化 (TTC) 染色を用いて確認した。同染色で正常組織は赤く染色されるが、梗塞巣は染色されないため、梗塞内に出血性変化が出現すると明瞭に描出される。梗塞巣の出血性変化を過去に報告された grade に基づいて 4 段階で評価した。統計学的な有意性は見いだせなかったが、出血性変化は tPA 群に比して tPA+prHSP27 群では出血性変化が軽減されていた。

tPA 併用時の血液脳関門 (BBB) の障

害と prHSP27 の血管保護効果

BBB 障害の程度を評価するため、血清 IgG の漏出の程度を IgG に対する抗体を用いて免疫組織学的に評価した。血清 IgG 陽性の領域は tPA 群に比し prHSP27 群、tPA+prHSP27 群で有意に抑制されていることが確認できた。さらに内皮障害の促進因子である細胞外マトリックス分解酵素 (MMP-9) を gelatin zymography を用いて測定したところ、tPA 群に比し、tPA+prHSP27 群では有意に抑制していることが確認された (図)。



このことは tPA 併用時の血管保護効果は MMP-9 の発現を抑制を介した反応であることを示唆している。また BBB の tight junction protein である Occludin 蛋白の梗塞巣内での発現をウエスタンブロット法で解析したところ、tPA 群に比し tPA+prHSP27 群で有意に Occludin 蛋白が保たれており、tPA 投与に伴う BBB 障害を prHSP27 が保護していることを確認できた。さらに電子顕微鏡による BBB の構造的障害の程度を評価を行った。tPA 投与群では血管内皮の菲薄化が強く、アストロサイトとの接着が強く障害されていた。一方で rPA+prHSP27 群では血管内皮細胞やアストロサイトの構造が対照群と同程度保たれていることを確認できた。

これらの結果から、活性型合成 HSP27 は脳梗塞急性期の脳保護薬として有効であることを確認できた。さらに脳梗塞急性期の tPA 併用療法における出血性合併症の抑制、BBB の保護効果が確認され、機能障害の軽減、死亡率の低下に重要な役割を果たすことが明らかになった。

<引用文献>

Shimura H, Miura-Shimura Y, Kosik KS. Binding of tau to heat shock protein 27 leads to decreased concentration of hyperphosphorylated tau and enhanced cell survival. *J Biol Chem.* 2004;279:17957-62
 Mymrikov EV, Seit-Nebi AS, Gusev NB. Large potentials of small heat shock proteins. *Physiol Rev* 2011;91:1123-59

Teramoto et al. Human-derived physiological heat shock protein 27 complex protects brain after focal cerebral ischemia in mice. *PLoS One.* 2013;8:e66001

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)

Shimada Y, Tanaka R, Shimura H, Yamashiro K, Urabe T, Hattori N. Phosphorylation enhances recombinant HSP27 neuroprotection against focal cerebral ischemia in mice. *Neuroscience* 2014;278:113-121.

doi:

10.1016/j.neuroscience.2014.07.073

[学会発表](計 5 件)

島田佳明、志村秀樹、田中亮太、寺本紳一郎、新井 一、服部信孝 脳保護効果を有する合成 HSP27 の開発について、第 25 回日本脳循環代謝学会総会、京王プラザ札幌、北海道、札幌

島田佳明、田中亮太、志村秀樹、卜部貴夫、服部信孝 脳保護効果を有する合成 HSP27 の開発について、第 26 回日本脳循環代謝学会総会、岡山コンベンションセンター、岡山県、岡山市

島田佳明、田中亮太、志村秀樹、卜部貴夫、服部信孝 脳保護効果を有する合成 HSP27 の開発について、第 40 回日本脳卒中学会総会、広島グリーンアリーナ、広島県、広島市

Ryota Tanaka, Yoshiaki Shimada, Hideki Shimura, Kazuo Yamashiro, Masao Koike, Yasuo Uchiyama, Takao Urabe, Nobutaka Hattori Phosphorylated HSP27 attenuate blood-brain barrier breakdown in stroke receiving intravenous tissue-plasminogen activator, *Brain and Brain PET* 2015, Canada, Vancouver

田中亮太、島田佳明、志村秀樹、山城一雄、卜部貴夫、服部信孝 Small Heat Shock Protein HSP27 を用いた急性期脳梗塞の新たな治療戦略、第 41 回日本脳卒中学会総会、ロイトン札幌、北海道、札幌市

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等；なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

服部 信孝 (HATTORI, Nobutaka)
順天堂大学・医学部・教授
研究者番号：80218510

(4) 研究協力者

島田 佳明 (SHIMADA, Yoshiaki)
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号：10761455