

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462149

研究課題名(和文)スタフィロキナーゼによる革新的脳塞栓症治療法の確立

研究課題名(英文)Establishment of cerebral embolic stroke treatment by Staphylokinase

研究代表者

嶋村 則人(Shimamura, Norihito)

弘前大学・医学研究科・講師

研究者番号：40312491

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：心原性脳塞栓症モデルに対するStaphylokinase (SAK)の経静脈的投与は400  $\mu$ g/kgでは、ヒト臨床投与量の組織プラスミノゲンアクチベーター(t-PA)600  $\mu$ g/kgと同程度の脳梗塞軽減作用があり、SAKはt-PAよりも呼吸器合併症が少なく死亡率も低かった。MMP-9抑制による血液脳関門温存が認められた。脳梗塞モデルに対する抗VEGF阻害剤の内頸動脈投与は用量依存性に脳浮腫を改善した。IP3KAやOccludin発現が抑制された。高容量SAKの経静脈投与は、t-PA静注療法に代わりうる脳塞栓症の治療手段であり、抗脳浮腫治療と併用することで、相乗効果が得られる。

研究成果の概要(英文)：Four hundred microgram per kg Staphylokinase (SAK) reduced cerebral infarction same as clinical dose of t-PA. The rate of respiratory trouble and mortality in SAK groups were significantly smaller than t-PA group. Reduction of MMP-9 and preservation of blood brain barrier were detected. And intra-arterial injection of VEGF antagonist significantly reduced cerebral infarction volume and preserve neural function. Reduction of IP3KA and Occludin were detected. High dose SAK is an alternative to t-PA in the treatment of embolic ischemic stroke. Combination therapy of SAK and VEGF antagonist achieved synergism in ischemic stroke treatment.

研究分野：脳梗塞

キーワード：Staphylokinase Cerebral infarction Embolic stroke

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞に対する組織プラスミノゲンアクチベーター(t-PA)静脈投与は、発症 4.5 時間に延長されたが、恩恵に与る症例は全脳虚血患者の 10%未満である。そこで、1. 出血リスクが低い 2. 血液脳関門を保持する 3. 神経毒性が無い 4. 投与可能治間が長いといった利点を持つ薬剤ならば、t-PA に代わりうる。

2. 研究の目的

プラスミノゲンアクチベーター活性を示す Staphylokinase (SAK) は 1948 年にプラスミノゲン活性化作用が発表され、1998 年に血栓溶解剤としての効用が報告された。その後、生物学的半減期を延長させ抗体発生を予防した Polyethylene glycol SAK が開発され、冠動脈閉塞に対しての臨床研究が成された。脳虚血実験においては SAK を用いた報告はこれまで無かった。

SAK の投与量や併用薬剤を調整し、t-PA よりも出血性梗塞が少なく、梗塞域減少、脳浮腫軽減、神経機能温存をもたらす治療法を追究する。ヒト脳塞栓症に対する t-PA 療法は発症後 4.5 時間まで可能となり、治療対象症例が増加した。しかし、脳虚血時間が長くなり血液脳関門破壊に起因した出血性合併症や脳浮腫により致死的となる事がある。本研究を遂行することで、t-PA 療法の問題点が解決され、脳梗塞治療の新たな展開が達成されると思われる。

3. 研究の方法

SD 雄ラットの左大腿動脈から血液を採取し、動脈血血栓を作成する。左外頸動脈断端から内頸動脈へ向けて 24 ゲージの留置針を挿入し、7.2 mm<sup>3</sup>の血栓を挿入。内頸動脈、中大脳動脈、後大脳動脈が血栓により閉塞され、広範な脳塞栓症が完成される (Shimamura N et al: Transl Stroke Res. 4, 564-570 (2013))。薬剤は梗塞作成後 30 分で大腿静脈経由で投与し、24 時間の生存の後に、以下の手法にて評価を行う。なお、SAK 治療群、t-PA (600 μg/kg)、コントロール群、Sham 群を作成する。

SAK 治療に加えて VEGF 阻害剤または抗酸化剤を併用し、出血性梗塞減少、脳浮腫軽減の有無を検討する。これらの効果が、血液脳関門温存に起因し、Neurovascular unit が保護されることを解明する。

① 神経学的所見：定量的神経学評価 (Shimamura N et al: J Neurosci Methods 2006;156:161-5)

② 脳梗塞体積評価：大脳を 2mm 厚に切断し、2,3,5-triphenyltetrazolium chloride monohydrate 染色

③ 血液脳関門と脳浮腫評価：Evans Blue 脳内分布量、IgG 染色および乾燥法による脳内水分量計測

④ 組織学的検討：Hematoxyline-Eosin 染色お

よび Nissle 染色による細胞形態の評価

⑤ 細胞内シグナル変化の究明：PKC, PKB, MAPK, Akt, NOS, Rho などの神経損傷に関わるシグナルの検討、及び VEGF, Occludin, Claudin などの血液脳関門保持に関する免疫染色、PCR および Western Blotting を行う。

4. 研究成果

ラット心原性脳塞栓症モデルに対する Staphylokinase (SAK) の経静脈的投与は 400 μg/kg では、ヒト臨床投与量の組織プラスミノゲンアクチベーター (t-PA) 600 μg/kg と同程度の脳梗塞軽減作用があり、SAK は t-PA よりも呼吸器合併症が少なく死亡率も低かった。作用機序として MMP-9 抑制による、血液脳関門温存が認められた。

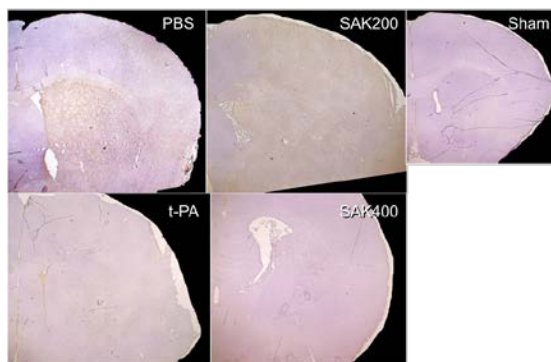


図 1. IgG 染色による血液脳関門評価

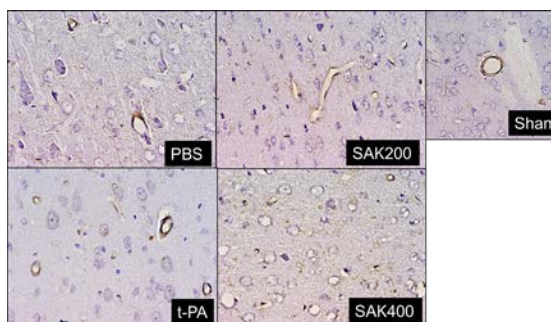


図 2. MMP-9 発現

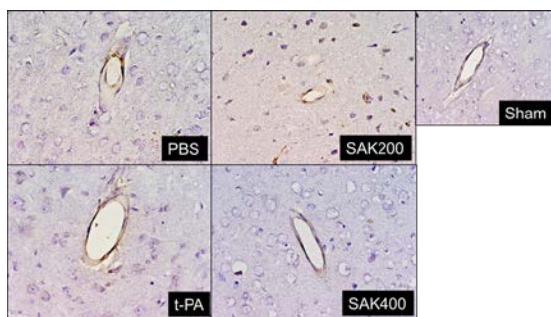


図 3. LRP-1 発現

また、ラット中大脳動脈一過性閉塞モデルに対する抗 VEGF 阻害剤の内頸動脈直接投与は用量依存性に脳浮腫を改善した。IP3KA 発現抑制や Occludin 発現抑制が作用機序であった。

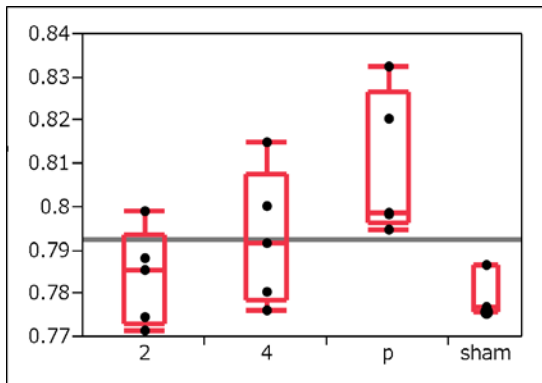


図 4. 抗 VEGF 剤による脳浮腫評価

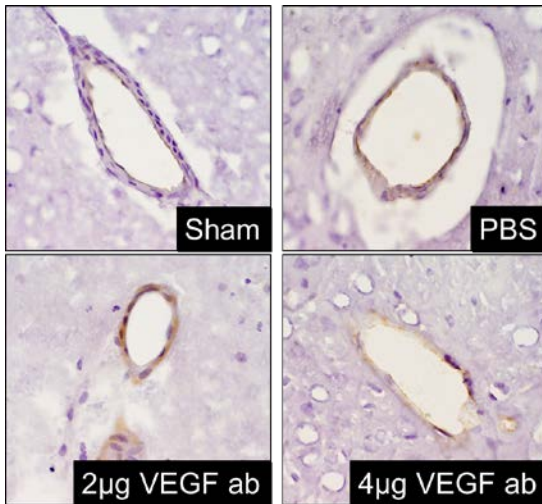


図 5. 血管内皮 IP3KA 発現

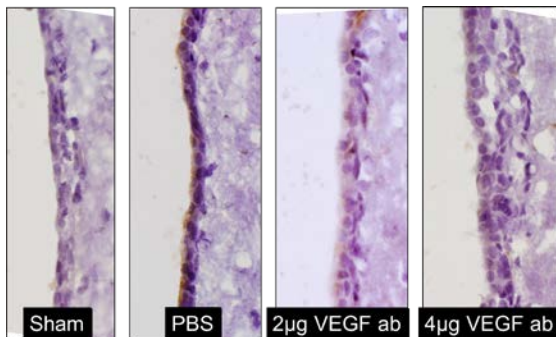


図 6. 脳室上衣における Occludin 発現

以上から、高容量 SAK の経静脈投与は、t-PA 静注療法に代わりうる脳塞栓症の治療手段であり、抗脳浮腫治療と併用することで、相乗効果が望まれると推測された。

#### 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 8 件)

① Shimamura N., Matsuda N., Katayama K., Kakuta K., Katagai T., Naraoka M., Ohkuma H. Stem cell therapies for intracerebral hemorrhages. *Current Drug Delivery* 3: DOI: 10.2174/1567201813666160922115830. (in print) 査読有

② Shimamura N., Kakuta K., Wang L., Naraoka M., Uchida H., Wakao S., Dezawa M., Ohkuma H. Neuro-regeneration therapy using human Muse cells is highly effective in a mouse intracerebral hemorrhage model. *Exp Brain Res.* 235, 565-572 (2017) 査読有

③ Shimamura N., Naraoka M., Katagai T., Katayama K., Kakuta K., Matsuda N., Ohkuma H. Analysis of factors that influence long-term independent living for elderly subarachnoid hemorrhage patients. *World Neurosurg.* 90, 504-510 (2016) 査読有

④ Shimamura N., Matsuda N., Ogasawara Y., Oyama K., Ohkuma H. Neutralizing VEGF via the internal carotid artery reduces brain edema and improve neurological function in rat transient MCAO model. *Cerebrovasc Dis.* 39 Suppl 2, 275 (2015) 査読有

⑤ Shimamura N., Kakuta K., Katayama K., Naraoka M., Ohkuma H. Staphylokinase ameliorate embolic cerebral infarction in the rat model. *Cerebrovasc Dis.* 39 Suppl 2, 273 (2015) 査読有

⑥ Shimamura N., Matsuda N., Satou J., Nakano T., Ohkuma H. Early ambulation produces favorable outcome and non-demential state in aneurysmal subarachnoid hemorrhage patients over 70 years of age. *World Neurosurg.* 81: 330-334 (2014) 査読有

⑦ Shimamura N., Naraoka M., Matsuda N., Kakuta K., Ohkuma H. Prophylactic intra-arterial injection of vasodilator for asymptomatic vasospasm converts the patient to symptomatic vasospasm due to severe microcirculatory imbalance. *Biomed Res Int.* 2014, 382484 (2014) 査読有

⑧ Shimamura N., Ohkuma H. Phenotypic transformation of smooth muscle in vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Transl Stroke Res.* 5, 357-364 (2014) 査読有

[学会発表] (計 6 件)

① Shimamura N., Matsuda N., Ogasawara Y., Oyama K., Ohkuma H. Neutralizing VEGF via the internal carotid artery reduces brain edema and improve neurological function in rat transient MCAO model. 3rd International Conference on Heart and Brain (2016)

②Shimamura N., Kakuta K., Katayama K., Matsuda N., Ogasawara Y., Oyama K., Ohkuma H. Staphylokinase ameliorate embolic cerebral infarction in the rat model 3rd International Conference on Heart and Brain (2016)

③ Shimamura N., Kakuta K., Uchida H., Wakao S., Dezawa M., Hiroki Okuma. Neuro-regeneration therapy for mice ICH model with Multilineage-differentiateing Stress Enduring cell. 2016 American Association of Neurological Surgeons Annual Scientific Meeting (2016)

④ Shimamura N., Naraoka M., Katayama K., Matsuda N., Oyama K., Ogasawara Y., Suzuki S., Ohkuma H. Clinical management protocol influences the incidence of symptomatic vasospasm. The 13th International Conference on Neurovascular Events after Subarachnoid Hemorrhage (2015)

⑤ Shimamura N., Matsuda N., Ogasawara Y., Ohkuma H. Neutralizing VEGF via the internal carotid artery reduces brain edema and improve neurological function in rat transient MCAO model. 24th European Stroke Conference (2015)

⑥ Shimamura N., Kakuta K., Katayama K., Naraoka M., Ohkuma H. Staphylokinase ameliorate embolic cerebral infarction in the rat model. 24th European Stroke Conference (2015)

〔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  
<http://www.med.hirosaki-u.ac.jp/~neuros/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
嶋村 則人 (SHIMAMURA Norihito)  
弘前大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号：40312491

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号：

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：

(4) 研究協力者  
( )