

フォン・ビレブランド因子 (von Willebrand factor; VWF) 切断酵素を用いた新規脳血管性認知症治療薬の開発

認知症予防・治療薬開発チーム (課題番号: 117024)

研究期間: 平成 23 年 7 月 22 日～平成 26 年 3 月 31 日

研究代表者: 三島健一 研究員: 岩崎克典

研究成果の概要

脳梗塞の後遺症による要介護者は増加の一途をたどり、大きな社会問題となっている。現在の脳梗塞治療薬は血栓溶解剤の t-PA のみである。しかし、t-PA は脳梗塞発症から 3～4.5 時間以内に投与しなければ脳出血を誘発するリスクを高めてしまうため、使用できる患者はわずかしかない。そこで、我々は止血血栓を維持した状態で、病的血栓を溶解する生理作用を持つ酵素で、血液凝固制御因子の ADAMTS13 に注目した。ADAMTS13 はその特徴的な血栓溶解様式により、脳梗塞発症から長時間経過した場合においても、脳出血の誘発なしに脳保護効果を示すことから、脳出血のリスクが少ない新たな血栓溶解剤となりうることを見出した。

Tissue plasminogen activator (t-PA) sometimes causes hemorrhagic complications in ischemic stroke. ADAMTS13, vWF-cleaving protease, maintains a physiologic balance between hemostasis and thrombolysis via regulation of vWF function. However, the pathophysiological role of ADAMTS13 in cerebral ischemia has not been investigated. In this study, we used ADAMTS13 knockout (KO) and Wild type (WT) mice subjected to 30 min of middle cerebral artery occlusion (MCAO). Infarct volume and plasma HMGB1, inflammatory cytokine, was significantly increased at 24 hours after the reperfusion in KO mice. Further, ADAMTS13 protein significantly reduced the infarct volume without hemorrhagic complications using a 4hr-MCAO in WT mice. But, t-PA caused massive bleeding. These results indicate that ADAMTS13 would become a new therapeutic approach for ischemic stroke by regulating blood flow and inflammation without hemorrhagic complications.

1. 研究背景

日本における脳卒中の総患者数（継続的に医療を受けている者を含む）は 134 万人であり、がんの総患者数 152 万人と比べても相当数の患者が脳卒中により、入院・通院をしている（厚生労働省平成 20 年「患者調査の概況」より）。そのため、脳卒中の大部分を占める脳梗塞に対する医療ニーズは高い。脳梗塞治療薬の組織プラスミノゲン活性化因子 (t-PA; tissue plasminogen activator) は予後も良好であるが、その強力な血栓溶解作用は、血管内皮細胞に損傷を与え、脳出血誘発のリスクを高めるため、脳梗塞全体の 20% 程度の患者のみに適用されているのが現状である。t-PA は、フィブリノーゲンを溶解することで、強力な血栓溶解作用を示す。一方、内因性生理活性物質の ADAMTS13 (a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 motifs 13、図 1) は、2001 年に同定され、血液凝固の trigger であるフォン・ビレブランド因子 (von Willebrand factor; VWF) をずり応力依存的に特異的に切断する新規メタロプロテアーゼである（図 2）。すなわち、血流に直接曝露されている血栓表面から徐々に血栓を削る作用を示す ADAMTS13 は、脳出血を伴わない脳梗塞の治療薬としての可能性が期待されるが、脳梗塞に対して ADAMTS13 を応用するための研究は十分ではない。

2. 研究目的

ADAMTS13 の K.O. マウスを用いた研究により、ADAMTS13 が、脳梗塞時に生理作用を発揮し、脳保護的に働くことを申請者は明らかにしている (Blood.

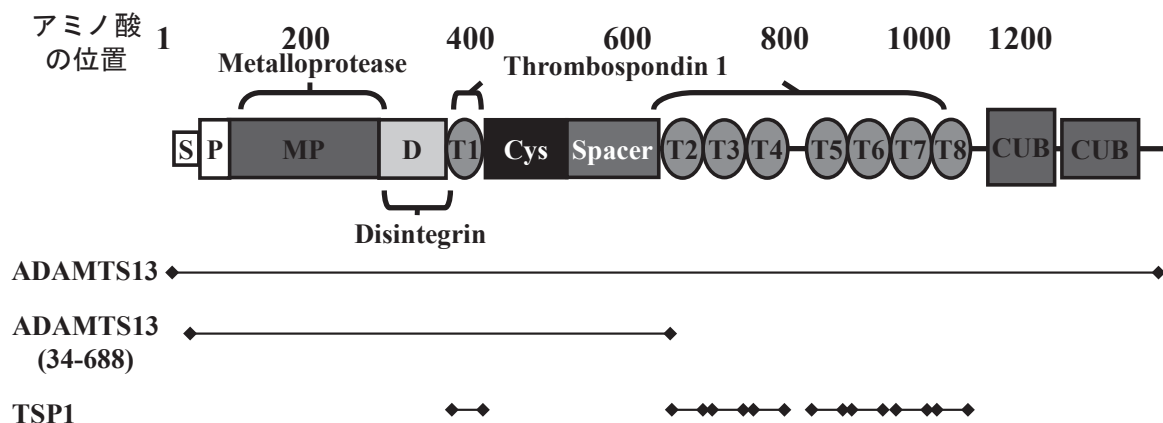


図1 ADAMTS13 の一次構造

115(8):1650-1653,2010)。そこで、ADAMTS13 を治療薬としてマウスに投与し、MCA 閉塞による脳損傷を抑制することを確認する。血液凝固の trigger である VWF を切断する ADAMTS13 が血栓溶解作用を示し、脳梗塞発症時において生理的役割を果たすことについては、ほとんど報告されていない。ADAMTS13 を脳梗塞治療薬として応用するためには、現在、最も効果が高いとされている t-PA と比較し、優位性を確認することは非常に重要である (図2)。また、申請者は、ADAMTS13 の欠

失が、脳梗塞後の炎症関連物質 high-mobility group box1 (HMGB1) を促進すること (*Neuropharmacology*. 55(8): 1280-1286, 2008, *Stroke*. 39(3):951-958, 2008) を見出し、VWF の切断による血栓溶解以外に抗炎症作用に関わる機序が期待されるため、この知見をもとに ADAMTS13 の新たな作用機序の解析を行う。これらの研究により、本研究の課題である脳梗塞治療への応用を目的とした ADAMTS13 の病態生理的役割を明らかにする。

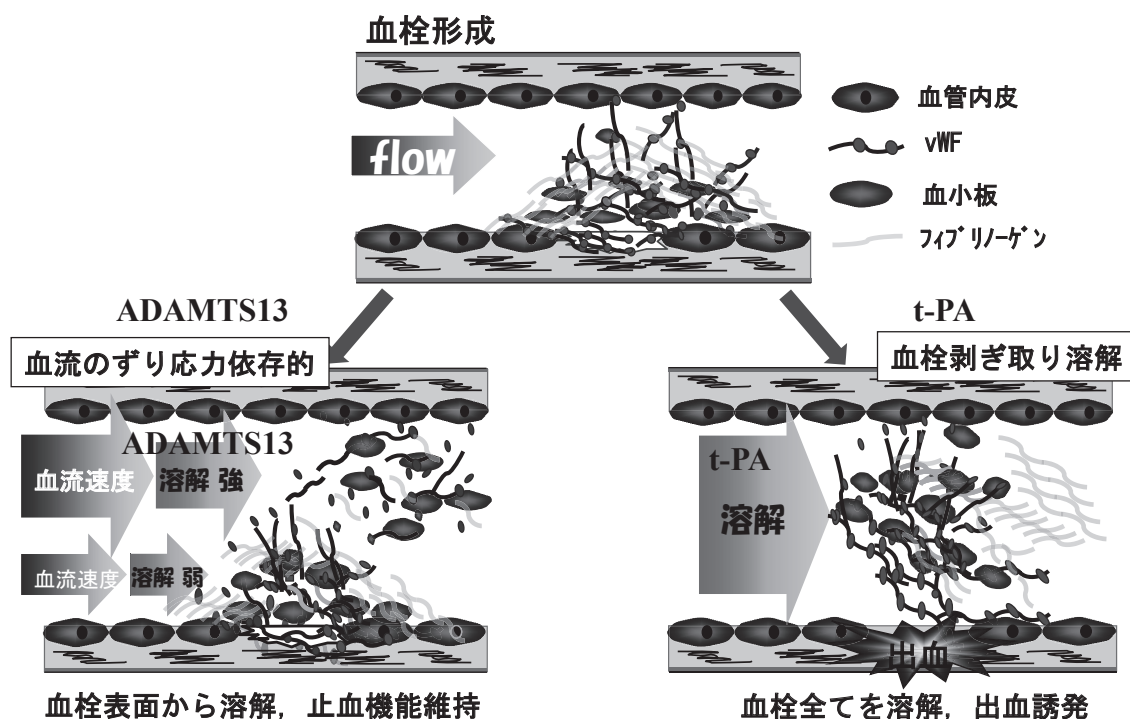


図2 血栓形成に対する ADAMTS13 の作用

3. 研究方法

(1) 脳梗塞時における生体内 ADAMTS13 の病態生理学的役割の解明

遺伝子改変した ADAMTS13KO (KO) マウスと、Wild Type (WT) マウスの中大脳動脈 (middle cerebral arterial: MCA) を 30 分間閉塞し、脳梗塞モデルマウスを作製した。このマウスの MCA 閉塞後 24 時間後の梗塞巣体積を TTC 染色により測定した。炎症性マーカーの HMGB1 抗体を用いて血漿中濃度を測定し、脳梗塞領域を免疫染色した。

(2) ADAMTS13 の脳梗塞治療効果

体重 25-30g の ddY 系雄性マウス (紀和実験動物研究所、和歌山) を用いてイソフルラン吸入により麻酔を行い手術台上に固定した。マウスの頸部中央を切開し、左側総頸動脈と外頸動脈を結紮した後、総頸動脈を切開し塞栓子が中大脳動脈 (MCA) の起始部に到達するように内頸動脈と外頸動脈の分岐部から内頸動脈を経由して 9mm 挿入した。再灌流は、塞栓子を手前に引くことにより行った。ADAMTS13 タンパクは、MCA 閉塞直

前に 0.01 ~ 0.5mg/kg と MCA 閉塞 4 時間直後に 0.01 ~ 0.1mg/kg を尾静注した。一方、t-PA は MCA 閉塞後 4 時間後に 10mg/kg を尾静注した。両薬物とも、その 20 時間後の梗塞巣体積を TTC 染色で評価し、出血量は Image J で測定した。

(3) ADAMTS13 による脳保護作用の本体の探索

ADAMTS13 (34-688) タンパク (0.1mg/kg) および Thrombospondin type 1 (Tsp-1, 1.0mg/kg) は、MCA 閉塞 4 時間直後に尾静注した。また、Tsp-1 は、MCA 閉塞直前、MCA 閉塞 4 時間直後、2 時間後、4 時間後に尾静注した。両薬物とも、翌日に梗塞巣体積を TTC 染色で評価し、出血量は Image J で測定した。

4. 研究成果

(1) 脳梗塞時における生体内 ADAMTS13 の病態生理学的役割の解明

MCA を 30min 閉塞した後、24 時間後の梗塞巣体積を比較したところ、KO マウスは梗塞巣の拡大が進行して

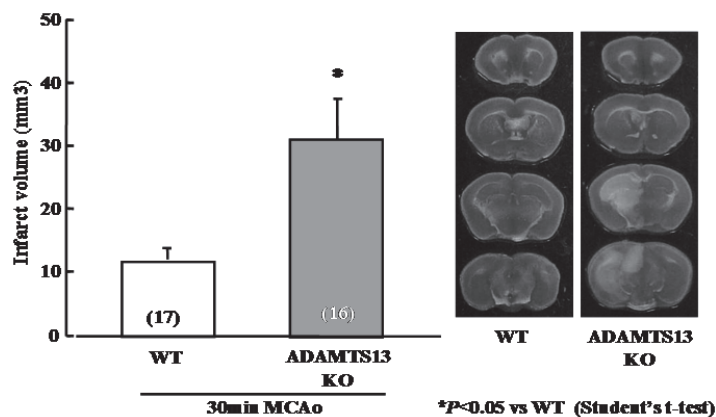


図3 ADAMTS13KO マウスにおける脳梗塞巣

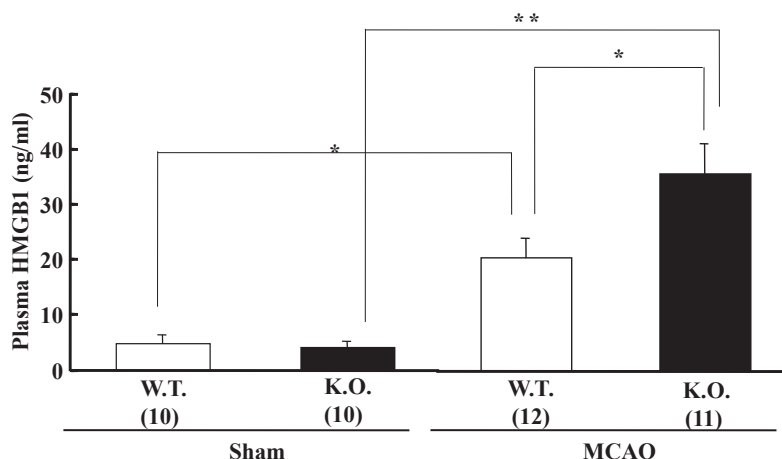


図4 ADAMTS13KO マウスの血漿中 HMGB1 濃度

いることが認められた (図 3)。血漿中の HMGB1 濃度は、WT マウスでは変化がなく、KO マウスで有意に増加した (図 4)。また、KO マウスの脳梗塞領域では、神経細胞が減少し、HMGB1 が濃染された。よって、ADAMTS13 が欠損した遺伝子改変マウスが、正常型マウスに比べて、脳梗塞による脳損傷に対し、脆弱であることを明らかにし、その原因のひとつに HMGB1 を介した炎症反応の増悪が関わっていることが分かった。

(2) ADAMTS13 の脳梗塞治療効果

MCA 閉塞から 4 時間後に t-PA を投与した群は、脳出血を誘発していた。これに対して、ADAMTS13 を投与した群では、t-PA 投与群のような脳出血の誘発はみられなかった。また、ADAMTS13 タンパクは、脳虚血の前投与 (0.1-0.5mg/kg, i.v.) および直後投与 (0.1mg/kg, i.v.) のいずれにおいても、4 時間の MCA 閉塞による脳梗塞体積を用量依存的に有意に減少させた。また、いずれの投与時間とも脳出血の増加は見られなかった。しかし、脳虚血後 2 時間後の投与では改善されなかった。

(3) ADAMTS13 による脳保護作用の本体の探索

ADAMTS13、ADAMTS13 (34-688) タンパク (0.1mg/kg, i.v.) および Tsp-1 (1.0mg/kg, i.v.) のいずれも MCA 閉塞直後の投与によって、4 時間の MCA 閉塞による脳梗塞体積に有意に減少させた。中でも、ADAMTS13 (34-688) タンパクが最も強力な改善作用を示した。さらに、Tsp-1 (1mg/kg, i.v.) は、脳虚血の前投与および 2 時間後投与のいずれにおいても、4 時間の MCA 閉塞による脳梗塞体積を有意に減少させた。しかし、脳虚血後 4 時間後の投与では改善されなかった。いずれも脳出血は見られなかった。

以上の結果から、脳梗塞時、生体内 ADAMTS13 は脳保護作用を示すことが明らかとなった。また、MCA 閉塞から 4 時間後の t-PA 投与は、すでに t-PA の治療可能時間を超えているために、大量の脳出血を誘発させた。t-PA に対して、ADAMTS13 はその特徴的な血栓溶解様式から、脳出血の誘発なしに治療効果を発揮したと考えられる。以上の経緯で、当初の命題であった「ADAMTS13 は、新規脳梗塞予防・治療薬となりうるか」について、「ADAMTS13 は、脳梗塞の予防・治療に有用である」との結果を得た。よって、ADAMTS13 は脳出血のリスクが少ない新たな血栓溶解剤となりうることを見出した。

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 13 件)

1. Muroi C, Fujioka M, Mishima K, Irie K, Fujimura Y, Nakano T, Fandino J, Keller E, Iwasaki K, Fujiwara M. Effect of ADAMTS-13 on cerebrovascular microthrombosis and neuronal injury after experimental subarachnoid hemorrhage. *J Thromb Haemost.* 12(4):505-14, 2014 (査読有)
2. Ishikane S, Hosoda H, Yamahara K, Akitake Y, Kyoungsook J, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M, Miyazato M, Kangawa K, Ikeda T. Allogeneic Transplantation of Fetal Membrane-Derived Mesenchymal Stem Cell Sheets Increases Neovascularization and Improves Cardiac Function after Myocardial Infarction in Rats. *Transplantation*, 96(8), 697-706, 2013 (査読有)
3. Muroi C, Hugelshofer M, Seule M, Tastan I, Fujioka M, Mishima K, Keller E. Correlation among systemic inflammatory parameter, occurrence of delayed neurological deficits, and outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*, 72(3):367-375, 2013 (査読有)
4. Matsuyama K, Ihsan N, Irie K, Mishima K, Okuyama T, Muto H. Bioimaging application of highly luminescent silica-coated ZnO-nanoparticle quantum dots with biotin. *J Colloid Interface Sci.*, 399:19-25, 2013 (査読有) .
5. Muroi C, Seule M, Mishima K, Keller E. Novel treatments for vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *Curr Opin Crit Care*, 18(2):119-126, 2012 (査読有) .
6. Morimoto N, Kita S, Shimazawa M, Namimatsu H, Tsuruma K, Hayakawa K, Mishima K, Egashira N, Iyoda T, Horie I, Gotoh Y, Iwasaki K, Fujiwara M, Matsuda T, Baba A, Komuro I, Horie K, Takeda J, Iwamoto T, Hara H. Preferential involvement of Na(+)/Ca(2+) exchanger type-1 in the brain damage caused by transient focal cerebral ischemia in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 429(3-4):186-190,2012 (査読有) .
7. Shindo T, Takasaki K, Uchida K, Onimura R, Kubota K, Uchida N, Irie K, Katsurabayashi S, Mishima K, Nishimura R, Fujiwara M, Iwasaki K. Ameliorative effects of telmisartan on the inflammatory response and impaired spatial memory in a rat model of Alzheimer's disease incorporating additional cerebrovascular disease factors. *Biol Pharm Bull.* 35(12):2141-7,2012 (査読有) .
8. Muroi C, Burkhardt JK, Hugelshofer M, Seule M, Mishima K, Keller E. Magnesium and the inflammatory response: potential pathophysiological implications in the management of patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage? *Magn Res.* 25(2):64-71,2012 (査読有)

9. Muroi C, Hugelshofer M, Seule M, Tastan I, Fujioka M, Mishima K, Keller E. Correlation between Systemic Inflammatory Parameter, Occurrence of Delayed Neurological Deficits and Outcome after Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage Neurosurgery. 72(3):367-375, 2012 (査読有)
10. Matsuyama K, Mishima K, Kato T, Irie K, Mishima K. Transparent polymeric hybrid film of ZnO nanoparticle quantum dots and PMMA with high luminescence and tunable emission color. J Colloid Interface Sci. 367(1):171-177, 2012 (査読有)
11. Fujioka M, Nakano T, Hayakawa K, Irie K, Akitake Y, Sakamoto Y, Mishima K*, Muroi C, Yonekawa Y, Banno F, Kokame K, Miyata T, Nishio K, Okuchi K, Iwasaki K, Fujiwara M, Siesjö BK. ADAMTS13 gene deletion enhances plasma high-mobility group box1 elevation and neuroinflammation in brain ischemia-reperfusion injury. Neuro Sci. 33(5):1107-1115, 2012 (査読有)
12. Takasaki K, Uchida K, Fujikawa R, Nogami A, Nakamura K, Kawasaki C, Yamaguchi K, Morita M, Morishita K, Kubota K, Katsurabayashi S, Mishima K, Fujiwara M, Iwasaki K. Neuroprotective effects of citidine-5-diphosphocholine on impaired spatial memory in a rat model of cerebrovascular dementia. J Pharmacol Sci. 116(2):232-7, 2011 (査読有)
13. Nogami A, Sakata Y, Uchida N, Yamaguchi K, Kawasaki C, Shindo T, Kubota K, Katsurabayashi S, Takasaki K, Mishima K, Nishimura R, Fujiwara M, Iwasaki K. Effects of yokukansan on anxiety-like behavior in a rat model of cerebrovascular dementia. J Nat Med. 65(2):275-281, 2011 (査読有)

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 大石悠加、入江圭一、中野貴文、檜崎友里、田中雅彬、佐藤朝光、二神幸次郎、三島健一、岩崎克典、脳梗塞における多機能サイトカインであるOncostatin M受容体の発現変化、第134回年会日本薬学会年会、2014年3月27～30日、熊本
2. 田中雅彬、入江圭一、中野貴文、窪田香織、桂林秀太郎、高崎浩太郎、二神幸次郎、三島健一、岩崎克典、脳虚血障害に対する血液凝固制御因子ADAMTS13の脳保護作用におけるtrombospondin 1の関与、第87回日本薬理学会年会、2013年3月19～21日、仙台
3. 中野貴文、田中雅彬、入江圭一、仲村佳彦、石倉宏恭、二神幸次郎、三島健一、岩崎克典、長時間脳虚血モデルマウスに対する血液凝固制御因子ADAMTS13の脳保護効果－新規血栓溶解薬への応用－第66回日本薬理学会西南部会、2013年11月16日、福岡
4. 宮澤秋子、坂元佑哉、入江圭一、三島健一、宮崎蓉

- 子、梅千恵、中村裕司、窪田香織、桂林秀太郎、高崎浩太郎、岩崎克典、藤原道弘、新生児低酸素性虚血性脳症モデルラットの脳損傷に対する内因性カンナビノイドを介したデキサメタゾンの脳保護作用、第133回年会日本薬学会年会、2013年3月27～30日、横浜
5. Fujioka M., Muroi C., Mishima K., Fujiwara M., Okuchi K., Siesjö B.K. ADAMTS13: A Novel Therapeutic Drug Candidate for Acute and for Delayed Brain Ischemia. 57th Annual Meeting of Thrombosis and Haemostasis Research. 2013.2.23. Munich, Germany.
6. 坂元佑哉、入江圭一、三島健一、秋武義治、宮澤秋子、梅千恵、中村裕司、窪田香織、桂林秀太郎、高崎浩太郎、岩崎克典、藤原道弘、新生児低酸素性虚血性脳症モデルラットにおけるドーパミン神経障害誘発性回転行動に対する脳血管新生病変形成の関与、第65回日本薬理学会西南部会、2012年11月23日、熊本
7. 藤岡政行、Muroi Carl、三島健一、藤村吉博、奥地一夫、藤原道弘、Siesjö Bo.、ADAMTS13:急性脳虚血に対する治療応用の可能性、第71回日本脳神経外科学会学術総会 2012年10月17日、大阪
8. Masayuki Fujioka, Kazuhide Hayakawa, Carl Muroi, Kei-ichi Irie, Kenichi Mishima, Yoshihiro Fujimura, Michihiro Fujiwara, Kazuo Okuchi, Bo K. Siesjö. ADAMTS13: A Novel Therapeutic Drug Candidate for Acute Ischemic Stroke. Asia Pacific Stroke Conference 2012. 2012.9.10, Tokyo, Japan
9. 古川 歩、入江圭一、三島健一、高崎浩太郎、桂林秀太郎、窪田香織、岩崎克典、藤原道弘、脳梗塞モデルマウスを用いたプログラニュリンの発現変化とミクログリアの活性化に関する研究、第89回日本生理学会大会、2012年3月30日、松本
10. 坂元佑哉、秋武義治、入江圭一、宮崎蓉子、梅千恵、中村裕司、窪田香織、桂林秀太郎、高崎浩太郎、三島健一、岩崎克典、藤原道弘、新生児低酸素性虚血性脳症モデルラットにおける脳損傷に対するドーパミン神経系の関与、第39回薬物活性シンポジウム、2011年11月21日、福岡

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称：血栓形成予防薬として利用される ADAMTS13 誘導剤

発明者：入江圭一、藤原道弘、岩崎克典、三島健一、中野貴文、片岡泰文、山内淳史、佐藤朝光、坂元佑哉、平松征洋、川崎圭祐

権利者：福岡大学

種類：特許

番号：特開 2013-056861

出願年月日：平成 23 年 9 月 9 日

国内外の別：国内

6. 謝辞

本研究の一部は、福岡大学研究推進部の研究経費によるものである（課題番号：117024）