

氏名（本籍）	高 木 俊 範（愛知県）
学位の種類	博 士（医学）
学位授与番号	甲第 958 号
学位授与日付	平成 26 年 9 月 10 日
学位授与要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Temporal activation of Nrf2 in the penumbra and Nrf2 activator-mediated neuroprotection in ischemia-reperfusion injury
審 査 委 員	（主査）教授 湊 口 信 也 （副査）教授 森 田 啓 之 教授 竹 村 博 文

論文内容の要旨

急性期脳梗塞に対する組織プラスミノゲンアクチベーターを用いた再灌流療法は、脳梗塞治療を激変させたが、その治療成績は未だ十分に満足のものではない。その原因の一つが、虚血よりも組織傷害の強い再灌流障害と考えられており、活性酸素産出による酸化ストレスが脳虚血再灌流障害（IRI）における組織障害および神経細胞死の主因と考えられている。

Keap1-Nrf2 系は生体の持つ最も重要かつ強力な抗酸化メカニズムであり、転写因子 Nrf2 は Keap1 との結合が外れることで活性化し、核内へ移行することで、その下流に存在する抗酸化物質の転写を促進して細胞を保護する。Bardoxylone methyl (BARD) は Nrf2 活性化剤として、米国では腎疾患を対象に臨床試験も開始されており、その臨床応用が期待される薬剤である。

本研究では、IRI における Nrf2 の発現を OKD (Keap1-dependent Oxidative stress Detector) マウスを用い、その発現部位、経時的变化について多角的に検討した。さらに Nrf2 活性化剤である BARD の虚血後投与による、Nrf2 の早期活性化ならびに神経保護作用について検討した。

【対象と方法】

OKD マウスは、ヒト Nrf2 の構造のうち、核内移行シグナル以降に Green Fluorescent Protein (OKD-venus) もしくは luciferase (OKD-LUC) を導入したトランスジェニックマウスである。8～12 週齢の雄性 OKD マウスを用い、栓子を用いた一過性の中大脳動脈閉塞（MCAO）により脳虚血再灌流障害を誘導した。IRI における Nrf2 の活性化の時間経過、発現部位を OKD-LUC マウスを用いたルシフェラーゼアッセイ、OKD-venus マウスを用いたウエスタンブロットおよび免疫染色法により評価した。また細胞レベルでの Nrf2 発現を同様に免疫組織学的に評価した。次に BARD 静脈内投与による神経保護効果の検討のため、Nrf2 早期活性化を OKD-LUC マウスを用いたルシフェラーゼアッセイにて評価した。OKD マウスはその構造上、核内移行シグナルが欠損していることから、以後は野生型マウスを用いて Nrf2 の活性化並びにその神経保護作用について検討を行った。BARD 投与による Nrf2 早期活性化をウエスタンブロットにて評価し、BARD 投与が脳梗塞体積および神経学的所見に与える影響を評価した。脳梗塞体積は、2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC) 染色による脳梗塞面積から計算した。神経学的評価は、運動機能、感覚機能を総合的に評価する Garcia スコアならびに前肢の機能を評価する Grid Walk 試験により評価した。

【結果】

OKD-LUC マウスを用いたルシフェラーゼアッセイでは、Nrf2 は IRI 早期には認められず、24 時間後にピークを迎え、48 時間後も活性化していた。TTC 染色により確定した梗塞巣周囲に Nrf2 が発現していた。OKD-venus マウスを用いたウエスタンブロットによる時間経過の検討においても Nrf2 活性化は 24 時間後にピークを迎え、Nrf2 の代表的下流因子である hemeoxygenase-1 (HO-1) の経時的変化も Nrf2 と同様であった。以上より、IRI 早期には Nrf2 は十分に活性化されていないと考えられた。免疫染色では Nrf2 活性化の多くはペナンプラ領域に認められ、細胞レベルでの検討では神経細胞およびアストロサイトに発現していた。次に OKD-LUC マウスを用いたルシフェラーゼアッセイにより、BARD 投与による Nrf2 の早期活性化を評価したところ、MCAO を行わなかった無処置群、IRI 群共に投与 1 時間後に有意な Nrf2 の活性化を認めた。投与 4 時間後には、両群でさらに活性化が上昇し、IRI 群では無処置群と比較して統計学的に有意に高い Nrf2 の活性化を認めた。

野生型マウスを用いた BARD 投与による Nrf2 および HO-1 の経時的評価では、Nrf2 は投与後 1 時間から活性化し、HO-1 は 4 時間後に発現上昇を認めた。脳梗塞体積は、BARD 0.6mg/kg、2.0mg/kg の両投与群において減少した。神経学的所見は、運動機能のみを評価する Grid Walk 試験では両投与量で改善を認めたが、総合的な評価である Garcia スコアは 2.0mg/kg 投与群のみで改善した。

【考察】

Nrf2 の活性化による神経保護についてはこれまでも報告されているが、本研究の虚血再灌流モデルにおいて内因性 Nrf2 が主にペナンプラ領域で発現し、細胞レベルでは神経細胞およびアストロサイトに発現していたことから、Nrf2 の神経保護機構として、神経細胞の直接的な保護作用とともにアストロサイトを介した保護機構が考えられた。Nrf2 は虚血再灌流の早期には十分に活性化されていなかったが、Nrf2 活性化剤である BARD の静脈内投与により、Nrf2 が早期に活性化され神経保護作用を示したことから、Nrf2 の早期活性化は IRI に対する治療戦略となりうることを示している。さらに、実臨床においても薬剤投与が可能な、脳虚血発症後の再灌流時に BARD が投与されたにもかかわらず脳梗塞体積の減少および神経学的改善が認められたことは、本薬剤が臨床に応用可能で新たな脳梗塞治療の一つとなりうる可能性を示している。

【結論】

脳虚血再灌流により梗塞巣周囲に Nrf2 が発現したが、その発現は虚血再灌流の早期には認めず、24 時間後にピークとなり 48 時間後まで持続した。Nrf2 活性化剤の投与により Nrf2 は早期に活性化され神経保護作用を示したことから、Nrf2 活性化剤は IRI に対する有用な治療戦略となりうる。

論文審査の結果の要旨

申請者 高木俊範は、マウスにおける実験的脳虚血再灌流モデルを用いて、神経保護作用を持つ転写因子 Nrf2 の発現を検討するとともに、Nrf2 活性化剤である BARD の虚血発症後投与による神経保護作用を明らかにした。本研究の成果は急性期脳梗塞に対する新規治療手段となりうる可能性を示しており、脳卒中治療学の発展に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

Toshinori Takagi, Akira Kitashoji, Takao Iwawaki, Kazuhiro Tsuruma, Masamitsu Shimazawa, Shinichi Yoshimura, Toru Iwama, Hideaki Hara : Temporal activation of Nrf2 in the penumbra and Nrf2 activator-mediated neuroprotection in ischemia-reperfusion injury

Free Radical Biology and Medicine 72, 124-133 (2014).