

受賞対象論文

Omote Y, Deguchi K, Tian F, Kawai H, Kurata T, Yamashita T, Ohta Y, Abe K : Clinical and pathological improvement in stroke-prone spontaneous hypertensive rats related to the pleiotropic effect of cilostazol. Stroke (2012) 43, 1639-1646.

表 芳 夫

Yoshio Omote

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 脳神経内科学

Department of Neurology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences



<プロフィール>

昭和55年生まれ

平成18年3月 岡山大学医学部医学科卒業

平成18年4月 浦添総合病院 初期臨床研修医

平成20年4月 岡山大学病院 神経内科 医員

平成21年4月 脳神経センター大田記念病院 脳神経内科

平成22年4月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科博士課程入学

岡山大学病院 神経内科 医員

平成26年3月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科博士課程修了

平成26年4月 静岡てんかん・神経医療センター 神経内科・てんかん科
現在に至る

研究の背景と経緯

脳梗塞は我が国における主たる死因であり，日常生活動作（ADL）低下の要因となっていることから脳梗塞を予防することは我々に求められている重要課題である．一方，高血圧や脂質異常症，糖尿病，肥満などの生活習慣病は脳梗塞発症を高めるリスクと考えられており，アルツハイマー病や脳血管性認知症などのリスク因子でもある．これらのリスク因子に対する加療により脳梗塞や認知症発症のリスクを減少させるという報告もある¹⁾．

今回，我々が用いた脳卒中易発症高血圧ラット（SHR-SP）は塩分や高脂肪食負荷により高血圧，脂質異常症を呈し，それに伴い脳梗塞を発症する自然発症脳卒中モデル動物であり，脳小血管病変や血管性認知症のモデルとしても知られている．現在の日常診療において，アスピリンやクロピドグレル，シロスタゾールなどの抗血小板薬は脳梗塞予防目的に一般的に使用されており，ホスホジエステラーゼ3阻害薬であるシロスタゾールに関しては抗血小板作用以外にも抗酸化作用や血管拡張作用などの多面的な効果が注目されている．大規模臨床試験である Second Cilostazol Stroke Prevention Study (CSPS2) において，シロスタゾールはアスピリンと比較して出血性合併症を減少させ，

脳卒中発症を抑制することが示された²⁾．しかしながら，脳梗塞発症抑制に直結するメカニズムに関しては不明な点も多い．

そこで，本研究ではこれらの抗血小板薬の効果について，臨床的な評価として，運動機能と認知機能に注目し，免疫組織学的な評価として，酸化ストレスマーカーとインスリン様成長因子-1受容体（IGF-1R）との関連について検討を行った．

研究成果の内容

1. 本研究の試験デザインと臨床的経過

本研究では抗血小板薬の効果を検証するため，8週齢のSHR-SPに対して，高脂肪食と食塩水を負荷したうえで10週齢までの間，プラセボ，アスピリン，クロピドグレル，シロスタゾールの投与を行った．また，体重，血圧，脈拍などの生理学的データ，レーザードップラーを用いた局所脳血流，ロータロッドを用いた運動機能，モリス水迷路試験を用いた認知機能の評価を行った．また，抗血小板薬投与前後において採血を行い，血清脂質やコレステロール値の測定を行った．

この結果，血圧は収縮期，拡張期ともに週齢が経過するに従って上昇したが各群間での有意な差は認めなかった．一方，局所脳血流はプラセボ，アスピリン，

クロピドグレルの投与では週齢が経過するに従い徐々に減少したが、シロスタゾール投与では保たれている傾向にあった。血清脂質やコレステロール値は各群間での有意な差は認めなかった。運動機能についてはロータロッドを用いて落下するまでの時間 (running time) により評価した。8週齢、9週齢では各群間で有意な差は認めなかったが10週齢においてプラセボ、アスピリン、クロピドグレルと比較してシロスタゾールの投与では running time は有意に保たれていた。認知機能についてはモリス水迷路試験を用いてプラットフォームまでの到達時間 (escape time) により評価した。8週齢、9週齢では各群間で有意な差は認めなかったが10週齢においてプラセボと比較してシロスタゾールの投与では escape time の有意な短縮を認めた。

2. シロスタゾールの脳梗塞予防効果と酸化ストレス

上記実験において SHR-SP に自然発症した脳梗塞体積は抗 Neuronal Nuclei (NeuN) 抗体の免疫組織学的染色により評価した。その結果、アスピリンと比較してクロピドグレル投与によって脳梗塞体積の有意な減少を認め、プラセボ、アスピリン投与と比較してシロスタゾール投与ではよりいっそうの脳梗塞体積の減少を認めた。

その機序を検討するため、虚血巣周囲のペナンブラ領域において各種酸化ストレスマーカーの免疫染色を行った。脂質の酸化ストレスマーカーとして *N*-(hexanonyl)lysine (HEL), 4-hydroxynonenal (4-HNE), 糖化蛋白の酸化ストレスマーカーとして advanced end glycation products (AGE), DNA の酸化ストレスマーカーとして 8-hydroxy- 2-deoxyguanosine (8-OHdG) を用いた。これらの酸化ストレスマーカーの陽性細胞数を虚血巣周囲において検討したところ、プラセボと比較してクロピドグレル投与では減少傾向であり、シロスタゾール投与では有意に減少していた。以上の結果から、SHR-SP において自然発症の脳梗塞体積が抑制された機序として、虚血巣周囲において、これらの酸化ストレスが抑制されていることが示され、シロスタゾールの神経細胞における抗酸化効果との関連が考えられた。

3. シロスタゾールの認知機能保持効果と IGF-1 受容体の関与

上記実験において、シロスタゾールの投与によって認知機能が保持されていた要因として、海馬における IGF-1R の発現に注目した。IGF-1/IGF-1R のシグナ

ル伝達経路は細胞増殖や蛋白同化において重要であるとともに学習や記憶においても重要と考えられている³⁾。臨床的な検討ではアルツハイマー病患者において血清 IGF-1 値の低下を認めており⁴⁾、基礎研究においてはマウスの血清 IGF-1 値の低下に伴い空間認知機能の低下を認め、IGF-1 投与により認知機能が改善したという報告がある⁵⁾。

本研究では IGF-1R の免疫組織学的染色を行い、海馬の歯状回 (DG), CA3, CA1 の各領域において cresyl violet 染色を用いてカウントした全神経細胞数のうち IGF-1R 陽性細胞数の比を算出することによって検討を行った。その結果、CA1 領域においてプラセボ投与、アスピリン投与と比較してシロスタゾール投与において IGF-1R 陽性細胞比が有意に高かった。また、ウエスタンブロット法による海馬の IGF-1R 発現の検討もを行い、プラセボ投与と比較してシロスタゾール投与において有意に IGF-1R の発現亢進を認めた。

研究成果の意義

本研究では、SHR-SP においてシロスタゾール投与によって血圧とは関係なく運動機能、認知機能が保たれていた。免疫組織学的検討では、シロスタゾールの投与により、自然発症の脳梗塞体積の減少、虚血巣周囲における酸化ストレスの抑制、海馬における IGF-1R の発現亢進などの関与が考えられた。シロスタゾールはホスホジエステラーゼ 3 (PDE3) を阻害することにより細胞内の環状アデノシンリン酸 (cAMP) 濃度を上昇させ、血管内皮における一酸化窒素合成酵素 (eNOS) 活性を増強する。cMAP はプロテインキナーゼ A (PKA), ホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ (PI3K) を介するシグナル伝達経路を活性化させ、細胞生存に重要と考えられている。また、一酸化窒素合成酵素は酸化ストレスによる障害から血管内皮細胞を保護することから血管内皮細胞の老化に重要と考えられている。

IGF-1 は構造的にインスリンレセプターに類似するチロシンキナーゼ型受容体である IGH-1R に結合する。シロスタゾールの投与により海馬の cAMP と IGF-1 の増加を介して認知機能低下の抑制に寄与したとの報告があり⁶⁾、IGF-1 には海馬のシナプス可塑性や神経伝達、神経再生を高める作用を有するという報告もある⁷⁾。βアミロイドにより IGF-1R の機能が阻害さ

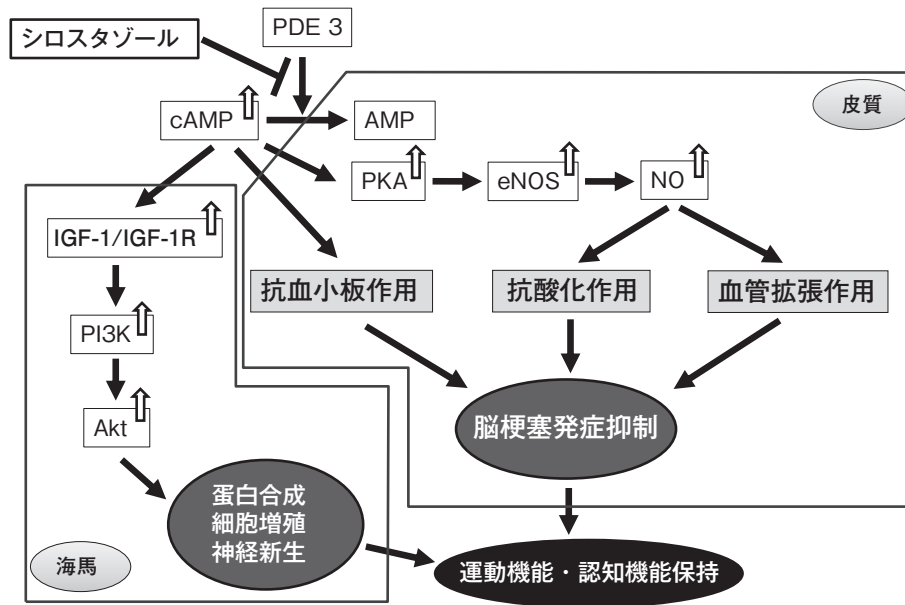


図 シロスタゾールはホスホジエステラーゼ3 (PDE3) を阻害し、細胞内の環状アデノシンーリン酸 (cAMP) 濃度を上昇させ、血管内皮における一酸化窒素合成酵素 (eNOS) 活性を増強し、血管拡張作用や抗酸化作用を発揮する。また、cAMP は IGF/IGF-1R に作用し、プロテインキナーゼA (PKA)、ホスファチジルイノシトール3キナーゼ (PI3K) を介するシグナル伝達経路を活性化させ、蛋白合成や細胞増殖作用を有する。これらの作用により、脳梗塞発症抑制が得られ、運動機能・認知機能が保持されていたと考えられる。
略語：PDE3：ホスホジエステラーゼ3、cAMP：環状アデノシンーリン酸、AMP：アデノシンーリン酸、PKA：プロテインキナーゼA、eNOS：内皮型一酸化窒素合成酵素、NO：一酸化窒素、IGF-1：インスリン様成長因子-1、IGF-1R：インスリン様成長因子-1受容体、PI3K：ホスファチジルイノシトール3キナーゼ

れ、記銘力障害が生じるとする報告があるが⁸⁾、本研究においてシロスタゾール投与により海馬 CA1 領域において IGF-1 受容体陽性細胞比が高くなっており、海馬における IGF-1 受容体蛋白の発現が亢進していたことなどが認知機能保持に寄与していた可能性が示唆された。

今後の展開や展望

今回、自然発症脳梗塞モデルでありかつ脳血管性認知症モデルとして知られる SHR-SP を用い、シロスタゾールは血圧と関係なく脳梗塞抑制効果のみならず、運動機能、認知機能が保たれることが明らかにされた。さらにその機序として、虚血巣周囲における抗酸化作用が脳梗塞進展を予防している可能性が示唆された。また、海馬における IGF-1R の発現の亢進により認知機能が保たれていると考えられた。以上の結果からシロスタゾールの脳梗塞予防ならびに認知機能保持に寄与するメカニズムの一端が明らかにされた。さらなる検討として、ニューロンと脳微小循環の調節機構として重要と考えられている Neurovascular Unit の保護

効果や、その構成要素として重要な役割を果たしていると考えられるペリサイトに対する作用、血管新生に対する作用などについて、検討の余地があると考えられる。また、今回明らかになったメカニズムに基づく新規治療薬開発が望まれる。

文 献

- 1) Rastas S, Pirttilä T, Mattila K, Verkkoniemi A, Juva K, Niinistö L, Lämsimies E, Sulkava R : Vascular risk factors and dementia in the general population aged \geq 85 years : prospective population-based study. *Neurobiol Aging* (2010) 31, 1-7.
- 2) Shinohara Y, Katayama Y, Uchiyama S, Yamaguchi T, Handa S, Matsuoka K, Ohashi Y, Tanahashi N, Yamamoto H, Genka C, Kitagawa Y, Kusuoka H, et al. ; CSPTS 2 group : Cilostazol for prevention of secondary stroke (CSPTS 2) : an aspirin-controlled, double-blind, randomised non-inferiority trial. *Lancet Neurol* (2010) 9, 959-968.
- 3) Rubovitch V, Edut S, Sarfstein R, Werner H, Pick CG : The intricate involvement of the insulin-like growth factor receptor signaling in mild traumatic brain injury in mice. *Neurobiol Dis* (2010) 38, 299-303.
- 4) Watanabe T, Miyazaki A, Katagiri T, Yamamoto H,

- Idei T, Iguchi T : Relationship between serum insulin-like growth factor-1 levels and Alzheimer's disease and vascular dementia. *J Am Geriatr Soc* (2005) 53, 1748-1753.
- 5) Trejo JL, Llorens-Martin MV, Torres-Aleman I : The effects of exercise on spatial learning and anxiety-like behavior are mediated by an IGF-Independent mechanism related to hippocampal neurogenesis. *Mol Cell Neurosci* (2008) 37, 402-411.
- 6) Zhao J, Harada N, Kurihara H, Nakagata N, Okajima K : Cilostazol improves cognitive function in mice by increasing the production of insulin-like growth factor-I in the hippocampus. *Neuropharmacology*. (2010) 58, 774-783.
- 7) Aberg MA, Aberg ND, Hedbacker H, Oscarsson J, Eriksson PS : Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* (2000) 20, 2896-2903.
- 8) Shin EJ, Chae JS, Park SJ, Kim SC, Koo KH, Yamada K, Nabeshima T, Kim HC : Growth hormone-releaser diet attenuates beta-amyloid(1-42)-induced cognitive impairment via stimulation of the insulin-like growth factor (IGF)-1 receptor in mice. *J Pharmacol Sci* (2009) 109, 139-143.
-

平成26年12月受理
〒420-8688 静岡県静岡市葵区漆山886番地
静岡てんかん・神経医療センター 神経内科
電話：054-245-5446 FAX：054-247-9781
E-mail：y-omote@hosp.go.jp