

ラット脳梗塞モデルにおける二次性脳損傷に対する

Epac2 の影響

(要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程

外科系脳神経外科学専攻

笥 雄三

修了年 2023 年

指導教員 吉野 篤緒

脳血管障害により、世界中では多くの人が毎年死亡し、死因として2番目に多い【1, 2】。脳血管障害生存者の多くが神経脱落症状を有している【3】。脳血管障害は、出血性脳血管障害と虚血性脳血管障害の2つのタイプに分類できるが、後者が約70～85%を占める【1】。脳血流の遮断は、虚血カスケードといわれる一連の有害事象を引き起こし、最終的には不可逆的な脳損傷につながる【4】。様々な虚血カスケードの反応により、アポトーシスおよびネクローシスを誘発し、大量の神経細胞死、さらには深刻な神経学的障害を引き起こす【5, 6】。現在、脳梗塞後に対する治療は、機械的血栓回収療法や血栓溶解療法がある。しかし、時間的な制限や適応の禁忌、慎重使用項目のために急性虚血性脳血管障害患者の1～10%程度しか治療できないのが実状である。【7, 8】虚血や外傷により直接受ける脳障害を一次性脳損傷と呼び、一次性脳損傷によって脳組織に発生する病態を二次性脳損傷と呼ぶ。多くの症例は脳梗塞後の二次性脳損傷を軽減させることが重要になる。しかし、二次性脳損傷の治療法は確立されていない。

脳浮腫は、一次性脳損傷に伴う二次性脳損傷病態形成の一つである。虚血性浮腫は、脳梗塞患者の主な死因となっている【9】。特に中大脳動脈の梗塞では、広範囲脳梗塞の結果起こる悪性脳浮腫症候群を引き起こし、死亡率は80%程度と高く、非常に予後が悪いことが知られている【10】。悪性脳浮腫症候群の頻度は、脳梗塞全体の約5%と言われている。臨床経過は脳梗塞発症から2～5日後に急激に脳ヘルニアが進行することにより意識障害が悪化して死亡するとされている【11】。病理学的には、脳の毛細血管レベルで内皮細胞の機能障害が生じ、BBBの破綻が起きることで、広範囲の細胞障害性浮腫が起きる【12】。脳浮腫が起こったのちの治療は、外減圧術やグリセオールやD-マンニトールなどの浮腫改善薬が使用されることがある【13, 14】。しかし、脳浮腫そのものを改善させる治療は確立されていない。

一次性・二次性脳損傷の結果引き起こされる細胞死に重要な役割をはたしているのが Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) である。MAPKs は、セリン/スレオニンプロテイ

ンキナーゼであり、細胞の増殖・分化、ストレス応答、およびアポトーシスを含む細胞機能を調節している【15】。p38 MAPK は、MAPK ファミリーの 1 つである。活性化された p38 MAPK が炎症反応、アポトーシス、オートファジー、細胞生存、および細胞死を調整することが報告されている【16-20】。脳虚血、外傷、腫瘍の研究で p38 MAPK 活性の増加が神経細胞死において重要な役割を果たし、p38 MAPK の阻害が神経保護の役割を果たすことが知られている【16, 21, 22】。

Exchange protein activated by cAMP (Epac) は、1998 年に初めて同定され、慢性閉塞性肺疾患や心血管疾患に関与していることが明らかになった【23】。Epac には、Epac1 と Epac2 の 2 つアイソフォームがあり、Epac2 はさらに Epac2A、Epac2B、Epac2C に分けられる。Epac2A は脳、下垂体、膵臓に発現しており、Epac2B は副腎及び精巣に由来するステロイド産生細胞、Epac2C は肝臓で発現している【24】。Epac1 は細胞膜に局在し、Epac2 は細胞質内に局在している【25】。cAMP はセカンドメッセンジャーとして protein kinase A (PKA) を活性化し、下流にシグナルが伝わり細胞死を促進的に働く事が知られている。

Epac は、cAMP 依存する過程の重要なメディエーターであり、細胞死にも関わっていることが報告されている【23, 26】。Epac の役割は腫瘍で広く研究されているが【45】、中枢神経系の細胞死、特に虚血性脳血管障害に対する Epac の役割については未だ不明な点が多い。外傷性脳損傷の基礎研究において Epac2 の刺激がアポトーシスを減少させることが報告されている【27, 28】。Epac2 は、糖尿病、がん、心血管疾患の治療の有望な標的としても期待されている【15, 29, 30】。ただし、脳梗塞または脳梗塞に誘発されるアポトーシス経路における Epac2 の分子的役割を示す研究は行われていない。本研究では、様々な細胞におけるアポトーシス制御に関与している Epac と、細胞死に重要な役割をしている p38 MAPK に注目した。脳梗塞とそれによって引き起こされる p38 MAPK 活性への Epac2 の役割とアポトーシスへの影響を解明することを目的とした。また、Epac2 特異的阻害剤 ESI-05 の治療の可能性を評価した。

実験方法は、雄 Sprague-Dawley (SD) ラット 62 頭を用いて naïve 群 (n = 6) 、 sham (手術操作のみ施行) 群 (n = 14) 、脳梗塞群 (n = 14)、脳梗塞-コントロール群 (n = 14) 、脳梗塞-ESI-05 投与群 (n = 14) を作製した。脳梗塞-ESI-05 投与群は、脳梗塞の 30 分前より腹腔内に薬液を投与し、ESI-05 の投与を行った。脳梗塞-コントロール群は、同時期に ESI-05 の溶解剤として用いた dimethyl sulfoxide (DMSO) のみを腹腔内投与した。24 時間後に脳を摘出し、脳の冠状断切片を作製した。検体を梗塞側の梗塞範囲・非梗塞範囲と非梗塞側に分けた。各脳切片を、2%2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC) 溶液に 37°C15 分間浸漬、染色し、ImageJ を用いて梗塞範囲、脳浮腫範囲を測定した。

それぞれの検体を用いて、Epac2、cleaved caspase 3、p38、phospho-p38、beta-actin の発現を Western blotting 法で評価した。水分含有割合を、modified wet-dry weight 法を用いて測定した。また、各群の Epac2、cleaved caspase3、Fluoro Jade C (FJC) 、TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) 染色について評価し、Epac2 の発現とアポトーシスの関係について調べた。

梗塞面積 (梗塞面積) は、脳梗塞群では 72.6 ± 5.7 % であり、脳梗塞-コントロール群の 72.9 ± 2.5 % と比較し有意差はなかった。脳梗塞-ESI-05 投与群は 65.3 ± 2.1 % であり、脳梗塞-コントロール群と比較して、脳梗塞面積が小さく両群間で統計学的有意差を認めた ($p < 0.05$) 。脳浮腫面積は脳梗塞群で 30.7 ± 3.9 % であり、脳梗塞-コントロール群の 31.0 ± 2.2 % と比較し有意差はなかった。脳梗塞-ESI-05 投与群は 20.4 ± 2.7 % であり、脳梗塞-コントロール群と比較して脳浮腫面積が小さく、両群間で統計学有意差を認めた ($p < 0.05$) 。脳水分含有割合は sham 群で 80.5 ± 0.6 % であり、脳梗塞群は 82.5 ± 0.7 % であった。脳梗塞により脳水分含有割合の増加を認めた ($p < 0.001$) 。脳梗塞-コントロール群の脳水分含有割合は 82.4 ± 0.7 % であり、脳梗塞群と比較し、有意差は認めなかった。脳梗塞-ESI-05 群では 81.7 ± 1.2 % であり、脳梗塞-コントロール群と比較して脳水分含有量が低下しており、両群間で統計学的有意差を認めた ($p < 0.05$)。神経学的機能評価では脳梗塞によりスコ

アの著名な悪化を認めた ($p < 0.001$)。脳梗塞-ESI-05 群では 13.5 ± 0.8 であり、脳梗塞-コントロール群 10.2 ± 1.3 と比較してスコアの改善を認めており両群間で統計学的有意差を認めた ($p < 0.001$)。Western blotting 法による解析は、脳梗塞辺縁部での比較を行った。Epac2 の発現は、naïve 群では 0.72 ± 0.06 であり、sham 群の 0.71 ± 0.06 と比較し、有意差はなかった。脳梗塞群は 0.83 ± 0.04 であり、脳梗塞により Epac2 の著名な発現増加を認めた ($p < 0.001$)。脳梗塞-ESI-05 投与群では 0.71 ± 0.04 であり、脳梗塞-コントロール群と比較して Epac2 の発現を抑制しており、両群間で統計学的有意差を認めた ($p < 0.05$) (図 10)。p38 の発現は、各群で統計学的有意差は認めなかった (図 11)。活性型の p38 である phospho-p38 の発現は、sham 群で 0.016 ± 0.004 であり、脳梗塞群の 0.050 ± 0.001 であった。脳梗塞により phospho-p38 の著名な増加を認めた ($p < 0.001$)。脳梗塞-コントロール群は 0.050 ± 0.02 で、sham 群で有意に phospho-p38 の発現が低値だった ($p < 0.05$)。脳梗塞-ESI-05 投与群では 0.034 ± 0.01 であり、脳梗塞-コントロール群と比較して、phospho-p38 の発現が低く、両群間で統計学的有意差を認めた ($p < 0.05$)。組織染色による Epac2、アポトーシスの評価は、脳梗塞層辺縁部で脳梗塞コントロール群と比較し脳梗塞-ESI-05 投与群の比較を行った。Epac2 は、脳梗塞-ESI-05 投与群で細胞質の Epac2 の発現が低下していた。cleaved caspase 3、TUNEL 染色、FJC 染色では脳梗塞辺縁部におけるアポトーシスが抑制されていた。

すべての値は平均値±標準偏差 (mean ± SD) で示し、データの解析には一元配置分散分析を用いた。分散が等しくないデータに対してはイプシロンで自由度を調整した。分散分析で要因に有意差が認められた場合のみ、その後の検定を行った。その後の検定には Tukey-kramer 法を用いた。すべて両側検定を行い、p 値 0.05 以下を有意とした。結果は、平均値±標準偏差で表記した。統計解析には SPSS Statistics (version21: IBM, USA) を使用した。

リン酸化により活性化された p38-MAPK は、炎症反応、アポトーシス、オートファジー、細胞生存、および細胞死の調節に関与している【18, 31, 32】。本研究においても、脳梗塞で Epac2 が p38-MAPK シグナル伝達経路を介してアポトーシスを起こすことを示唆しており、Epac2 の制御により p38-MAPK シグナル伝達を減弱させることを確認した。

caspase 3 は、アポトーシスにおいて重要な役割を果たす。脳梗塞においても神経細胞のアポトーシスで中心的な役割を果たしている【33】。caspase 3 阻害剤である z-DEVD-fmk がラット脳梗塞モデルにおいて脳組織細胞のアポトーシスを有意に阻害し、脳組織に保護効果があることが知られている【33】。本研究においても、脳梗塞で Epac2 の発現を介してアポトーシスが増加した。また、脳梗塞後の Epac2 活性増加に伴い cleaved caspase3 の有意な増加を認め、脳内のアポトーシスが増加していることがわかった。FJC および TUNEL 染色でも、Epac2、cleaved caspase 3 の増加に伴い脳梗塞後の神経細胞死の増加が確認された。Epac2 特異的阻害剤である ESI-05 の治療により、脳梗塞辺縁領域の神経細胞死が減少することがわかった。Epac2 活性を制御することで、p38 のリン酸化および caspase 3 の活性化を減少させ、神経細胞死を減らし、脳浮腫を軽減したと考えられる。また、免疫染色により、サンプル中の Epac2 の発現が確認された。結果は、脳梗塞辺縁領域では ESI-05 により Epac2 の発現は抑制されていることが観察され、ウエスタンブロッティングの結果と一致した。ESI-05 による治療はアポトーシスを減少させ、Epac2 の制御が脳梗塞治療に有用であることを示した。本研究は、Epac2 が p38 /caspase3 の経路を介して脳梗塞の病因に大きく寄与していることを示した。Epac2 の阻害は、脳梗塞のラットモデルにおける神経機能の改善に貢献している。Epac2 は、脳梗塞においても神経細胞のアポトーシスに関与していた。Epac2 が脳梗塞における二次性脳損傷の新しい治療標的である可能性があると考えられる。

引用文献

1. Feigin VL, Brainin M, Norrving B, Martins S, Sacco RL, Hacke W, Fisher M, Pandian J, Lindsay P. World Stroke Organization (WSO): Global Stroke Fact Sheet 2022. *Int J Stroke*. 2022 Jan;17(1):18-29
2. Donkor, E.S. Stroke in the 21(st) century: A snapshot of the burden, epidemiology, and quality of life. *Stroke Res. Treat* 2018, 2018, 3238165.
3. Jauch, E.C.; Cucchiara, B.; Adeoye, O.; Meurer, W.; Brice, J.; Chan, Y.Y.; Gentile, N.; Hazinski, M.F. Part 11: Adult stroke: 2010 american heart association guidelines for cardiopulmonary resuscitation and emergency cardiovascular care. *Circulation* 2010, 122, S818–S828.
4. Campbell, B.C.V.; Khatri, P. Stroke. *Lancet* 2020, 396, 129–142.
5. Campbell BCV, De Silva DA, Macleod MR, Coutts SB, Schwamm LH, Davis SM, Donnan GA. Ischaemic stroke. *Nat Rev Dis Primers*. 2019 Oct 10;5(1):70.
6. Anrather, J.; Iadecola, C. Inflammation and stroke: An overview. *Neurotherapeutics* 2016, 13, 661–670.
7. Rai AT, Seldon AE, Boo S, Link PS, Domico JR, Tarabishy AR, Lucke-Wold N, Carpenter JS. A population-based incidence of acute large vessel occlusions and thrombectomy eligible patients indicates significant potential for growth of endovascular stroke therapy in the USA. *J Neurointerv Surg*. 2017 Aug;9(8):722-726.
8. Del Zoppo GJ, Saver JL, Jauch EC, Adams HP Jr; American Heart Association Stroke Council. Expansion of the time window for treatment of acute ischemic stroke with intravenous tissue plasminogen activator: a science advisory from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2009 Aug;40(8):2945-8.
9. Kasner SE, Demchuk AM, Berrouschot J, Schmutzhard E, Harms L, Verro P, Chalela JA, Abbur R, McGrade H, Christou I, Krieger DW. Predictors of fatal brain edema in massive hemispheric ischemic stroke. *Stroke*. 2001 Sep;32(9):2117-23.
10. Berrouschot J, Sterker M, Bettin S, Köster J, Schneider D. Mortality of space-occupying ('malignant') middle cerebral artery infarction under conservative intensive care. *Intensive Care Med*. 1998 Jun;24(6):620-3.
11. Paciaroni M, Agnelli G, Corea F, Ageno W, Alberti A, Lanari A, Caso V, Micheli S, Bertolani L, Venti M, Palmerini F, Biagini S, Comi G, Previdi P, Silvestrelli G. Early hemorrhagic transformation of brain infarction: rate, predictive factors, and influence on clinical outcome: results of a prospective multicenter study. *Stroke*. 2008 Aug;39(8):2249-56.
12. Simard JM, Kent TA, Chen M, Tarasov KV, Gerzanich V. Brain oedema in focal ischaemia: molecular pathophysiology and theoretical implications. *Lancet Neurol*. 2007 Mar;6(3):258-68.
13. 福内靖男, 平井秀幸, 伊藤圭史, 他. 高張グリセロール静脈内投与による神経疾患の治療-1-10% (W/V) グリセロール加生理食塩液 (CG-A2P) の臨床効果について. *臨床と*

研究 1978 ; 55 : 929-937.

14. 後藤文男, 田崎義昭, 福内靖男, 他. 高張グリセロール静脈内投与による神経疾患の治療-2-10% (w/v) グリセロール, 5% (w/v) フラクトース加生理食塩水 (CG-A30) の臨床効果について. 臨床と研究 1978 ; 55 : 2327-2335.
15. Wehbe N, Slika H, Mesmar J, Nasser SA, Pintus G, Baydoun S, Badran A, Kobeissy F, Eid AH, Baydoun E. The Role of Epac in Cancer Progression. *Int J Mol Sci.* 2020 Sep 5;21(18):6489.
16. Takeda K, Ichijo H. Neuronal p38 MAPK signalling: an emerging regulator of cell fate and function in the nervous system. *Genes Cells.* 2002 Nov;7(11):1099-111.
17. Nozaki K, Nishimura M, Hashimoto N. Mitogen-activated protein kinases and cerebral ischemia. *Mol Neurobiol.* 2001 Feb;23(1):1-19.
18. Sui X, Kong N, Ye L, Han W, Zhou J, Zhang Q, He C, Pan H. p38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents. *Cancer Lett.* 2014 Mar 28;344(2):174-9.
19. Sridharan S, Jain K, Basu A. Regulation of autophagy by kinases. *Cancers (Basel).* 2011 Jun 9;3(2):2630-54.
20. Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science.* 1995 Nov 24;270(5240):1326-31.
21. Liu XW, Ji EF, He P, Xing RX, Tian BX, Li XD. Protective effects of the p38 MAPK inhibitor SB203580 on NMDA-induced injury in primary cerebral cortical neurons. *Mol Med Rep.* 2014 Oct;10(4):1942-8.
22. Lu L, Wang J, Wu Y, Wan P, Yang G. Rap1A promotes ovarian cancer metastasis via activation of ERK/p38 and notch signaling. *Cancer Med.* 2016 Dec;5(12):3544-3554.
23. Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, Toki S, Nakaya M, Matsuda M, Housman DE, Graybiel AM. A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science.* 1998 Dec 18;282(5397):2275-9.
24. Hoivik EA, Witsoe SL, Bergheim IR, Xu Y, Jakobsson I, Tengholm A, Doskeland SO, Bakke M. DNA methylation of alternative promoters directs tissue specific expression of Epac2 isoforms. *PLoS One.* 2013 Jul 4;8(7):e67925.
25. Lezoualc'h F, Fazal L, Laudette M, Conte C. Cyclic AMP Sensor EPAC Proteins and Their Role in Cardiovascular Function and Disease. *Circ Res.* 2016 Mar 4;118(5):881-97.
26. Kwak HJ, Park KM, Choi HE, Chung KS, Lim HJ, Park HY. PDE4 inhibitor, roflumilast protects cardiomyocytes against NO-induced apoptosis via activation of PKA and Epac dual pathways. *Cell Signal.* 2008;20:803-814.
27. Zhang L, Zhang L, Liu H, Jiang F, Wang H, Li D, Gao R. Inhibition of Epac2 Attenuates Neural Cell Apoptosis and Improves Neurological Deficits in a Rat Model of Traumatic Brain Injury. *Front Neurosci.* 2018 Apr 23;12:263.

28. Feigin VL, Brainin M, Norrving B, Martins S, Sacco RL, Hacke W, Fisher M, Pandian J, Lindsay P. World Stroke Organization (WSO): Global Stroke Fact Sheet 2022. *Int J Stroke*. 2022 Jan;17(1):18-29.
29. Zhang CL, Katoh M, Shibasaki T, Minami K, Sunaga Y, Takahashi H, Yokoi N, Iwasaki M, Miki T, Seino S. The cAMP sensor Epac2 is a direct target of antidiabetic sulfonylurea drugs. *Science*. 2009 Jul 31;325(5940):607-10.
30. Yang Z, Kirton HM, Al-Owais M, Thireau J, Richard S, Peers C, Steele DS. Epac2-Rap1 Signaling Regulates Reactive Oxygen Species Production and Susceptibility to Cardiac Arrhythmias. *Antioxid Redox Signal*. 2017 Jul 20;27(3):117-132.
31. Vahedi K, Vicaut E, Mateo J, et al: Sequential-design, multicenter, randomized, controlled trial of early decompressive craniectomy in malignant middle cerebral artery infarction (DECIMAL Trial). *Stroke* 38. 2007: 2506–2517.
32. Irving EA, Bamford M. Role of mitogen- and stress-activated kinases in ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2002 Jun;22(6):631-47.
33. Sun Y, Xu Y, Geng L. Caspase-3 inhibitor prevents the apoptosis of brain tissue in rats with acute cerebral infarction. *Exp Ther Med*. 2015 Jul;10(1):133-138.