

2 tPA 療法後の脳出血合併症を抑制する新規脳梗塞治療薬の検討

金澤 雅人・下畑 享良・西澤 正豊

新潟大学脳研究所神経内科学分野

A Novel Adjunctive Therapy Against Hemorrhagic Transformation After Tissue Plasminogen Activator Treatment for Ischemic Stroke

Masato KANAZAWA, Takayoshi SHIMOHATA and Masatoyo NISHIZAWA

*Department of Neurology, Brain Research Institute,
Niigata University*

要 旨

脳梗塞急性期の内科治療薬「組織プラスミノゲン・アクチベーター (tPA)」に伴う脳出血合併症防止を目指した血管保護の治療戦略について概説する。tPAは、脳出血を合併するリスクが高くなるため、発症から4.5時間までの適応である。我々は血管保護を目的としたtPAに併用薬剤の開発を行っている。治療標的分子として血管内皮増殖因子(VEGF)に注目し、ラット脳塞栓モデルにおいてその抑制が脳出血合併症を緩和することを明らかにした。臨床応用を目指した産学連携およびトランスレーショナルリサーチが進行中である。

キーワード：脳虚血，組織プラスミノゲン・アクチベーター (tPA)，併用療法，脳血管保護療法，血管内皮増殖因子 (VEGF)

はじめに

脳梗塞急性期の内科治療である血栓溶解薬「組織プラスミノゲン・アクチベーター (tPA)」は、2012年10月に治療可能時間 (Therapeutic time window) が発症から4.5時間に延長された。しかしなおtPAの治療可能時間は極めて短い。この原因は遅延した治療開始は脳出血合併症をもたらす可能性が高まり、予後を増悪しうるためである。そのため実際に適応となる患者数は5%未満に過ぎない。発想を転換すると、出血合併症を減少することでtPAの治療可能時間を延長させる脳血管保護療法の治療戦略が生じる。本稿では、tPA

療法における血管保護の臨床上的必要性、我々の取り組みを含む基礎研究の現状、そして今後の課題について概説する。

tPA 療法における脳血管保護の必要性

1995年発症3時間以内の脳梗塞患者に対してtPA静注が有効であることが報告された。発症3時間という極めて短い治療可能時間のため適応症例が限られ、恩恵にあずかる症例は限られていた。このため発症6時間以内の症例にまでに適応を拡大したECASS-I/II, ATLANTISという3つのstudyが行われた。しかし、いずれもその有効性

Reprint requests to: Masato KANAZAWA
Department of Neurology Brain Research Institute
Niigata University
1-757 Asahimachi-dori Chuo-ku,
Niigata 951-8585 Japan

別刷請求先：〒951-8585 新潟市中央区旭町通1-757
新潟大学脳研究所神経内科学分野 金澤 雅人

表1 急性期虚血性脳卒中に対するt-PA静脈内投与による血栓溶解療法：無作為化二重盲検試験

試験	患者数	治療可能時間	試験薬		結果	脳出血
NINDS (1995)	624	<3 時間	アルテプララーゼ	0.9 mg/kg	有効	増加
ECASS-I (1995)	620	<6 時間	アルテプララーゼ	1.1 mg/kg	無効	増加
ECASS-II (1998)	800	<6 時間	アルテプララーゼ	0.9 mg/kg	無効	増加
ATLANTIS (1999)	613	3~5 時間	アルテプララーゼ	0.9 mg/kg	無効	増加
ECASS-III (2008)	821	3~4.5 時間	アルテプララーゼ	0.9 mg/kg	有効	増加

を証明することはできなかった(表1)。3つのstudyにて明らかとなったことは、治療可能時間を越えたtPA投与は、出血合併症が有意に増加することである。つまりこの出血合併症を減少させることができればtPAの治療可能時間を延長させ、さらに治療可能症例数を増加することで予後を改善させる可能性がある。以上の理由から、血管保護を目指した研究が注目されている。

遅延したtPA投与は、血液脳関門(BBB)を破壊させる。脳梗塞は神経細胞のみではなく、血管内皮細胞やアストロサイトといったBBBを構成する細胞にも虚血性細胞障害を引き起こす。また、tPA自体も細胞外マトリックスや血管内皮基底膜の構成蛋白を分解するマトリックスメタロプロテ

ナーゼ(MMP)を活性化させ、BBB破綻に関与する。その結果、脳浮腫、脳出血の合併を招く。数多くの実験結果からも明らかのように、従来通りの神経細胞の生存・維持のみを目的とした「神経細胞保護」だけでは限界があり¹⁾、神経細胞に加え、血管内皮細胞、アストロサイト全体を虚血から保護する「神経・血管保護」へのパラダイム・シフトが必要である²⁾。

tPAに併用する血管保護薬を検討するモデル

tPAに併用する保護薬を検討するための動物実験では、ヒトの脳梗塞に類似した血栓による脳塞栓モデルを用い、さらにtPAを投与すること³⁾

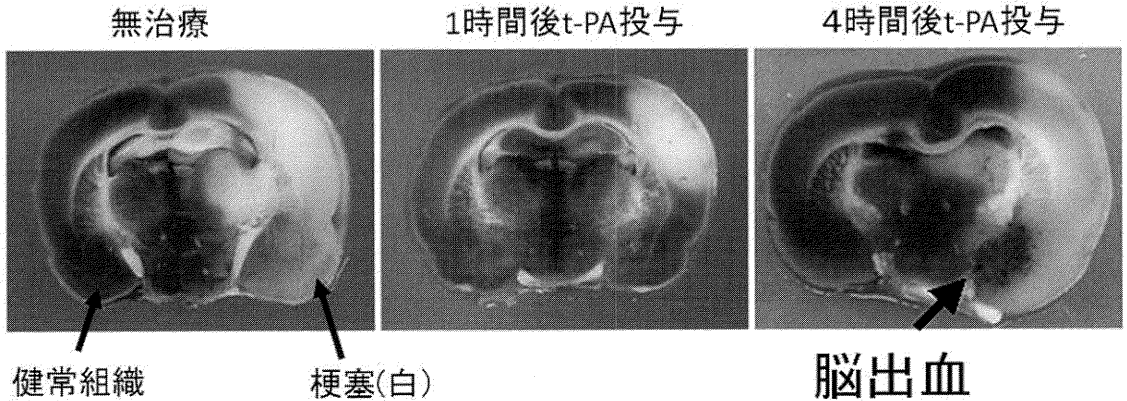


図1 脳塞栓モデルに対する tPA 療法

虚血後24時間ラット脳スライスのトリフェニルテトラゾリウムクロライド (TTC) 染色標本。虚血1時間後 tPA 投与群は、無治療(永久閉塞)群と比べて有意に虚血24時間後の梗塞体積を縮小させた ($p < 0.05$)、虚血4時間後 tPA 投与群では、無治療群、虚血1時間 tPA 投与群と比べて、有意に虚血24時間後の出血量が増加した ($p < 0.01$)。

での検討が望ましい。このモデルは手術が困難であり、梗塞のばらつきも大きく作成困難なモデルであるが、血管保護を目指した研究では必要なモデルである。その理由として、①治療可能時間内の tPA 投与で梗塞域が縮小し、機能予後が改善すること、②治療可能時間を越えての tPA 投与では BBB が破綻し、出血合併症が増加し、機能予後も増悪すること、③ tPA により血栓を溶解させるといった点で臨床の脳梗塞の病態に極めて類似していることがあげられる。我々が用いているラット脳塞栓モデルはまさにこれらの条件を満たし、虚血1時間後の tPA 投与では梗塞体積を著明に縮小させ、機能予後を改善させるが、虚血4時間後の tPA 投与では有意に出血量が増加し、致死率が増加する⁴⁾(図1)。またこのモデルでは、脳虚血急性期に MMP を活性化させて、細胞外マトリックスや血管内皮基底膜の構成蛋白を分解することからも、病態解明には有効なモデルといえる。

一方、実験的脳虚血モデルを用いて、tPA に併用し神経血管保護を実現する薬剤開発を目指した研究が近年実施されている。動物実験で有効性が示された薬剤の中で、臨床試験が実施されている

ものとしてミノサイクリン、シンバスタチン、エダラポンは現在も進行中である。また効果が期待された NXY-059 やエリスロポエチン、G-CSF は効果が示されず、中止されている。臨床応用が難しい理由として、適切な動物モデルでの検討が十分になされていないこともあげられる。

VEGF 抑制療法

我々は、ラット脳塞栓モデルを用い、血管保護を実現する標的分子として、血管内皮増殖因子 (VEGF) に注目した研究を行っている⁴⁾。VEGF は正常血管の安定化や腫瘍細胞の血管新生にかかわる増殖因子であるが、脳梗塞急性期に発現が亢進し、強力に血管透過性を亢進させ、BBB 破綻にも関与することが明らかとなっている。

ラット脳塞栓モデルを用いた虚血24時間後の免疫組織化学の検討では、虚血辺縁域に VEGF が発現し、BBB を構成する血管内皮細胞、アストロサイトの end-foot、周皮細胞に局在していた⁴⁾。tPA を投与しない永久虚血群、tPA 投与を脳虚血後1時間ないし4時間で行う tPA 1h 群、tPA 4h

群の VEGF 発現量を比較するため、全脳抽出物に対するウェスタンブロットを抗 VEGF 抗体を用いて行ったところ、sham 手術群ではほとんど検出されなかった VEGF が、永久虚血群では検出され、さらに tPA 4h 群では著明に増加し、永久虚血群・tPA 1h 群と比べて有意に増加した ($P < 0.05$ および $P < 0.05$)。

以上より、治療可能時間を越えての tPA 投与による BBB 破綻の治療標的分子の一つが VEGF であると考え、tPA 投与と同時に抗 VEGF 中和抗体の経静脈投与を実施した。抗 VEGF 抗体 (RB-222) を投与した群では、VEGF 発現が免疫組織化学、ウェスタンブロットでコントロール抗体投与と比べて有意に抑制された ($P < 0.01$)。また MMP 活性も有意に抑制された ($p < 0.05$)。さらに、RB-222 投与によって、tPA 4h 群の脳出血量を有意に減少し、機能予後を改善させた (それぞれ、 $P < 0.01$)。VEGF 受容体活性化阻害薬 SU1498 の腹腔投与も出血量を有意に低下させた ($P < 0.01$)。

これらの結果は、治療可能時間を越えての tPA 投与による脳出血合併症に VEGF シグナル経路の活性化が関与する可能性を示し、VEGF シグナル経路の抑制が、tPA 併用の脳血管保護の治療戦略の一つになる可能性を示唆した。

今後の課題

急性期脳梗塞の治療法の確立を目指したトランスレーショナルリサーチでは、回復可能な虚血性ペナンプラをいかに定義し、いかに保護するかが重要である。ハーバード大学の Lo 博士は虚血性ペナンプラの定義として、細胞死のメディエーターと、神経細胞修復・血管修復のメディエーターが混在し、せめぎ合いが生じている領域と提唱し

た⁵⁾。この考え方によれば急性期において細胞死を抑制し、そのあと始まる神経細胞修復や血管修復に悪影響を及ぼさないような薬剤が脳梗塞治療の理想と言える。我々が、治療標的分子として同定した VEGF も急性期では BBB 破綻のメディエーターである一方、慢性期では血管新生や血管リモデリングに関与していることも明らかとなっている。VEGF を脳虚血後どの範囲まで抑制すべきか、また抑制後の長期的効果について検討が必要である。また、VEGF シグナルカスケード抑制療法の臨床応用を目指して、最適な薬剤の同定、大型動物での効果の確認、ヒト脳梗塞患者のサンプルを用いた橋渡し研究 (トランスレーショナルリサーチ) が進行中である。

文 献

- 1) Neuroprotection: the end of an era? *The Lancet* 368: 1548, 2006.
- 2) del Zoppo GJ. Perspective: stroke and neurovascular protection. *N Engl J Med* 354: 553 - 555, 2006.
- 3) Okubo S, Igarashi H, Kanamatsu T, Hasegawa D, Orima H and Katayama Y: FK - 506 extended the therapeutic time window for thrombolysis without increasing the risk of hemorrhagic transformation in an embolic rat stroke model. *Brain Res* 1143: 221 - 227, 2007.
- 4) Kanazawa M, Igarashi H, Kawamura K, Takahashi T, Kakita A, Takahashi H, Nakada T, Nishizawa M and Shimohata T: Inhibition of VEGF signaling pathway attenuates hemorrhage after tPA treatment. *J Cereb Blood Flow Metab* 31: 1461 - 1474, 2011.
- 5) Lo EH. A New Penumbra: Transitioning from injury into repair after stroke. *Nat Med* 14: 497 - 500, 2008.