

令和元年5月30日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10309

研究課題名(和文)クモ膜下出血の予後改善を目的とした腎除神経術の効果とその機序

研究課題名(英文)The beneficial role of renal denervation in the prognosis of subarachnoid hemorrhage

研究代表者

長谷川 雄 (Hasegawa, Yu)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・講師

研究者番号：40599114

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、腎除神経術(RD)がくも膜下出血(SAH)の予後を改善するか検討した。ラットSAHモデルを作成後両側RDを施行した。RDはSAH後の主要な予後決定因子である脳血管攣縮を軽減し、脳動脈の血管内皮細胞における病的変化を抑制した。また、交感神経系の上位中枢である視床下部室傍核において、RDは組織傷害や交感神経活動を抑制した。さらに、SAH後に上昇する血中アンギオテンシンIIはRDにより低下した。以上より、RDはSAH後の視床下部傷害を軽減し、中枢性交感神経活動を抑制することで腎臓の α_1 受容体を介したレニンアンギオテンシン系を不活化した結果、脳血管攣縮を抑制したと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

長年議論的だった交感神経とくも膜下出血(SAH)後脳血管攣縮との関連性について、本研究では中枢性交感神経系を担う視床下部に焦点を当てて、それらの正の関連性を明らかにした。腎除神経術(RD)は、視床下部傷害を軽減し交感神経過活動を抑制した結果、強い血管収縮作用を持ち交感神経活動を修飾し得るアンギオテンシンIIを不活化することで血管内皮細胞保護を發揮し、SAH後脳血管攣縮を軽減したと考えられた。RDは治療抵抗性高血圧患者の新たな治療法となるべく、現在臨床研究が行われている。従って本研究結果は、RDがヒトSAH後脳血管攣縮の治療法に将来応用できる可能性を示唆するものとなった。

研究成果の概要(英文)：The aim of the project was to explore the protective effect of renal denervation (RD) on the prognosis of experimental subarachnoid hemorrhage (SAH). The rats were performed bilateral RD after SAH induction. RD prevented cerebral vasospasm which were one of the main determinant factors for SAH prognosis and ameliorated SAH-induced cytotoxic changes in endothelial cells of cerebral arteries. RD reduced cellular injuries and sympathetic nerve activation in hypothalamic periventricular nucleus. RD also decreased upregulated serum angiotensin II by SAH. Those findings indicated that RD prevented cerebral vasospasm through reduction of endothelial cell damage by SAH and the effects might be associated with inhibition of hypothalamic injuries, and deactivation of sympathetic nerve activity and subsequent increased renin-angiotensin system.

研究分野：脳卒中の病態・治療研究

キーワード：くも膜下出血 脳血管攣縮 腎除神経術 視床下部室傍核 早期脳損傷

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

SAHの予後決定因子として重要な早期脳損傷と脳血管攣縮は、その病態が解明されつつある。しかし臨床で使われている有効な治療薬や治療法はほとんど無く、医療が発展した現在でもその予後は改善されていない。実臨床の場で認められる急性期の予後不良因子として、頭蓋内圧上昇により惹起される脳浮腫、全脳虚血、不整脈、神経原性肺水腫が挙げられるが、これらはSAH後の頭蓋内圧上昇により視床下部傷害や脳幹傷害が誘導され、中枢性交感神経が過活動となり、多量のカテコラミンが放出することで生じると考えられている。またSAHの際に発症するタコツボ型心筋症もカテコラミンサーージが原因とされている。興味深いことに、SAH後2週間するとタコツボ型心筋症は劇的に改善されるため、その経過は症候性脳血管攣縮の改善時期と一致する。従ってSAH後の中枢性交感神経過活動は、SAHの全経過の病態に大きく影響している可能性が示唆される。

近年治療抵抗性高血圧患者に対し、血管内カテーテルによる腎神経焼灼術は血圧を有意に低下させることが報告された(Esler et al., Lancet. 2010)。この治療は、腎神経(主に求心性腎神経)焼灼により中枢性交感神経活動が制御され、その結果全身性交感神経活動も抑制され降圧効果が得られると考えられており、通常中枢性交感神経活動が亢進している治療抵抗性高血圧患者の新しい降圧療法として現在臨床試験が進行中である。この効果に着目し、我々は高塩分食を負荷した脳卒中易発症系高血圧自然発症ラット(SHRSP)において、腎除神経術(Renal denervation: RD)が脳卒中発症を抑制することを報告した(Nakagawa et al., J Am heart Assoc. 2013)。この研究の中で、RDで血圧は有意に下がったが、同等の降圧効果があった血管拡張薬投与群においては、脳卒中発症は抑制できなかった。また大脳皮質や白質だけでなく視床下部室傍核においても、酸化ストレスや炎症に関連する反応性アストロサイトの発現等がRD群でのみ有意に抑制されていた。従って、RDによる脳卒中発症の抑制は、降圧とは独立した大脳皮質、白質、視床下部室傍核における脳保護作用と関連すると考えられた。

2. 研究の目的

上述の背景から、RDは視床下部室傍核に作用しSAH後の中枢性交感神経活動を抑制することでその予後を改善するのではないかと着想するに至った。そこで、「RDは中枢性交感神経活動を抑制しSAH患者の予後を改善する」という仮説を実証するために、以下の動物実験を行うことを本研究目的とした。SAHの主な予後決定病態はSAH後早期脳損傷と脳血管攣縮であり、それぞれについてRDの効果を検討した。

3. 研究の方法

1) 動物、グループ分け、手術

10週齢の雄SDラットを、偽手術群(Sham群)、SAH手術群に分けた。SAH手術群は、その後さらにRD群(SAH+RD群)とRDの偽手術群(SAH+Sham群)に分けた。

人工呼吸器管理下に血管内穿刺法にてラットSAHモデルを作成し、SAH導入15分後に両側RDを開始、SAH導入45分後に完成させた(両側RDの手術時間は30分間)。創部はイソジン消毒にて感染予防を行い、鎮痛目的で術後メロキシカムを1mg/kgを皮下投与した。

2) 生理学的パラメーター、神経学的所見

術前と術後23時間後にテイルカフを用いて血圧と脈拍を計測した。術24時間後をエンドポイントとし、各群のラットの神経所見を計測(ガルシア変法、ロタロッドテスト)後、

イソフルラン麻酔下にレーザースペックルにて脳血流を計測した。

3) 早期脳損傷

血管内穿刺法は臨床を模した優れた SAH 作成法であるが、脳への衝撃を示す出血量をコントロールできないのが欠点である。従って、脳出血量に群間差が無いことを SAH 重症度で計測した。また、早期脳損傷は、一般的に脳浮腫を計測して比較検討するため、SAH24 時間後に脳水分含量を計測した。

SAH 重症度は、Sugawara らの方法で行った。SAH24 時間後に深麻酔下に断頭、直後に脳底部の写真を撮って、主幹動脈周囲の血種量をスコアリング化した。引き続き脳水分含量を評価するべく、両側大脳半球を各々計測し (wet weight) 105 度のオープン内で 72 時間 incubation 後、再度重量を測った (dry weight)。脳水分含量は以下の計算法で算出した。
脳水分含量 = $\{(wet\ weight) - (dry\ weight) / (wet\ weight)\} \times 100(\%)$ 。

4) 脳血管攣縮

脳血管攣縮を評価する方法として、今回ブラックインク血管撮影法を採用した。深麻酔下に左室から生理食塩水で灌流し、続いてブラックインク混在液体ラテックスにて灌流後、摘出した脳をホルマリン溶液に 24 時間浸した。顕微鏡下に脳底部側の写真を撮り、脳主幹動脈の血管径を計測した。次に脳血管毒性を評価すべく、アセタゾラミドの腹腔内投与による脳血管反応性を調べた。ウレタン混合麻酔は呼吸性変動が出にくいいため、その変動にて影響されやすいレーザースペックル脳血流測定の際には優れた麻酔法である。そこで、ウレタン混合麻酔液を SAH24 時間後に腹腔内投与し、呼吸が安定したところでアセタゾラミドを腹腔内投与し、投与後から 5 分毎に脳血流を計測した。

次に脳血管攣縮に伴う細胞障害性変化が RD により軽減しているか、またそれはどのようなメカニズムで発現されているのかを調べるために以下の検討を行った。上述の 3 群において、手術 24 時間後深麻酔下に腹部大動脈から血液を採取、リン酸緩衝生理食塩水を用いて経心的に灌流を行い、摘出した脳を凍結切片用に保存した。厚さ 8mm の切片を作成し、各種免疫染色を行った。また、主幹動脈を採取し、各種キナーゼやタンパクをウエスタンブロット法にて半定量的に解析した。さらに、ELISA 法にて血清内 angiotensin II の濃度を計測した。

4. 研究成果

1) 死亡率、生理学的パラメーター、神経学的所見

Sham 群では死亡する動物はなかった。SAH 群の死亡率は SAH 導入後 15 分で 41.7%、SAH+sham 群 13.2%、SAH+RD 群 13.9%であった。SAH では血圧の上昇や脈拍の変化は認めなかったが、RD を行うと、術前と比べ血圧の低下(約 16mmHg)と脈拍の上昇(約 79 回/分)が認められた。RD の降圧効果は良く知られており、これらの変化は RD の手術が成功している一つの所見ではあるが、降圧は時として脳灌流圧を低下し脳に悪影響を及ぼすことがある。本研究において脳血流は 3 群間で変化なく、RD による血圧低下は脳灌流圧を下げ無いと判断された。つまり、脳への悪影響は無いものと考えられた。一方、SAH 後神経学的所見は有意に増悪するが、RD 群ではその改善効果は認めなかった。

2) 早期脳損傷

SAH+Sham 群、SAH+RD 群の 2 群間で RD の効果を検討した。SAH スコアリングには差が無く両群の SAH 重症度は同等だったが、RD は脳水分含量を有意に低下しなかった。SAH 動物モデルでは脳浮腫の程度と神経学的所見は正に相関する (Hasegawa et al., 2016)。従って、

上述の神経学的所見に対する有効性が示されなかったことも併せ考えると、RD は SAH 後早期脳損傷には有効では無いと判断された。

3) 脳血管攣縮

脳主幹動脈は SAH により有意に狭小化した、RD は左中大脳動脈、右後大脳動脈、脳底動脈において、その血管径を有意に拡大した (Table 1、値は全て平均±標準誤差、以下同様)。アセタゾラミドによる血管反応性は RD により改善する傾向にあったが、有意差が出るには至らなかった。また、脳の主幹動脈を用いた Western blot 法において、SAH 後リン酸化細胞外シグナル調節キナーゼ (p-ERK) とシクロオキシゲナーゼ 2 (COX-2) の発現量は有意に上昇したが、RD はそれらを有意に軽減した (Table 2)。免疫組織学的検討において、p-ERK 陽性血管内皮細胞は SAH+RD 群で有意に減少した。COX-2 は SAH 後血管内皮細胞由来の攣縮血管で発現上昇することから、RD は SAH 後の血管内皮細胞傷害に対し保護効果をもつことが示唆された。さらに、RD 群では浸潤するマクロファージ (ED-1 陽性細胞) も減少しており (Table 2)、脳血管に対する RD の保護効果を裏打ちする結果と考えられた。

(Table 1)

	Sham	SAH+Sham	SAH+RD
左中大脳動脈 (mm)	0.25 ± 0.02	0.20 ± 0.01	0.25 ± 0.02
右後大脳動脈 (mm)	0.18 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.16 ± 0.01
脳底動脈 (mm)	0.31 ± 0.02	0.23 ± 0.01	0.28 ± 0.01

(Table 2)

	Sham	SAH+Sham	SAH+RD
pERK (% increase from Sham)	100 ± 9.6	125 ± 3.9	100 ± 2.9
COX-2 (% increase from Sham)	100 ± 20	700 ± 47	121 ± 20
pERK 陽性血管内皮細胞 (細胞数)	19.0 ± 3.4	32.8 ± 1.7	23.0 ± 2.0
ED-1 陽性細胞 (細胞数)	1.7 ± 0.6	7.2 ± 1.9	2.3 ± 1.2

では、どのようなメカニズムで RD は脳血管攣縮を改善させているのだろうか。RD は、中枢性交感神経の上位中枢である視床下部室傍核に作用して交感神経活動を抑制し、降圧効果を発揮すると考えられている。そこで、上述の疑問を解決すべく、視床下部室傍核に着目して以下の検討を行った。SAH 後室傍核で有意に増加した交感神経活性を示すドーパミン 水酸化酵素 (DBH 陽性細胞) や活性化グリア細胞 (GFAP 陽性細胞) は、RD により軽減した (Table 3)。SAH 後は破裂動脈瘤の近傍にある視床下部が侵されやすく、交感神経活動が有意に上昇する (カテコラミンサージ)。従って、RD は視床下部傷害を軽減し交感神経活動を抑えるものと考えられた。

(Table 3)

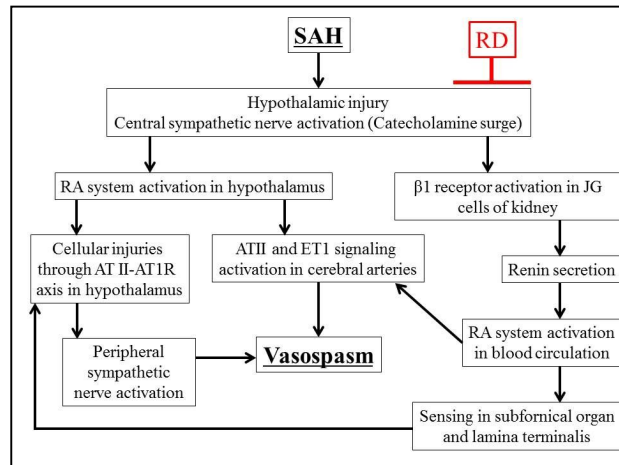
	Sham	SAH+Sham	SAH+RD
DBH (染色性)	1.0 ± 0.1	1.6 ± 0.2	1.1 ± 0.1
GFAP (染色性)	1.0 ± 0.04	1.1 ± 0.04	1.0 ± 0.02
Angiotensin II (pg/ml)	57.2 ± 3.2	84.6 ± 6.4	63.7 ± 3.6

最後に、RD による視床下部傷害と交感神経活動の抑制が、どのようにして血管内皮細胞傷害を抑制し脳血管攣縮を軽減しているのだろうか。予備検討にて、SAH 後視床下部室傍

核のアンジオテンシン陽性細胞が増加していることを発見したため、本研究ではレニン・アンジオテンシン系に着目して調べた。SAH 後に上昇した血清アンジオテンシン II は RD により有意に低下した(Table 3)。一方、脳血管のアンジオテンシン II 受容体の発現量は変化しなかった。

以上の結果から、RD の脳血管攣縮に対する治療効果が体系的に示された(Figure 1)。つまり、RD は SAH 後の視床下部に対する保護効果を示すことで交感神経活動を抑制し、腎 1 受容体を介してレニン活性を不活化する。その結果、血中のアンジオテンシン II の産生は抑えられ、血管内皮細胞の保護効果やエンドセリン 1 等の強い血管収縮物質の不活化を介して脳血管攣縮を軽減するものと考えられた。一方、

(Figure 1)(下記文献 6 より、一部改変)



視床下部は血液脳関門が脆弱なため、血中の様々なホルモンに暴露される。従って、SAH により増加したアンジオテンシン II は、視床下部でも酸化ストレス等の細胞傷害性変化を誘導し、さらなる交感神経活動を増強する。しかしながら、RD によるアンジオテンシン II の低下は、視床下部での二次的な細胞傷害を抑制することで全身性交感神経活動を不活化し、結果として脳血管攣縮の軽減に貢献する可能性も考えられた。

現在ヒトでも行われている RD は、危惧された有害事象は通常のカテーテル治療と同等であると報告されている。従って、本研究結果にて明らかとなった RD の脳血管攣縮軽減効果やその効果発現のメカニズムは、将来ヒトの SAH 治療に役立つことが期待される。なお、現在上記結果をまとめて、国際誌に投稿中である。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

1. **Yu Hasegawa**. Exploring the pathogenesis of subarachnoid haemorrhages (SAH) using an animal model. *Impact*, Volume 2019;4:4951-53 (査読無し)
2. Takemoto Y, **Hasegawa Y**, Hashiguchi A, Moroki K, Tokuda H, Mukasa A. Predictors for Functional Outcome in Patients with Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage Who Completed In-Hospital Rehabilitation in a Single Institution. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2019. [Epub ahead of print] (査読有り)
3. **Hasegawa Y**, Uekawa K, Kawano T, Suzuki H, Kim-Mitsuyama S. Blockage of Central Sphingosine-1-phosphate Receptor does not Abolish the Protective Effect of FTY720 in Early Brain Injury after Experimental Subarachnoid Hemorrhage. *Curr Drug Deliv*. 2017;14:861-866. (査読有り)
4. Hasegawa S, **Hasegawa Y**, Miura M. Current Therapeutic Drugs Against Cerebral Vasospasm after Subarachnoid Hemorrhage: A Comprehensive Review of Basic and Clinical Studies. *Curr Drug Deliv*. 2017;14:843-852. Review. (査読有り)
5. **Hasegawa Y**, Nakagawa T, Matsui K, Kim-Mitsuyama S. Renal Denervation in the Acute Phase of Ischemic Stroke Provides Brain Protection in Hypertensive Rats. *Stroke*.

2017;48:1104-1107. (査読有り)

6. **長谷川雄**、岳元裕臣、林建佑、光山勝慶 スパズム発症に關与するレニンアンギオテンシン系の活性化 脳血管攣縮 2018; 34: 1-5 (査読有り)
7. 岳元裕臣、橋口昭人、**長谷川雄**、諸木浩一、徳田元、武笠晃丈 単一施設の最近 10 年間における症候性脳血管攣縮の発生率とその予防薬についての後方視的解析 脳血管攣縮 2018; 34: 10-14 (査読有り)
8. **長谷川雄**、岳元裕臣、林建佑、光山勝慶 交感神経抑制をターゲットとしたスパズム治療の展望 脳血管攣縮 2017;33:9-13 (査読有り)

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 岳元裕臣、**長谷川雄**、林建佑、武笠晃丈、光山勝慶 腎除神経術はラットくも膜下出血後の中枢性交感神経活性化を抑制し脳血管攣縮を軽減する。第 35 回スパズムシンポジウム 2019 年 3 月 21 日 横浜
2. Yushin Takemoto, **Yu Hasegawa**, Kenyu Hayashi, Akitake Mukasa, Shokei kim-Mitsuyama. Renal Denervation (RD) Reduces Cerebral Vasospasm After Subarachnoid Hemorrhage In Rats. International Stroke Conference 2019 Feb. 8th Honolulu, Hawaii.
3. 岳元裕臣、**長谷川雄**、林建佑、武笠晃丈、光山勝慶 腎除神経術はラットくも膜下出血後の脳血管攣縮を軽減する 第 41 回日本高血圧学会総会 2018 年 9 月 14 日 旭川
4. **長谷川雄**、岳元裕臣、林建佑、光山勝慶 スパズム発症に關与するレニンアンギオテンシン系の活性化 第 34 回スパズムシンポジウム 2018 年 3 月 15 日 福岡 (シンポジウム)
5. **長谷川雄**、岳元裕臣、林建佑、光山勝慶 中枢性交感神経活動制御を目的としたスパズム治療の展望 第 33 回スパズムシンポジウム 2017 年 3 月 16 日 大阪 (シンポジウム)
6. **長谷川雄**、光山勝慶 中枢性交感神経活動の制御による脳卒中の新しい予防・治療法 第 17 回日本抗加齢医学会総会 2017 年 6 月 2 日 東京 (シンポジウム)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：河野隆幸

ローマ字氏名：Takayuki Kawano

所属研究機関名：熊本大学

部局名：医学部付属病院脳神経外科

職名：講師

研究者番号 (8 桁) : 50448536

研究分担者氏名：鯉淵信孝

ローマ字氏名：Nobutaka Koibuchi

所属研究機関名：熊本大学

部局名：大学院生命科学研究部

職名：助教

研究者番号 (8 桁) : 30456131