

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10746

研究課題名(和文)クモ膜下出血後の脳血管攣縮、遅発性虚血障害発症分子としてのDAMPs

研究課題名(英文)DAMPs as vasospasm and DCI after SAH.

研究代表者

菊池 清志(Kikuchi, Kiyoshi)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：60404539

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)：脳卒中患者の転帰は発症前の身体活動量に左右される。他方、脳卒中患者の予後にはDAMPs や酸化ストレスなどが関与するといわれている。今回ラットクモ膜下出血モデルを用い、DAMPsや酸化ストレスに対する予防的運動の効果を評価した。3週間の予防的運動を行うことによって、SAH発症後の意識障害、運動障害、感覚障害の軽減が認められた。さらに予防的運動群では、抗酸化経路の活性化、酸化ストレス抑制、内因性保護タンパクの発現量増加、アポトーシスの抑制、代表的なDAMPs の一つとして認識されているHMGB1の細胞質における発現量低下がみられた。これらの成果を広く公表すべく、英語論文の執筆を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クモ膜下出血では、約50%は初回の出血で死亡するか、来院後も治療対象とならない。また、約20%は、後遺障害を残す極めて重篤な疾患である。脳卒中患者の転帰は発症前の身体活動量に左右されると言われているが、その機序は明らかになっていなかった。今回、動物モデルではあるが、その機序を明らかにした学術的意義および社会的意義は極めて大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：The outcome of stroke patients depends on the amount of physical activity before the onset. On the other hand, it is said that DAMPs and oxidative stress are involved in the prognosis of stroke patients. In this study, we evaluated the effects of preventive exercise on DAMPs and oxidative stress using the rat subarachnoid hemorrhage (SAH) model. By carrying out preventive exercise for 3 weeks, reduction of consciousness disorder, movement disorder, and sensory disorder after the onset of SAH was recognized. Furthermore, in the preventive exercise group, activation of antioxidative pathway, suppression of oxidative stress, increased expression of endogenous protective protein, suppression of apoptosis, and decreased expression of HMGB1 in cytoplasm recognized as one of the representative DAMPs. Was seen. We are writing an English paper to publicize these achievements.

研究分野：脳血管障害

キーワード：クモ膜下出血 予防的運動 DAMPs

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脳卒中患者の転帰は、発症前の身体活動量に左右される [1]。我々はこれまで様々なラット脳卒中モデルで、予防的運動 (Preconditioning exercise) の効果を検証してきた [2, 3]。

脳卒中の中で、クモ膜下出血は、最も重篤な経過をたどる。クモ膜下出血では、約 50% は初回の出血で死亡するか治療対象とならず、約 20% は後遺障害を残す。クモ膜下出血患者の予後には、DAMPs (damage associated molecular patterns) や酸化ストレスなどが関与するといわれている [4, 5]。

DAMPs/alarmins の 1 つである核内タンパク high mobility group box 1 (HMGB1) は、傷害を受けた細胞やマクロファージなどから細胞外に放出されて炎症反応を促進する [6]。核内タンパク HMGB1 は、2 つの DNA 結合モチーフ (A box と B box) と酸性アミノ酸を豊富に含む acidic tail からなり、アミノ末端から 23, 45, 106 番目にシステイン残基を有している [6]。生理活性を有するのは、システイン残基がすべて還元型 (チオール型) である all-thiol HMGB1 と 23 番と 45 番のシステイン残基がジスルフィド結合した酸化型の disulfide HMGB1 であり、それぞれ RAGE および TLR4 を活性化することが知られている [6]。炎症等に伴って細胞外に遊離された CXCL12 が共存すると、all-thiol HMGB1 は 2 分子の CXCL12 と複合体を形成し、これが CXCR4 の 2 量体化を誘起することで受容体シグナルを増強する [6]。HMGB1 は壊死細胞から受動的に遊離されるほか、マクロファージなどの細胞から能動的に分泌され、各受容体を介して炎症反応を増強すると考えられている [6]。

### 2. 研究の目的

これまでクモ膜下出血における予防的運動の機序は明らかになっていなかった。本研究では、クモ膜下出血における DAMPs や酸化ストレスを標的とした予防的運動の効果を評価することを目的とする。

### 3. 研究の方法

ラットクモ膜下出血モデル [7] を用い、DAMPs や酸化ストレスに対する予防的運動の効果を評価した。SD ラット 40 匹を使用して無作為に 20 匹ずつ予防運動群 (Ex) と非運動群 (No-Ex) に分けた。Ex 群は、トレッドミル強制運動装置 (MK-680, MUROMACHI KIKAI CO. LTD, Japan) を使用して、25m/min の速度で 3 週間、週 5 日、1 日 30 分の予防運動を行った。No-Ex 群は、3 週間ケージ内で自由飼育を行った。予防運動介入終了後にクモ膜下出血の作成を行った。

クモ膜下出血作成後に、CT 撮影 (Skyscan 1176, Bruker micro-CT, Kontich, Belgium) を行いクモ膜下出血が作成できているかどうかを確認し、Ex 群、No-Ex 群で同様の出血量があることを評価した。Ex 群では、20 匹中 15 匹作成でき、対照群では、20 匹中 18 匹であった。

クモ膜下出血作成後 5 時間で屠殺を行い、屠殺前に、生存率の評価、神経行動学的評価、運動-感覚機能の評価を行った。神経行動学的評価は、ガルシアによる神経評価法を改変した神経学的評価システム (最高 22 点) を用いて行った [7]。運動-感覚機能の評価は、テープテスト [2] を用いて実施した。

### 4. 研究成果

#### 【生存率における予防的運動の効果】

クモ膜下出血は、各群ともに 20 匹を使用して、頭蓋内の内頸動脈分岐穿刺することによって作成した。Ex 群は、15 匹作成でき 4 匹が死亡し、No-Ex 群は、18 匹作成でき 8 匹が死亡した。クモ膜下出血後 5 時間以内の生存率は、No-Ex 群 (50%) に比べて Ex 群 (70%) で改善がみられたが有意な差は見られなかった。

#### 【神経障害や運動感覚機能障害における予防的運動の効果】

クモ膜下出血後、神経障害や運動感覚機能障害に対する障害軽減効果について検討を行った。覚醒後に、神経障害と運動感覚機能障害の評価を行った。神経障害は、No-Ex 群に比べて、Ex 群で、神経障害の軽減がみられた。一方、感覚障害の軽減は、Ex 群では両上肢ともに反応速度が速く、対照群で反応速度が遅延していた ( $p < 0.05$ )。

抗酸化経路 [Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2)/HO-1 (ヘムオキシゲナーゼ)] は、Ex 群は No-Ex 群に比較し、有意に活性化していた。一方、酸化ストレスの指標である 4HNE (4-Hydroxynonenal) や NT (Nitrotyrosine) の発現量は、Ex 群は No-Ex 群に比較し、有意に

低下していた。他方、内因性保護タンパク 14-3-3 の発現量は、Ex 群は No-Ex 群に比較し、有意に増加していた。さらに Ex 群は No-Ex 群に比較し、アポトーシスに関連する Bax や Caspase 3 の活性化が、有意に抑制されていた。代表的な DAMPs の一つとして認識されている HMGB1 (High Mobility Group Box 1) の細胞質における発現量低下がみられた。

今回、動物モデルではあるが、その機序を明らかにした学術的意義および社会的意義は極めて大きいと考える。これらの成果を広く公表すべく、英語論文の執筆を進めている。

<引用文献>

[1] Rist PM et al. Physical activity, but not body mass index, predicts less disability before and after stroke. *Neurology*. 2017: 1718-1726.

[2] Otsuka S et al. Preconditioning exercise reduces brain damage and neuronal apoptosis through enhanced endogenous 14-3-3 $\gamma$  after focal brain ischemia in rats. *Brain Struct Funct*. 2019: 727-738.

[3] Terashi T et al. Neuroprotective effects of different frequency preconditioning exercise on neuronal apoptosis after focal brain ischemia in rats. *Neuro Res*. 2019:510-518

[4] Nakahara T et al. High-mobility group box 1 protein in CSF of patients with subarachnoid hemorrhage. *Neurocrit Care*. 2009: 362-8.

[5] Munakata A et al. Effect of a free radical scavenger, edaravone, in the treatment of patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*. 2009:423-8

[6] Maho Tsubota et al. Role of macrophage-derived HMGB1 as an algogenic molecule/therapeutic target in visceral pain. *Pain Res*. 2019: 24–30.

[7] Uekawa K et al. Rosuvastatin ameliorates early brain injury after subarachnoid hemorrhage via suppression of superoxide formation and nuclear factor-kappa B activation in rats. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2014 : 1429-39.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Terashi Takuto, Otsuka Shotaro, Takada Seiya, Nakanishi Kazuki, Ueda Koki, Sumizono Megumi, Kikuchi Kiyoshi, Sakakima Harutoshi	4. 巻 1
2. 論文標題 Neuroprotective effects of different frequency preconditioning exercise on neuronal apoptosis after focal brain ischemia in rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurological Research	6. 最初と最後の頁 1~9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1080/01616412.2019.1580458	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Otsuka S, Sakakima H, Terashi T, Takada S, Nakanishi K, Kikuchi K.	4. 巻 224
2. 論文標題 Correction to: Preconditioning exercise reduces brain damage and neuronal apoptosis through enhanced endogenous 14-3-3 after focal brain ischemia in rats.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain Struct Funct.	6. 最初と最後の頁 727~738
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1007/s00429-018-1800-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kikuchi K, Setoyama K, Tanaka E, Otsuka S, Terashi T, Nakanishi K, Takada S, Sakakima H, Ampawong S, Kawahara KI, Nagasato T, Hosokawa K, Harada Y, Yamamoto M, Kamikokuryo C, Kiyama R, Morioka M, Ito T, Maruyama I, Tancharoen S.	4. 巻 8
2. 論文標題 Uric acid enhances alteplase-mediated thrombolysis as an antioxidant	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1~12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) DOI:10.1038/s41598-018-34220-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Kikuchi Kiyoshi, Setoyama Kentaro, Terashi Takuto, Sumizono Megumi, Tancharoen Salunya, Otsuka Shotaro, Takada Seiya, Nakanishi Kazuki, Ueda Koki, Sakakima Harutoshi, Kawahara Ko-ichi, Maruyama Ikuro, Hattori Gohsuke, Morioka Motohiro, Tanaka Eiichiro, Uchikado Hisaaki	4. 巻 19
2. 論文標題 Application of a Novel Anti-Adhesive Membrane, E8002, in a Rat Laminectomy Model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1~9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi:10.3390/ijms19051513	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Sumizono Megumi, Sakakima Harutoshi, Otsuka Shotaro, Terashi Takuto, Nakanishi Kazuki, Ueda Koki, Takada Seiya, Kikuchi Kiyoshi	4. 巻 Volume 11
2. 論文標題 The effect of exercise frequency on neuropathic pain and pain-related cellular reactions in the spinal cord and midbrain in a rat sciatic nerve injury model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Pain Research	6. 最初と最後の頁 281 ~ 291
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="http://dx.doi.org/10.2147/JPR.S156326">http://dx.doi.org/10.2147/JPR.S156326</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計4件(うち招待講演 2件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 菊池 清志, 森岡 基浩, 内門 久明
2. 発表標題 ラット椎弓切除モデルにおけるE8002の癒着防止効果の検証
3. 学会等名 第28回 脳神経外科手術と機器学会 (CNTT)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菊池清志, 伊藤隆史, 瀬戸山健太郎, 細川和也, 丸山征郎
2. 発表標題 尿酸は rtPA線溶効果を増強するか? 脳梗塞急性期治療における閉塞血管の再開通率向上を目指して
3. 学会等名 第19回 TTMフォーラム(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菊池 清志, 瀬戸山 健太郎, 寺師 拓斗, 角園 恵, 榎間 春利, 服部 剛典, 森岡 基浩, 田中 永一郎, 内門 久明
2. 発表標題 ラット椎弓切除モデルにおけるE8002の癒着防止効果の検証
3. 学会等名 第33回 日本脊髄外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 菊池 清志
2. 発表標題 ラジカットをグルトバに併用する意義－線溶作用に対する効果を検証する
3. 学会等名 第14回 鹿児島ストローク研究会 学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	丸山 征郎  (Maruyama Ikuro)  (20082282)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任教授   (17701)	
研究分担者	森岡 基浩  (Morioka Motohiro)  (20295140)	久留米大学・医学部・教授   (37104)	
研究分担者	田中 永一郎  (Tanaka Eiichiro)  (80188284)	久留米大学・医学部・教授   (37104)	
研究分担者	森元 陽子  (Morimoto Yoko)  (30437967)	鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・助教   (17701)	