

令和 2 年 5 月 19 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10821

研究課題名(和文) 損傷関連分子RAGEによるクモ膜下出血後脳血管攣縮機構の解明

研究課題名(英文) Novel molecular immune mechanism underlying cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage.

研究代表者

石井 宏史 (HIROSHI, ISHII)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：90634171

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：くも膜下出血(SAH)後の脳血管攣縮(CVS)と続発する脳障害の病態は、血腫由来の損傷関連分子RAGEによって誘導される好中球の集積によることが分かった。

RAGE欠損マウスにおいて、SAH後の神経学的スコア及びCVSの程度が軽減されることが分かった。すなわちRAGEがSAH後に脳血管攣縮及び神経障害を来すことが分かった。また、SAH後の脳動脈周囲に好中球がRAGE依存的に集積することが免疫組織染色で確認できた。ここで好中球特異的RAGE欠損マウスを用いてSAHを作成したところ神経学的スコア及びCVSの程度が改善した。また隔壁共培養実験にてRAGE依存的に好中球が血腫に遊走することが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これ迄は脳血管攣縮における内皮細胞による攣縮作用のみが着目され、これが内皮細胞の細胞骨格制御分子Rhoキナーゼに対する阻害剤(塩酸ファスジル)が臨床適用されている根拠となっている。しかし依然顕著な患者予後の改善に迄は至っていない。これに対して本研究は初めて末梢の好中球動員がSAH後病態の核心である事を解明するものである。また我々はSAHの後遺障害が重篤な患者では内在性RAGE阻害蛋白質であるRAGEデコイ受容体が血中で少ない事実を確認している(J Neurosurg 2019)。この臨床結果はRAGE阻害剤の臨床応用への有望性を強く示唆しており、これは本研究の学術的創造性に繋がるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Subarachnoid hemorrhage (SAH) suddenly occurs predominantly by ruptured cerebral aneurysm. The severity of SAH is higher than other types of stroke such as cerebral ischemia and intracranial hemorrhage. It is critical to prevent disability after SAH by modulating its underlying molecular mechanism. Here, we identified a receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) as an inducer molecule of cerebral vasospasm (CVS)/brain injury after SAH. In RAGE-deficient mice, neurological score and cerebral vasospasm was markedly improved compared with control mice. RAGE was expressed in endothelial cells of internal carotid artery after SAH. However, vascular specific RAGE-deficient mice did not show improvement of CVS after SAH. In stead, neutrophil-specific RAGE-deficient mice showed improvement of these phenotypes compared with control ones. Therefore, RAGE in neutrophil contributes to CVS after SAH. Indeed, neutrophils accumulated around cerebral artery after SAH in RAGE-dependent manner.

研究分野：脳卒中、神経外傷、神経免疫学

キーワード：くも膜下出血 脳血管攣縮 免疫細胞 好中球 RAGE

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

くも膜下出血(SAH)は主に脳動脈瘤の破裂により発症する。脳梗塞等の脳卒中に比べSAH患者はより重症で、患者の3割以上は脳血管が攣縮し、死亡ないし麻痺・言語障害と重い後遺症を残す。また患者の約6割は生産年齢にあり、障害の予防法開発は極めて重要である。ここで研究代表者らは、新規SAH後病態誘導因子として損傷関連分子RAGEを同定した。研究開始当初に我々は以下(1)-(3)の実験結果を得ていた。(1)免疫スーパーグロブリンファミリーに属する膜貫通型受容体であるRAGEは穿破型SAHマウスモデルにおける脳血管で発現上昇が観察された。(2)野生型(WT)マウスRAGE遺伝子欠損(*RAGE*<sup>-/-</sup>)マウスを用いたところ、SAH後の神経症状がWTマウスに比べ*RAGE*<sup>-/-</sup>マウスにおいて顕著に改善した。(3)SAH24時間後に起こる脳血管攣縮がWTマウスに比べ*RAGE*<sup>-/-</sup>マウスにおいて改善した。

## 2. 研究の目的

**【1】**くも膜下出血後に脳血管を攣縮させるRAGEの標的細胞を同定、及びそのシグナル伝達機構を解明し、**【2】**RAGEシグナルの制御による治療効果の検証をすること

**【1】【2】**を通じてくも膜下出血後後遺障害の新たな病態機構を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

**【1】**血管内皮細胞のRAGEが脳血管攣縮および脳障害を誘導するのかを確認するために血管内皮細胞特異的*RAGE*<sup>-/-</sup>マウスを用いてくも膜下出血(SAH)を作成した。次に免疫細胞のRAGE機能を調べるためにWTおよび*RAGE*<sup>-/-</sup>マウスにGFPマウス由来の骨髄移植を行ってからSAHを作成した。また好中球のRAGE機能を調べるために好中球特異的*RAGE*<sup>-/-</sup>マウスを用いてSAHを作成した。SAHマウスモデルの神経学スコアを計測し<sup>①</sup>、灌流固定後にゼラチンインクの灌流により主幹脳動脈および細動脈を可視化した。その後免疫組織学染色を行った。また共培養実験では、上層の底に3μmの小さなポアを持つ隔壁培養皿であるtranswell (Corning®)を用い、下層の皿に血腫を、上層の皿にLPS刺激をした好中球を撒き、37°Cにて45分間培養した。

**【2】**RAGEの内在性阻害因子である可溶性RAGEを強制発現するトランスジェニックマウスesRAGEマウスを用いSAHを作成した。またRAGEの細胞内領域と、そのアダプター分子であるDIAPH1との会合を阻害するRAGE阻害剤C11<sup>②</sup>の投与によるSAHマウスモデルの治療効果を確認した。

次頁に続く

#### 4. 研究成果

- (1) 血管内皮細胞得意的 *RAGE*<sup>-/-</sup> マウスは当初の仮説に反して、コントロールマウスと比べて神経学所見および脳血管攣縮に差異は認められなかった。すなわち血管内皮細胞の RAGE は SAH 後の病態には関わらないことが分かった。あらためて WT マウスおよび全身型の *RAGE*<sup>-/-</sup> マウスの SAH 後の脳組織を免疫組織学染色により観察した。すると WT マウスでは主幹脳動脈の内腔・外腔に免疫細胞、特に活性化した好中球が集積浸潤していた。対照的に *RAGE*<sup>-/-</sup> マウスの主幹脳動脈の内腔・外腔には免疫細胞が殆ど浸潤していなかった。
- (2) そこで免疫細胞における RAGE の役割を調べることにした。すなわち WT および *RAGE*<sup>-/-</sup> マウスに GFP マウス由来の骨髄移植を行った後に SAH を作成して解析した結果、*RAGE*<sup>-/-</sup> マウスの神経学所見および脳血管攣縮が悪化し、WT マウスと差異が見られなくなった。また免疫組織学染色により、本来免疫細胞浸潤が見られなかった *RAGE*<sup>-/-</sup> マウスの脳動脈に免疫細胞浸潤が観察されるようになった。
- (3) 次に、免疫細胞の中でも特に好中球に着目し好中球特異的 *RAGE*<sup>-/-</sup> マウスを用いて SAH を作成して解析を行った。すると好中球特異的 *RAGE*<sup>-/-</sup> マウスではコントロールマウスに比べて有意に神経学所見および脳血管攣縮が改善することが分かった(図 1)。
- (4) Transwell を用いた隔壁共培養実験により、WT の好中球は血腫に向かって遊走するが、*RAGE*<sup>-/-</sup> 好中球ではこの遊走が 25%ほどに減弱することが分かった。また RAGE の阻害剤 C11 を好中球に前処理することにより、あるいは RAGE のリガンド HMGB1 に対する中和抗体を血腫側に前処理することにより WT 好中球の遊走が阻害されることも分かった。
- (5) 次に RAGE が新たなくも膜下出血(SAH)の治療標的になる可能性を動物実験により検証した。RAGE 阻害因子である可溶性 RAGE を強制発現する esRAGE マウスを用いて SAH を作成すると、WT マウスに比べて有意に神経学所見および脳血管攣縮が改善した。
- (6) そして(4)の隔壁共培養実験でも用いた RAGE 阻害剤 C11 を WT SAH マウスモデルに投与した。その結果、vehicle 投与群に比べて有意に神経学所見および脳血管攣縮が改善した。

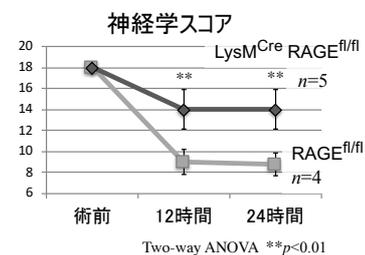


図1 好中球特異的*RAGE*<sup>-/-</sup>でSAH後の神経学スコア改善する。

以上の研究結果より、くも膜下出血後に血腫由来の損傷関連分子 HMGB1 シグナルが抹消に存在する好中球の RAGE を介して脳動脈に遊走することで脳動脈攣縮を誘導する可能性が示唆された。この HMGB1-RAGE 軸をブロックする RAGE 阻害剤を用いることでくも膜下出血後の脳血管攣縮及び脳損傷の新たな治療法となる可能性が示唆された。

#### <引用文献>

- ① Liu et al, Mol Neurobiol 2015; DOI 10.1007/s12035-015-9386-9
- ② Manigrasso et al, Sci Rep 2016; DOI 10.1038/srep22450

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Aida Y, Kamide T, Ishii H, Kitao Y, Uchiyama N, Nakada M, Hori O.	4. 巻 1
2. 論文標題 Soluble receptor for advanced glycation end products as a biomarker of symptomatic vasospasm in subarachnoid hemorrhage.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Neurosurgery	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） 0.3171/2019.8.JNS191269.	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Ishii H, Aida Y, Ohkuma Y, Munesue S, Roboon J, Hattori T, Takarada-Iemata M, Nakada M, Yamamoto Y, Hori O.
2. 発表標題 Leukocyte accumulation is critical pathology of cerebral vasospasm/neuronal dysfunction after subarachnoid hemorrhage.
3. 学会等名 NEURO2019, the joint meeting of 42nd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society and the 62nd Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, Toki Messe, Niigata, Japan. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ishii H, Aida Y, Munesue S, Roboon J, Hattori T, Takarada-Iemata M, Nakada M, Yamamoto Y, Schmidt AM, Hori O.
2. 発表標題 DAMPs-dependent neutrophil accumulation is critical pathology in cerebral vasospasm/neuronal dysfunction after subarachnoid hemorrhage.
3. 学会等名 9th International DAMPs and Alarmin Symposium, Okayama University, Junko Fukutake Hall, Okayama, Japan. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石井 宏史、会田 泰裕、竇田 美佳、服部 剛志、中田 光俊、山本 靖彦、堀 修
2. 発表標題 くも膜下出血後脳血管攣縮の新規分子機構
3. 学会等名 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会、長崎大学医学部、長崎市
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 石井 宏史、会田 泰裕、大熊 康祐、Roboon Jureepon、服部 剛志、竇田 美佳、中田 光俊、山本 靖彦、堀 修
2. 発表標題 Peripheral leukocyte accumulation in the brain is critical pathology of cerebral vasospasm/neuronal dysfunction after subarachnoid hemorrhage.
3. 学会等名 日本解剖学会第78回中部支部学術集会、富山県民会館、富山市
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石井 宏史、棟居聖一、会田 泰裕、服部 剛志、竇田 美佳、中田 光俊、山本 靖彦、Schmidt AM、堀 修
2. 発表標題 DAMPs-dependent neutrophil migration is critical pathology in cerebral vasospasm after SAH.
3. 学会等名 第62回日本脳循環代謝学会学術集会、江陽グランドホテル、仙台市
4. 発表年 2019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
連携研究者	堀 修  (HORI Osamu)  (60303947)	金沢大学・医学系・教授   (13301)	
連携研究者	中田 光俊  (NAKADA Mitsutoshi)  (20334774)	金沢大学・医学系・教授   (13301)	
連携研究者	山本 靖彦  (YAMAMOTO Yasuhiko)  (20313637)	金沢大学・医学系・教授   (13301)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	服部 剛志 (HATTORI Tsuyoshi) (50457024)	金沢大学・医学系・准教授  (13301)	
連携研究者	宝田 美佳 (TAKARADA Mika) (40565412)	金沢大学・医学系・助教  (13301)	