

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K10822

研究課題名(和文) くも膜下出血後白質障害の機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanism of white matter injury after subarachnoid hemorrhage

研究代表者

吉岡 秀幸 (YOSHIOKA, Hideyuki)

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号：20402076

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類の脳の過半を占める大脳白質の障害は、脳梗塞をはじめ多くの疾患で注目されているものの、くも膜下出血では現在までほとんど検討されていない。そこで、本研究では、くも膜下出血後白質障害の意義を、細胞間情報伝達物質(アデノシン三リン酸：ATP)と酸化ストレスに注目してマウスモデルを用いて検討した。その結果、白質障害は重症なくも膜下出血で発症しやすく、これにはATPをはじめとする細胞間情報伝達物質によるアストロサイトの活性化や細胞膜結合型プロオキシダント酵素であるNADPH oxidaseが産生する活性酸素が重要な役割を担うことが推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

くも膜下出血の治療において再出血予防に劣らず重要な課題は、最初の出血を生き長らえた患者の脳高次機能を、社会復帰が可能なレベルまで回復させることである。このための一つの方法は、早期脳損傷を軽減することであるが、有効な治療法は現在まで開発されていない。今回、哺乳類の脳の過半を占める大脳白質が、重篤なくも膜下出血後早期に障害されることが明らかとなり、その機序の一端が解明された。本結果が、今後のくも膜下出血後早期脳損傷の治療開発の礎となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Much attention has been recently paid to white matter injury in various brain disease such as ischemic stroke; however, such injury in subarachnoid hemorrhage (SAH) is not well elucidated. In this study, we studied white matter injury after SAH using a mouse model, especially focusing on neurotransmitters (adenosine triphosphate: ATP) and oxidative stress. The results indicate that white matter injury is associated with severity of SAH, and that astrocytes activated by ATP and reactive oxygen species produced in NADPH oxidase might play important roles in white matter injury after SAH.

研究分野：脳血管障害

キーワード：くも膜下出血 白質障害

1. 研究開始当初の背景

破裂脳動脈瘤によるくも膜下出血 (subarachnoid hemorrhage: SAH) は極めて重篤な疾患であり、死亡率は 32-67% にのぼる。また救命できても 10% 程度は重度な障害が後遺し、社会復帰が困難となる。このような予後不良に関わる因子には、早期脳損傷、再出血、脳血管攣縮、水頭症、全身合併症などがあげられるが、中でも、発症時の重症度、特に意識障害の程度が転帰とよく相関することから、早期脳損傷が大きな役割を担う。SAH に伴い、頭蓋内圧亢進、脳血流に対する自動調節の障害、脳酸素代謝率の低下や微小血栓の形成などが生じるが、これらによって引き起こされる一過性全脳虚血が早期脳損傷の重大な要因となる。全脳虚血は、興奮性アミノ酸障害、酸化ストレス、炎症反応、血液脳関門障害や大脳皮質拡延性抑制などを生じ、様々な細胞に apoptosis を誘導し、二次的な脳損傷を引き起こすと考えられているが、SAH 後早期脳損傷の病態に関しては解明されていない点も多い。

一方、大脳白質は主に軸索とグリア細胞により構成され、ヒトを始めとする哺乳類では脳の過半を占めるが、近年、急性および慢性脳虚血や頭部外傷などの様々な病態においてその障害が大きく注目されている。従来、脳虚血病態においては神経細胞の虚血脆弱性が強調されてきたが、大脳白質も虚血に対して非常に脆弱であることが最近の研究から明らかとなっており、その原因の一つは白質では側副血行路が発達していないことが指摘されている。また軸索は一度損傷されると脱ミエリン化し、跳躍伝導の障害や Na^+ の漏出により代謝需要が亢進する結果、虚血への脆弱性が高まることが知られている。このような白質障害は、メカニズムや薬物感受性の面において灰白質障害と大きな違いがあると言われているが、その初期段階は共通しており、アデノシン三リン酸 (ATP) などの細胞間情報伝達物質や酸化ストレスが大きな役割を担うと考えられている。ATP は細胞内の基本的なエネルギー通貨であるが、同時に細胞間情報伝達物質としても機能し、ATP 受容体である P2X/Y 受容体を介して様々な疾病病態に深く関与している。脳虚血後に細胞外へ過剰放出された ATP は細胞障害を誘導し、特にアストロサイトやマイクログリアの活性化と密接に関わるが、白質障害においてはイオンチャネル内臓型の P2X7 受容体が重要な働きをすることが近年明らかとなっている。また、酸化ストレスは脳損傷後に活性化されたマイクログリアから生じるのみならず、主要な活性酸素源であるミトコンドリアを多量に含む軸索自体からも誘導される。細胞膜結合型プロオキシダント酵素である NADPH oxidase は、もう一つの主要活性酸素源として虚血性神経細胞障害に関与することが知られているが、この NADPH oxidase が、虚血後白質障害にも関与していることが報告されている。

以上のように白質障害は急性脳虚血病態において重大な鍵を握るが、SAH の早期脳損傷は虚血が主因の一翼を担うことを鑑みると、この病態においても白質障害が起こりうる事が予想される。しかしながら、白質に焦点をおいた SAH 後早期脳損傷の研究は、ほとんどなされていないのが現状である。MRI を用いた臨床研究では、従来、SAH 後の早期障害部位は大脳灰白質が主体であると報告されてきたが、頭蓋内低灌流症例では白質障害をきたすことが近年の詳細な検討で明らかにされつつあり、このような重症例での早期脳損傷では、白質障害が灰白質障害より一層重要な役割を果たしている可能性が示唆されている。また、ごく最近になりマウス SAH モデルを用いた研究で、SAH 後 24 時間には脳梁、外包や脳弓などの白質に軸索損傷やミエリン変性が生じることが報告されたが、SAH 独自の白質障害の機序、特に ATP や酸化ストレスの役割についてはほとんど検討されていない。

2. 研究の目的

SAH 治療において再出血予防に劣らず重要な課題は、最初の出血を生き長らえた患者の脳高次機能を、社会復帰が可能なレベルまで回復させることである。このための一つの方法は、早期脳損傷を軽減することであるが、有効な治療法は現在まで開発されていない。

そこで本研究では、SAH 後の白質障害とその機序を、特に ATP や酸化ストレスの役割に注目して検討する。これにより、SAH 後早期脳損傷の有効な治療法の礎となることを目指す。

3. 研究の方法

(1) SAH モデル作成

雄性 C57/Bl6 マウス (10~12 週齢) を用い、フローゼン麻酔下に頸部右内頸動脈から挿入した 5-0 ナイロン糸で前大脳動脈を穿刺し、作成した。摘出脳の底部の出血状態に基づき出血の程度を、以下の 4 段階で判定した [Grade 1: ほとんど出血を認めない、Grade 2: 最小限の出血を認める、Grade 3: 脳底部血管が観察可能な程度の中等度の出血を認める、Grade 4: 多量の出血を認め脳底部血管は観察できない]。

活性酸素源である NADPH oxidase の阻害には、NADPH oxidase ノックアウトマウス (gp91phox^{-/-}マウス、Jackson 社) を用いた。

(2) 免疫染色

SAH 前、SAH 後 6、12、24 時間の時点で灌流固定し、ピプラトームを用いて 30 μ m 厚の薄切切片を作成した。切片は floating 法にて蛍光免疫染色を行った。

(3) Superoxide anion の検出

SAH 後の活性酸素 (superoxide anion) は、hydroethidine 法にて検出した。Hydroethidine は 5-0 ナイロン糸による前大脳動脈の穿刺直前に 1mg を投与した。出血後 24 時間で灌流固定し、ピプラトームを用いて 30 μ m 厚の薄切切片を作成した。切片は、蛍光顕微鏡 (excitation: 568 nm, emission >590 nm) で観察した。

(4) 白質障害の組織学的評価

SAH 後 24 時間での脳薄切切片で評価した。軸索の障害は抗 SMI-32 抗体、ミエリンの変性は抗 degraded myelin basic protein (dMBP) 抗体を用いた免疫染色で評価した。障害程度は蛍光免疫染色写真での蛍光強度を Image J で計測し、定量化した。

4. 研究成果

(1) SAH 後白質障害

SAH 後 24 時間の脳梁では、抗 SMI-32 抗体陽性の障害軸索と、抗 dMBP 抗体陽性の障害ミエリンを認めた。これら抗体の発現強度は、SAH 重症度と相関しており、出血が重度のものほど発現が高度であった。すなわち、重症な SAH ほど、脳梁での白質障害を強く認めた。

(2) SAH 後白質でのアストロサイトの活性化と P2X7 受容体発現変化

SAH 後 6 時間には、脳梁での GFAP 陽性アストロサイトの発現を認めるようになった。SAH 後 24 時間では GFAP の発現はより亢進し、活性化アストロサイトの集積を認めた。同様に Iba-1 陽性のミクログリアの発現も SAH 後 6 時間より認め、24 時間では、細胞体が肥大した活性化ミクログリアを認めた。

脳梁での P2X7 受容体発現は、Sham ではほとんど認めなかったが、24 時間後の脳梁では一部の細胞に認めた。蛍光免疫二重染色では、GFAP と P2X7 の共発現を認めたが、Iba-1 と P2X7 は共発現せず、P2X7 受容体は主に活性化アストロサイトに発現していた。

(3) SAH 後白質での superoxide 産生

SAH 後の superoxide anion 産生は、hydroethidine 法を用いて検出した。SAH 後 24 時間での脳梁では、superoxide のマーカーである ethidium シグナルを認めた。

(4) NADPH oxidase ノックアウトマウスでの白質障害

SAH 後白質障害における、活性酸素の役割を検討するため、主な活性酸素産生源の一つである NADPH oxidase をノックアウトしたマウスを用いて検討した。

SAH 後の致死率は、コントロール (22%)、ノックアウトマウス (17%) で差を認めず、また SAH の重症度も両方で差を認めなかった。Superoxide の産生はノックアウトマウスでは著明に抑制されており、SAH 後 24 時間での脳梁の ethidium シグナル強度は有意差をもってノックアウトマウスで低かった。活性化アストロサイトやミクログリアの発現も、ノックアウトマウスでは抑制されていた。蛍光免疫染色での抗 SMI-32 抗体と抗 dMBP 抗体の蛍光強度は、ノックアウトマウスでは有意差を持って低く、NADPH oxidase の阻害により SAH 後白質障害が抑制されることが示された。

以上より、SAH 後の白質障害は、重症な SAH で発症しやすく、これには ATP をはじめとする細胞間情報伝達物質によるアストロサイトの活性化が関与している可能性が示唆された。また、白質障害には、活性酸素が重要な役割を担い、この活性酸素は、細胞膜結合型プロオキシダント酵素である NADPH oxidase が主要な産生源であることが推測された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Hanihara M, Yoshioka H, Kanemaru K, Hashimoto K, Shimizu M, Nishigaya K, Fukamachi A, Kinouchi H	4. 巻 126
2. 論文標題 Long-Term Clinical and Angiographic Outcomes of Wrap-Clipping for Ruptured Blood Blister-Like Aneurysms of the Internal Carotid Artery Using Advanced Monitoring.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 World Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 439-446
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.wneu.2019.02.070.	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 Horiuchi R, Yoshioka H, Kanemaru K, Hashimoto K, Yagi T, Murayama H, Kinouchi H	4. 巻 137
2. 論文標題 Iodine-123-Iomazenil SPECT Revealed Recovery of Neuronal Viability in Association with Improvement in Symptoms Following Treatment for Obstructive Hydrocephalus due to a Giant Posterior Cerebral Artery Aneurysm.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 World Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 341-344
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.wneu.2020.02.067.	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 Sui X, Yoshioka H, Fukumoto Y, Kanemaru K, Kinouchi H	4. 巻 339
2. 論文標題 Neuroprotective roles of HAX-1 in ischemic neuronal injury.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental Neurology	6. 最初と最後の頁 113642
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.expneurol.2021.113642	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0件

〔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	橋本 幸治 (HASHIMOTO Koji) (10644792)	山梨大学・大学院総合研究部・医学研究員 (13501)	
研究 分担者	木内 博之 (KINOUCHI Hiroyuki) (30241623)	山梨大学・大学院総合研究部・教授 (13501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------