

令和 4 年 6 月 26 日現在

機関番号：81404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K11563

研究課題名(和文)mTOR経路を介する加齢制御に着目した高齢者くも膜下出血の新規治療法の開発

研究課題名(英文)Development of novel therapeutic approach for subarachnoid hemorrhage: inhibition mTOR pathway by rapamycin

研究代表者

佐々木 一益 (Sasaki, Kazumasu)

秋田県立循環器・脳脊髄センター(研究所)・その他部局等・主任研究員

研究者番号：80738948

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):本研究では、くも膜下出血(Subarachnoid hemorrhage; SAH)の最大の予後増悪因子として知られる早期脳損傷に対するラパマイシン標的タンパク(mammalian target of rapamycin; mTOR)活性阻害剤の脳保護効果について検証を行った。我が国における高齢者人口の増加に伴い、加齢性変化を考慮に入れたSAHの病態解明と新規治療法の確立が求められていることから、老齢マウスで作製したSAHを用いた検証を行った。その結果、本剤はSAH後の脳血流や活動量の回復を促進し、グリア細胞の増殖抑制効果を有する事が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、加齢性変化を考慮したSAH後の早期脳損傷に対するmTOR活性阻害剤の脳保護効果を明らかにした。本研究のみでその全容を明らかにする事は困難であるが、高齢者のSAHの予後改善に寄与するmTOR経路を介した新たな薬物療法開発への可能性を提示した。

研究成果の概要(英文):This study investigated the neuroprotective effects of the mammalian target of rapamycin (mTOR) on the early brain injury in the murine model of subarachnoid hemorrhage. We studied aged mice (80-90 weeks) as a model of the pathology of the elderly. Briefly, we confirmed that the mTOR has a therapeutic effect on enhanced recovery from decreased cerebral blood flow and locomotor activity after the induction of SAH. Further, our results showed that the mTOR inhibits the increased number of glial cells after the ischemic injury. These findings provide basic information regarding the neuroprotective role of mTOR against microvascular ischemic injury after SAH in the aged brain.

研究分野：救急医学、麻酔科学

キーワード：mTOR くも膜下出血 早期脳損傷 脳保護 神経炎症

1. 研究開始当初の背景

破裂動脈瘤によるくも膜下出血 (subarachnoid hemorrhage; SAH) は、死亡率が高い神経救急疾患である。特に発症から 2 週以内に約 4 割の患者で発症する遅発性脳虚血 (delayed cerebral ischemia; DCI) もしくは脳血管攣縮 (cerebral vasospasm) と総称される病態は、約半数が重度後遺症や死亡に至る、最大の予後増悪因子として知られている。近年の高齢者人口の増加に伴い、SAH の発症年齢も上昇しているが、その治療成績はきわめて不良である。世界的な研究の流れからは、DCI の主要な原因として SAH による早期脳損傷 (early brain injury) とそれに関連した微小循環障害 (microvascular dysfunction) が推測されている。しかし、老化に伴う加齢性変化が DCI の病態に与える影響については未だ明らかにされていない。従って、我が国における高齢者人口の増加に伴い、加齢性変化を考慮に入れた SAH の病態解明と新規治療法の確立が求められている。

近年、細胞内の主要なタンパク質分解経路であるオートファジーの制御が抗加齢作用に深く関わる可能性が指摘されている。オートファジーの活性低下が原因となる異常タンパク質の蓄積が脳の加齢性変化や様々な神経変性性疾患の原因として考えられている。また、老化に伴う免疫機能の低下が過剰な炎症反応を惹起し、グリア細胞 (glia cell) の増加を促進することが知られている。グリア細胞から放出される興奮性神経毒素を持つ過剰なグルタミン酸が脳細胞死の原因の 1 つであると考えられている。このような背景から、加齢に起因した様々な変性性疾患の治療ターゲットとしてオートファジーやグリア細胞が注目されている。具体的には、抗菌作用、オートファジー促進作用、抗炎症作用、抗酸化作用、そして免疫抑制作用などの多面的効果 (pleiotropic effect) を有するラパマイシン標的タンパク (mammalian target of rapamycin; mTOR) の特異的阻害薬であるラパマイシン (Rapamycin) への関心が高まっている。

このような抗加齢作用ならびに様々な神経変性性疾患などに対する治療薬の候補として注目されている mTOR 活性阻害剤の多面的効果に着目し、申請者らは高齢者で発症した SAH 後の早期脳損傷に対する本剤の脳保護効果を検証する課題の発案に至った。

2. 研究の目的

申請者らは、mTOR シグナル伝達経路がオートファジーや炎症を制御する事に着目した。即ち、mTOR を標的にした治療が高齢者の SAH 後の早期脳損傷における遅発性脳血管攣縮抑制に奏功するという仮説を立てた。従って、本研究では、ヒトの老化に伴う脳の加齢性変化に類似した条件を可能な限り再現するために、老齢マウスで作製した SAH にて mTOR 活性阻害剤の脳保護効果を検証した。

3. 研究の方法

本研究は実験 1 と 2 の 2 つのパートから構成される。実験 1 では基礎データの収集を目的とし、C57BL6 系統の若齢 (8 - 12 週齢) ならびに老齢 (80 - 90 週齢) マウスを用いた SAH 疾患モデルの系統的表現型解析を行った。実験 2 では上記した 2 つの週齢のマウスで作製した SAH において、mTOR 活性阻害剤の脳保護効果についての検証を行った。

実験 1

[実験 1-1]

若齢マウスと老齢マウスを用い、イソフルラン吸入による全身麻酔下で血管内穿通法を

用いて SAH を作製した(endovascular perforation model)。小動物用 MRI を用い、1) T2 *強調画像による血腫分布を基にした SAH の重症度分類、2) Continuous arterial spin labelling (CASL) 法による脳血流 (cerebral blood flow; CBF) 定量、3) Open Field 試験による行動評価をモデル作成前、モデル作成後 24、48、72 時間を実施した。

[実験 1-2]

SAH モデルの作製後 72 時間の動物を灌流固定し、大脳皮質体性感覚野を対象に抗 GFAP 抗体と抗 Iba1 抗体を用いて免疫染色を行い、アストロサイトとマイクログリアの細胞数の定量化を行った。

実験 2

mTOR 活性阻害剤投与群と非投与群を設け、若齢マウスと老齢マウスで SAH を作製し、実験 1 と同様の項目について検証を行った。mTOR 活性阻害剤の投与は SAH 作製前後 3 日間行った (10mg/kg の投与量で 1 日 1 回腹腔内投与)。

4. 研究成果

実験 1

若齢マウスに比較して老齢マウスでは、SAH の重症度が高くなる傾向が認められた。また、SAH 作製後 72 時間までの生存率は若齢マウスに比較して老齢マウスで低い傾向が確認された。脳血流は若齢ならびに老齢マウスのいずれにおいても SAH 作製直後に低下した。若齢マウスにおいてはこれまでの知見と同様に SAH 後 72 時間程度までに Baseline 値 (SAH 作製前の値) に近い値まで回復した。一方、老齢マウスでは、若齢マウスとは異なる推移を辿り、脳血流の回復は Baseline 値の 50 - 60% 程度までの回復に留まる傾向を示した。またオープン・フィールド試験では、若齢ないし老齢マウスのいずれにおいても脳血流変化の推移に類似する結果が得られ、時間経過により活動量が回復する傾向が認められた。しかし、老齢マウスにおいては、若齢マウスに比較してその活動量の回復程度は低い傾向にあった。SAH 後 72 時間を実施した免疫組織化学による解析では、若齢ならびに老齢マウスのいずれにおいてもアストロサイトとマイクログリアの増加が確認された。

実験 2

若齢ないし老齢マウスのいずれにおいても、mTOR 活性阻害剤を投与する事による SAH 後の生存率の上昇は認められなかった。しかし、いずれの週齢においても mTOR 活性阻害剤投与群では非投与群に比較して SAH の重症度が低くなる傾向が認められた。また、脳血流や活動量においては、若齢マウスに比較して老齢マウスで顕著な効果が確認され、mTOR 活性阻害剤非投与群に比較しその回復の程度に有意差が認められた。免疫組織化学による定量的解析では、若齢ならびに老齢のいずれのマウスにおいても mTOR 活性阻害剤非投与群に比較し mTOR 活性阻害剤投与群において大脳皮質体性感覚野のアストロサイトやマイクログリアの数が少ない結果が得られた。

以上から、mTOR 活性阻害剤は若齢ならびに老齢マウスで作製した SAH において脳保護効果を発揮する事が示唆された。とりわけ、老齢マウスの SAH 後の脳血流や活動量の回復において顕著な効果が認められた。また、本剤は SAH 後の虚血性脳損傷に起因すると考えられる

アストロサイトやマイクログリアの増殖を抑制する効果を有する事も明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Sasaki K, Yamamoto S, Mutoh T, Tsuru Y, Taki Y, Kawashima R	4. 巻 45
2. 論文標題 Rapamycin protects against early brain injury independent of cerebral blood flow changes in a mouse model of subarachnoid haemorrhage.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology	6. 最初と最後の頁 859-862
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1440-1681.12950.	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 Yamamoto S, Mutoh T, Sasaki K, Mutoh T, Taki Y	4. 巻 144
2. 論文標題 Central action of rapamycin on early ischemic injury and related cardiac depression following experimental subarachnoid hemorrhage	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain Research Bulletin	6. 最初と最後の頁 85-91
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.brainresbull.2018.11.015.	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐々木一益、武藤達士、水流功春、瀧靖之、Suarez Jose、石川達哉
2. 発表標題 くも膜下出血モデルにおけるmTOR経路を介した早期脳損傷の抑制効果の検証
3. 学会等名 STROKE 2018
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	武藤 達士 (Mutoh Tatsushi) (80462472)	東北大学・加齢医学研究所・准教授 (11301)	

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
---------	---------