

令和 2 年 5 月 19 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16566

研究課題名(和文) くも膜下出血の新規予後予測アプローチと、急性期脳損傷に対する革新的応用治療の開発

研究課題名(英文) Development of novel treatment and prognostic prediction for acute brain injury after aneurysmal subarachnoid hemorrhage.

研究代表者

高瀬 創 (Takase, Hajime)

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：00549975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、炎症性メカニズムが大きく関与する中枢神経系の代表的疾患である「くも膜下出血」における可溶性VE-cadherinの役割について、臨床研究と基礎研究を用いたReverse-translational studyの手法を用いて解析と考察を行った。臨床面では、くも膜下出血の急性期における髄液中可溶性VE-cadherin濃度が、長期的予後と負の相関を有することが示された。一方で、初代培養細胞とモデル動物を用いた基礎研究では、同分子がミクログリアの炎症性活性を惹起していることが示唆され、くも膜下出血における新たな炎症障害性メカニズムの存在が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、くも膜下出血における血管内皮細胞由来分子-ミクログリアの新たなcell-cell interactionと、新たな神経炎症分子メカニズムの存在が示唆された。血管内皮の代謝分子VE-cadherinが、血液脳関門の恒常性維持という本来の役割にとどまらず、中枢神経系の炎症において新たな生物学的な機能を有することを示した点で、学術的意義も大きいと考えられる。これらの知見を他の中枢神経疾患に応用することで、新たな研究展開が可能であり、将来の治療開発を通して世界の社会福祉に大きく貢献できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We investigated the role of soluble vascular-endothelial (sVE) cadherin in aneurysmal subarachnoid hemorrhage (aSAH) that the inflammatory mechanism is strongly associated with the pathophysiology. The clinical part of our reverse-translational study demonstrated that CSF level of sVE-cadherin was negatively correlated with clinical outcome of aSAH patients. Additionally, the experimental part showed that sVE-cadherin activated an inflammatory cascade in microglia. These findings support the existence of a novel pathway by which sVE-cadherin, released from injured endothelium after SAH, can shift microglia into a more proinflammatory phenotype and contribute to neuroinflammation and poor outcome in SAH.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：くも膜下出血 急性期脳損傷 分子メカニズム 血管内皮 神経炎症 ミクログリア cell-cell interaction translational study

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) くも膜下出血 (SAH) と急性期脳損傷: 本邦の SAH 治療成績は、血管内治療を含めた医療技術の進歩により向上しているが劇的な進歩はない。40%前後を占める重症例の機能予後との相関が高いことが、その最大の原因として挙げられている (脳卒中ガイドライン 2009, 2015. 石川, 脳卒中の外科, 2008)。従来、機能予後決定因子は「主幹動脈攣縮による脳虚血」と「急性期脳灌流圧低下による微小環境障害」と考えられ積極的に研究が行われてきた。しかし、近年の大規模前向き臨床試験 (Macdonald, Stroke, 2008) により前者が否定され、現在、SAH 治療成績向上の Key は SAH 後急性期微小環境の病態解明とその応用治療にあると考えられている。

(2) 血管内皮細胞障害性マーカーとしての可溶性 VE-cadherin: VE-cadherin は、血管内皮細胞の接着結合を形成して血管の透過性や再生を調整し、血管系の安定性維持に不可欠な分子である。近年、その可溶性 (soluble) 細胞外ドメイン (sVE-cadherin) が血管炎症性疾患の血清で上昇することが示された。しかし同分子の役割は未だ不明であり、中枢神経系 (CNS) 内での発現や脳損傷疾患との関連も未知である。

(3) sVE-cadherin と SAH 機能予後と関連: In-vitro 環境では、TNF α や LPS などの炎症性分子が、ADAM10 や MMP などのプロテアーゼを介して、接着結合の脆弱化と sVE-cadherin の遊離を促すことが明らかとなった (Fleming, Cardiovasc Res, 2015)。これらの原因分子は SAH 急性期で上昇し、機能予後と相関することが報告されている (Chou, J Investig Med, 2012. Chou, Transl Stroke Res, 2011 他)。一方でこれらの分子は既存の SAH バイオマーカー同様、感度特異度の点から臨床応用には至っていない。sVE-cadherin は前述の炎症性・血管性因子よりカスケード下流に存在し、直接的な損傷由来分子であるため、機能予後に対してより鋭敏な生物指標となる可能性が高い。実際に、重症 SAH 症例の髄液を用いた予備実験では、sVE-cadherin は髄液中に存在し、予後不良群の SAH 発症 3-4 日目でも有意に高いなど、SAH 急性期損傷に鋭敏で機能予後の判定に劇的な変化をもたらす可能性が示された。

(4) sVE-cadherin が誘導する細胞障害経路の証明: しかし、sVE-cadherin が生物学的活性を有するか、また、それが損傷脳で障害的に作用するかは不明である。中枢神経系 (CNS) 以外での既報によると、①VE-cadherin の細胞外ドメイン 1 (EC1) は同種親和性を有し、定常時は cis/trans 結合を形成する (Vincent, Am J Physiol Cell Physiol, 2004)、②この結合は EC1 に対する中和抗体投与で阻害される (Dejana, J Cell Sci, 2008)、③sVE-cadherin も既存の EC1 に阻害的に作用し血管透過性を亢進する、ことが示されており、これらの知見を踏まえると sVE-cadherin は CNS でも何らかの生物学的作用を有する可能性は十分考えられる。また、CNS において血管透過性は特に疾患状態において重要であることから、sVE-cadherin の作用は組織障害に関与している可能性が強く示唆されている。

2. 研究の目的

本研究の対象分子である sVE-cadherin は、脳内に広く分布する血管内皮に由来するため、SAH のような広範に炎症が生じる疾患の良い血管損傷マーカーとなりうる。加えて本研究では、SAH 急性期の微小環境における新規の損傷メカニズムを明らかにすることで、当該メカニズム阻害を介した脳保護療法の、新規治療ターゲットとしての妥当性を検証する。

3. 研究の方法

(1) 生命・機能予後との関連: 前方循環の破裂動脈瘤によるくも膜下出血症例を対象とし、治療時の髄液検体を継時的に採取した。Western blot を用いて髄液中の sVE-cadherin フラグメン

トを確認し, ELISA を用いて髄液中濃度の定量を行った. Modified Rankin Scale (mRS) を用いて発症後 3, 6 ヶ月後の生命・機能予後を評価し, sVE-cadherin の生物学的予後マーカーとしての妥当性を評価した.

(2) 炎症性回路の同定: 脳微小血管内皮細胞に対する炎症性刺激により

sVE-cadherin が遊離することを確認した (Fig. 1). 次いで, 無細胞系で精製した

sVE-cadherin を初代培養ミクログリアに添加し, 炎症性反応を多角的に評価した

(Fig. 2). 更に, 炎症活性化ミクログリア内の細胞内シグナルを同定するために MyD88

阻害薬を用いて反応を検討した (Fig. 3).

マウス的大脑皮質に sVE-cadherin を微小注入し, 周囲のミクログリアの反応を, 免疫組織染色を用いて評価した (Fig. 4).

4. 研究成果

(1) 生命・機能予後との関連: 髄液中には全長 VE-cadherin はほぼ存在せず, 多くは細胞外フラグメント (sVE-cadherin) であった. 予後良好群 (mRS ≤ 2) と不良群 (mRS > 2) で比較すると, SAH 後急性期の髄液中 sVE-cadherin は後者で優位に高く, 生命・機能予後との有意な相関もみられた. 以上の結果より, 髄液中 sVE-cadherin は生命・機能予後を反映する早期の生物学的指標となりうることが示唆された.

(2) 炎症性回路の同定: sVE-cadherin はミクログリア内 NFκB の核内移行を促進して炎症活性を誘導し, iNOS と IL-1β の産生を亢進することが明らかとなった. これらの現象は MyD88 阻害薬の前治療により現じることから, sVE-cadherin は, MyD88-NFκB のシグナル回路を介してミクログリアの炎症活性に関与していることが判明した (Takase et al, Neurology, 2020).

(3) まとめ: 以上の知見から, くも膜下出血の急性期に上昇した sVE-cadherin が, 新たな神経炎症回路を介して中枢神経障害の起点となっている可能性が示唆された. 今回の結果は, 今後のカスケード阻害による治療や, sVE-cadherin の構造解析による低分子阻害薬の開発といった新たな画期的な治療開発の大きな基盤となるものと考えられた. また, 本研究は, ①VE-cadherin の中枢神経における新たな生物学的機能を示した点, ②中枢神経系の新たな cell-cell interaction に基づく神経炎症のメカニズムを提唱し, これにより他の炎症性疾患の病態解明や新規治療開発に繋がる可能性があることから, 学術的意義も非常に高いと考えられる.

上; Fig.1, 中; Fig.2, 下; Fig.3

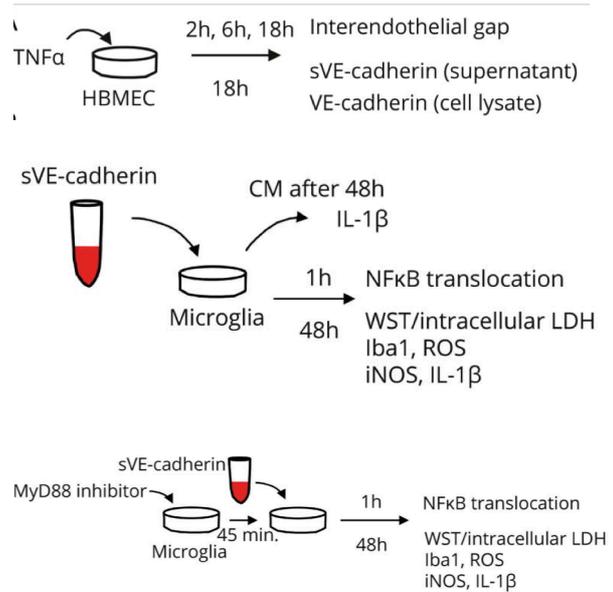
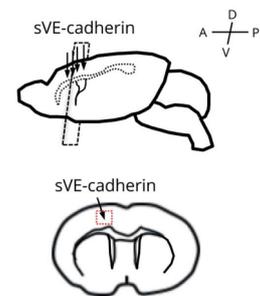


Fig.4



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計17件（うち査読付論文 16件 / うち国際共著 10件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takase H, Murata H, Sato M, Tanaka T, Miyazaki R, Yoshizumi T, Tateishi K, Kawahara N, Yamamoto T	4. 巻 50(18)
2. 論文標題 Delayed C5 Palsy After Anterior Cervical Decompression Surgery: Preoperative Foraminal Stenosis and Postoperative Spinal Cord Shift Increase the Risk of Palsy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 World Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 8732049-7.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.wneu.2018.08.240	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 Takase H, Liang AC, Miyamoto N, Hamanaka G, Ohtomo R, Maki T, Pham LD, Lok J, Lo EH, Arai K.	4. 巻 6;668
2. 論文標題 Protective effects of a radical scavenger edaravone on oligodendrocyte precursor cells against oxidative stress.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurosci Letters	6. 最初と最後の頁 120-125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2018.01.018.	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 該当する
1. 著者名 Takase H, Lok J, Arai K.	4. 巻 13(9)
2. 論文標題 A radical scavenger edaravone and oligodendrocyte protection/regeneration.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neural Regen Res	6. 最初と最後の頁 1550-1551
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4103/1673-5374.237116.	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 Hamanaka G, Ohtomo R, Takase H, Lok J, Arai K	4. 巻 4 (3)
2. 論文標題 White-matter repair: Interaction between oligodendrocytes and the neurovascular unit	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Brain Circulation	6. 最初と最後の頁 118-123
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4103/bc.bc_15_18.	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 Hamanaka G, Ohtomo R, Takase H, Lok J, Arai K.	4. 巻 25;684
2. 論文標題 Role of oligodendrocyte-neurovascular unit in white matter repair.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurosci Lett	6. 最初と最後の頁 175-180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2018.07.016.	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 該当する

1. 著者名 Sato M, Tateishi K, Murata H, Kin T, Suenaga J, Takase H, Yoneyama T, Nishii T, Tateishi U, Yamamoto T, Saito N, Inoue T, Kawahara N.	4. 巻 26
2. 論文標題 Three-dimensional multimodality fusion imaging as an educational and planning tool for deep-seated meningiomas.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Br J Neurosurg	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/02688697.2018.1485877.	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 伊藤博崇、北村洋平、清川樹里、五味正憲、杉本至健、高瀬創、千田光平、長嶋宏明、原岡怜、柳澤毅、Emiri T, Mandeville、脇本浩明	4. 巻 8
2. 論文標題 「ポストン日本人脳外科医の会」便り	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 脳神経外科速報	6. 最初と最後の頁 818-822
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 大友亮、高瀬創	4. 巻 4
2. 論文標題 進行性の認知機能低下を来している高齢者の脳出血	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 内科	6. 最初と最後の頁 843-844
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Takase H, Chou SH, Hamanaka G, Ohtomo R, Islam MR, Lee JW, Hsu L, Mathew J, Reyes-Bricio E, Hayakawa K, Xing C, Ning MM, Wang X, Arai K, Lo EH, Lok J.	4. 巻 94(12)
2. 論文標題 Soluble vascular endothelial-cadherin in CSF after subarachnoid hemorrhage.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurology	6. 最初と最後の頁 e1281-e1293
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1212/WNL.0000000000008868	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 該当する

1. 著者名 Hamanaka G, Kubo T, Ohtomo R, Takase H, Reyes-Bricio E, Oribe S, Osumi N, Lok J, Lo EH, Arai K.	4. 巻 68(7)
2. 論文標題 Microglial responses after phagocytosis: Escherichia coli bioparticles, but not cell debris or amyloid beta, induce matrix metalloproteinase-9 secretion in cultured rat primary microglial cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Glia	6. 最初と最後の頁 1435-1444
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/glia.23791.	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 該当する

1. 著者名 Ueno R, Takase H*, Suenaga J, Kishimoto M, Kurihara Y, Takei K, Kawahara N, Yamamoto T.	4. 巻 323
2. 論文標題 Axonal regeneration and functional recovery driven by endogenous Nogo receptor antagonist LOTUS in a rat model of unilateral pyramidotomy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Exp Neurol	6. 最初と最後の頁 113068
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.expneurol.2019.113068.	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 Regenhardt RW, Takase H, Lo EH, Lin DJ.	4. 巻 38(1):
2. 論文標題 Translating concepts of neural repair after stroke: Structural and functional targets for recovery.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Restor Neurol Neurosci	6. 最初と最後の頁 67-92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/RNN-190978.	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 該当する

1. 著者名 Miyake S, Suenaga J, Miyazaki R, Sasame J, Akimoto T, Tanaka T, Ohtake M, Takase H, Tateishi K, Shimizu N, Murata H, Funakoshi K, Yamamoto T.	4. 巻 N/A
2. 論文標題 Thiel's embalming method with additional intra-cerebral ventricular formalin injection (TEIF) for cadaver training of head and brain surgery.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anat Sci Int	6. 最初と最後の頁 N/A
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12565-020-00545-z.	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 Ohtomo R, Kinoshita K, Ohtomo G, Takase H, Hamanaka G, Washida K, Islam MR, Wrann CD, Katsuki H, Iwata A, Lok J, Lo EH, Arai K.	4. 巻 N/A
2. 論文標題 Treadmill Exercise Suppresses Cognitive Decline and Increases White Matter Oligodendrocyte Precursor Cells in a Mouse Model of Prolonged Cerebral Hypoperfusion.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Transl Stroke Res	6. 最初と最後の頁 N/A
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12975-019-00734-7.	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 該当する

1. 著者名 Kishimoto M, Suenaga J, Takase H, Araki K, Yao T, Fujimura T, Murayama K, Okumura K, Ueno R, Shimizu N, Kawahara N, Yamamoto T, Seko Y.	4. 巻 9(1)
2. 論文標題 Oxidative stress-responsive apoptosis inducing protein (ORAIP) plays a critical role in cerebral ischemia/reperfusion injury.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 13512
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-50073-8.	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 Maki T, Morancho A, Martinez-San Segundo P, Hayakawa K, Takase H, Liang AC, Gabriel-Salazar M, Medina-Gutiérrez E, Washida K, Montaner J, Lok J, Lo EH, Arai K, Rose II A.	4. 巻 49(4)
2. 論文標題 Endothelial Progenitor Cell Secretome and Oligovascular Repair in a Mouse Model of Prolonged Cerebral Hypoperfusion.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stroke	6. 最初と最後の頁 1003-1010
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/STROKEAHA.117.019346.	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 該当する

1. 著者名 Takase H, Washida K, Hayakawa K, Arai K, Wang X, Lo EH, Lok J.	4. 巻 15;340
2. 論文標題 Oligodendrogenesis after traumatic brain injury.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Behav Brain Res.	6. 最初と最後の頁 205-211
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbr.2016.10.042.	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 該当する

[学会発表] 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Takase H, Chung JY, Wu L, Wang X, Lo EH, Whalen MJ, Arai K, Lok J
2. 発表標題 Oligodendrocyte injury in concussive brain injury
3. 学会等名 Neurotrauma 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takase H, Chou SH, Arai K, Lo EH, Lok J
2. 発表標題 Soluble VE-cadherin is elevated in CSF in Subarachnoid Hemorrhage
3. 学会等名 10th Annual MGHFC Research Day (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takase H, Ohtomo R, Wang X, Lo EH, Chung JY, Whalen MJ, Arai K, Lok J
2. 発表標題 White matter damage and microglial alterations after concussive brain injury.
3. 学会等名 BRAIN 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ohtomo R, Ohtomo G, Takase H, Hamanaka G, Iwata A, Lok J, Lo EH, Arai K
2. 発表標題 Treadmill exercise suppresses cognitive decline and increases white matter oligodendrocyte precursor cells in a mouse model of prolonged cerebral hypoperfusion
3. 学会等名 BRAIN 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shindo A, Ohtomo R, Takase H, Hamanaka G, Maki T, Egawa N, Lok J, Tomimoto H, Lo EH, Arai K
2. 発表標題 Biphasic roles of pentraxin 3 in cerebrovascular responses after white matter stroke
3. 学会等名 BRAIN 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Microglial responses after phagocytosis: e. coli bioparticles, but not cell debris or amyloid beta, induce matrix metalloproteinase-9 secretion in vitro
2. 発表標題 Hamanaka G, Ohtomo R, Takase H, Lok J, Lo EH, Arai K
3. 学会等名 BRAIN 2019 (国際学会)
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
研究協力者	末永 潤 (Suenaga Jun)		

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
研究協力者	上野 龍 (Ueno Ryu)		
研究協力者	岸本 真雄 (Kishimoto Masao)		