

令和 2 年 5 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16571

研究課題名(和文) NVU統合性保持によるSAH後遅発性虚血性脳障害に対する新規脳保護療法の開発

研究課題名(英文) the development of medcaion with the retention of neurovascular unit to alleviate early brain injury in subarachnoid hemorrhage

研究代表者

荒井 信彦 (ARAI, NOBUHIKO)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：80793801

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)：近年、くも膜下出血の予後を規定する因子として初期出血の際に生じるearly brain injuryという概念がある。これはneurovascular unitの統合性破綻により引き起こされると考えられている。今回、我々は先行研究により神経細胞の脱落は認めず、更に遅発性に神経機能障害が生じるくも膜下出血モデルマウスを用いて実験を実施した。ペランパネル・エダラボンを介入薬物として、sham群と比較して、血管内皮細胞・神経細胞の破綻の程度とモデルマウスの運動能を解析したところ、両薬物で改善効果があることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Early brain injuryはくも膜下出血の予後を規定する一つの要素である。未だに適切な治療薬の同定・開発は行われていない。今回の研究成果としてはin vivoでearly brain injuryの抑制とその後の機能予後改善を示したものである。今後は人体に対してその結果の応用実験をすることで重症のくも膜下出血の生命予後改善や軽症-中等症程度のくも膜下出血の機能予後改善が見込まれる。

研究成果の概要(英文)：Recently, the factor stipulating the prognosis of subarachnoid hemorrhage (SAH) has been reported to be the early brain injury (EBI) caused in initial bleeding from the aneurysm. EBI is engendered by the demolition and dysfunction of neurovascular unit (NVU). This time, we used the SAH model mouse in which the retention of neuron and delayed neurological dysfunction was verified. Perampanel and Edaravone were the candidate to alleviate EBI. In comparison with sham group, the group under both groups ended up with significantly better results in the experiment which evaluates the destruction of NVU(disappearance of neurons and endothelial cells) and motor ability of model mouse.

研究分野：くも膜下出血

キーワード：neurovascular unit くも膜下出血 early brain injury 脳保護 エダラボン ペランパネル 脳循環代謝 くも膜下出血マウスモデル

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。

1. 研究開始当初の背景

動脈瘤破裂によるくも膜下出血では再出血、脳血管攣縮、水頭症の3つの病態が出血後に引き起こされる。この中で、特に脳血管攣縮が神経学的予後に強く影響を与えると古典的には考えられていた。しかしながら、近年 conscious study^{1,2}において、脳血管攣縮の改善は遅発性脳虚血障害や生命予後の改善に必ずしも寄与しないことが証明された。そこで最近、早期脳損傷 = early brain injury (EBI) という概念がある。これは出血発症後4日以内引き起こされる病態で、脳血管攣縮以外で、遅発性脳虚血障害に強く影響する可能性がある病態である。くも膜下出血の更なる予後改善の為には早期脳損傷をターゲットとすることが必要であると考えられ始めた。

2. 研究の目的

早期脳損傷は出血に伴う頭蓋内圧亢進により、神経細胞、血管内皮細胞、神経膠細胞から構成される Neurovascular unit (NVU) が機能不全を起こすことで、脳浮腫や神経細胞のアポトーシスを引き起こし、脳に恒久的ダメージを与えることが本態と考えられている。つまり早期脳損傷を抑制するということはくも膜下出血において NVU の形態的・機能的連関の保持をするということである。以上より本研究の目的は脳血管攣縮以外で強力な神経学的予後の規定要素とされる早期脳損傷のカスケードが進むことを抑制する作用のある薬物の同定をすることを目的としている。

3. 研究の方法

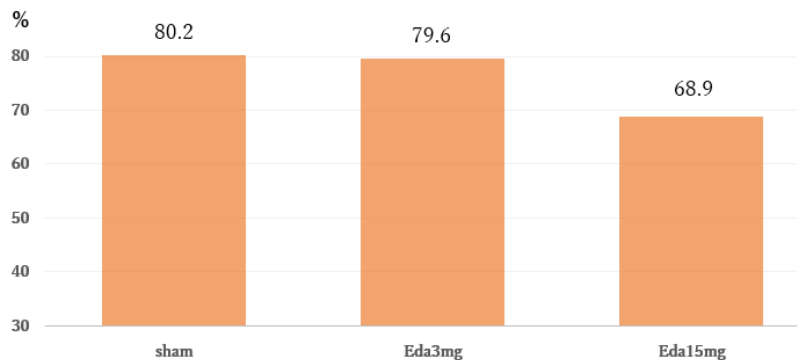
早期脳損傷が引き起こされることが確認されているくも膜下出血モデル(注入モデル: 顔面静脈叢より採取した自家血を5秒間で定量的に脳底槽へシリンジで注入)を使用することで実験を実施した。このモデルは内皮細胞の一過性脱落と神経細胞の遅発性のアポトーシスが証明されている。外傷後や脳梗塞後に NVU を構成する blood brain barrier (BBB) の機能保持することで脳保護作用を有することが基礎実験で証明されており、臨床的にも脳梗塞後に使用されているエダラポンを EBI に対する薬剤として検討した。SAH model 作成1時間前に生理食塩水もしくはエダラポン 3mg/kg、エダラポン 15mg/kg を 2cc 腹腔内投与した。(1) 実験1として SAH 作成24時間後に各群のマウスを sacrifice し、脳を摘出、重さを測定し、 $[(\text{wet weight} - \text{dry weight}) / \text{wet weight}] * 100\%$ の計算式により、脳浮腫率を計算し、比較検討した。(2) 実験2としてモデル作成24時間後に前角レベルの脳を切片として、基底膜 (Type collagen), 神経膠細胞 (GFAP), DAPI による免疫染色を実施。形態的観察と NVU 機能不全によりアポトーシスなどで減少した生存する神経細胞の数を測定し、比較検討した。(3) 実験3として行動解析を実施。第24, 48, 72時間後に modified Garcia score による神経機能点数、balance beam, balance walk 試験などによる運動機能検査を実施し、統計的に解析した。

4. 研究成果

(1) 脳浮腫率

脳浮腫率はモデル作成24時間後に sacrifice 直後に測定した脳重量を wet weight として、そこから100で72hr乾燥させて測定した脳重量を dry weight として、 $[(\text{wet weight} - \text{dry weight}) / \text{wet weight}] * 100\%$ という計算式で脳浮腫率を計算したところ、sham 群は 80.2%、エダラポン 3mg は 79.6%、エダラポン 15mg 群は 68.9% であり、エダラポン負荷をした方がしない群より、またエダラポン投与群に関しても投与量が多い方が脳浮腫率は改善していた。

図1 各群における脳浮腫率



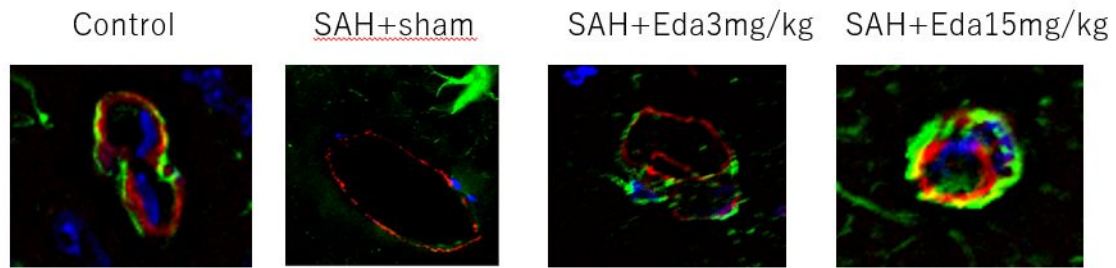
Eda:edaravone

(2) 免疫染色

モデル作成後24時間の時点で sacrifice し、クリオスタットにて切片を作成。内皮細胞、アストロサイトについては一次染色した後に Alexa568, Alexa488 (緑) にて二次染色を実施。核に関し

では DAPI(青)で染色し観察した。下記の通り、control 群と比較して、モデル群では内皮細胞基底膜の菲薄化とアストロサイトの脱落を認める。Eda 群では内皮細胞基底膜はモデル + sham 群と比較すると保たれており、アストロサイトの脱落程度も弱いと見て取れた。

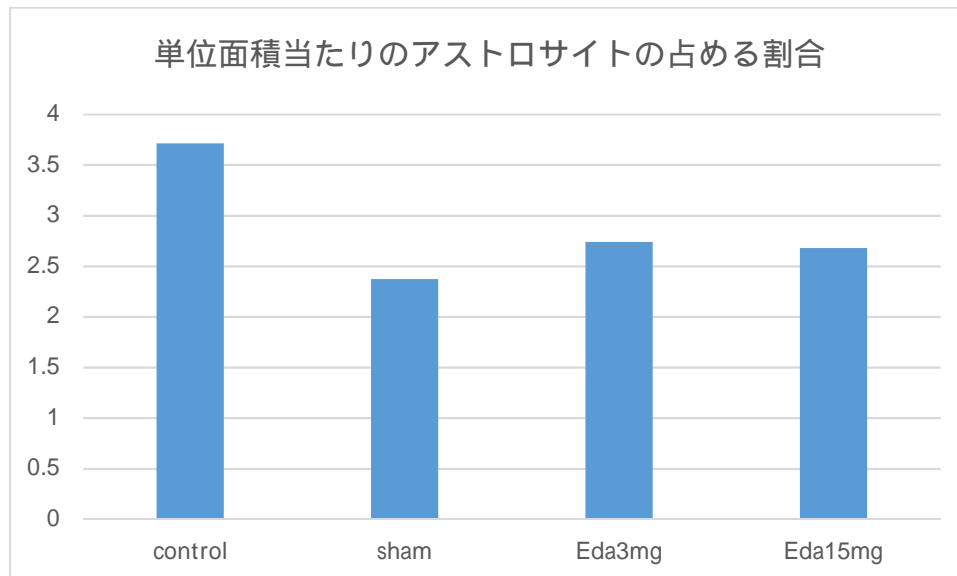
図 2 各群における内皮細胞・アストロサイト・核の染色



Eda:edaravone

またアストロサイトの脱落について検討したところ control では 3.71%、モデル + sham 群では 2.37%、モデル + エダラボン 3mg 群では 2.74%、15mg 群では 2.68%であった。

図 3 前角レベルで単位面積当たりのアストロサイトの占める割合

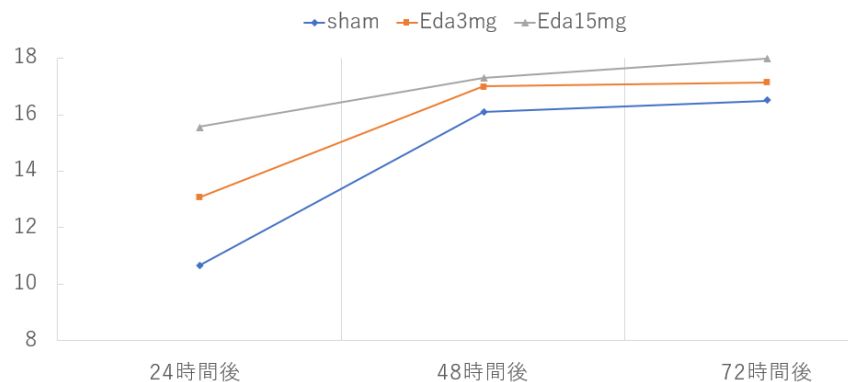


Eda:edaravone

(3)機能試験

神経機能スコアをつけたところ sham 群では 24 時間後で 10.67/18、48 時間後で 16.1/18、72 時間後で 16.5/18 であり、エダラボン 3mg 群では 24 時間後は 13.1/18、48 時間後は 17/18、72 時間後は 17.1/18、エダラボン 15mg 負荷群は 24 時間で 15.57/18、48 時間で 17.3/18、72 時間で 18/18 であった。

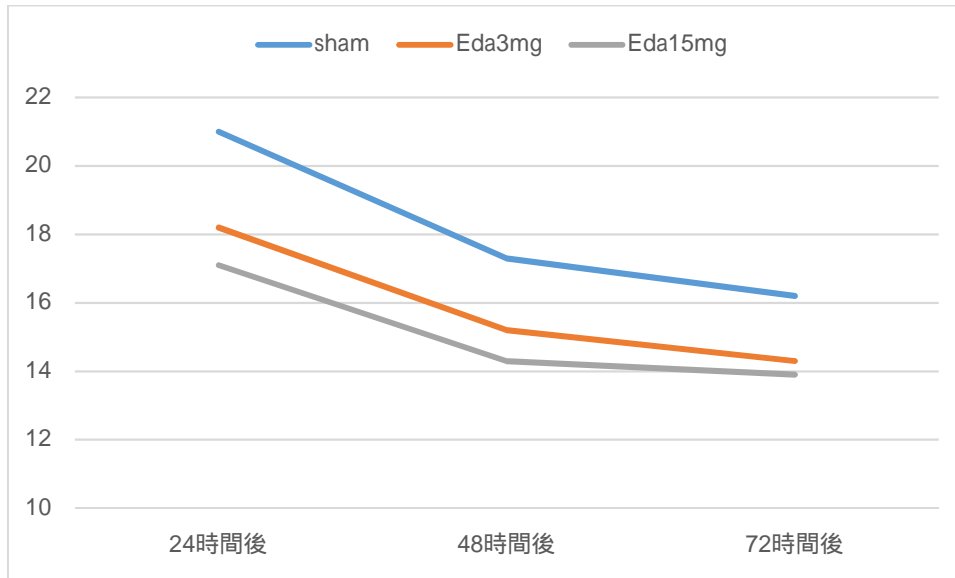
図 4 Modified Garcia score



Eda:edaravone

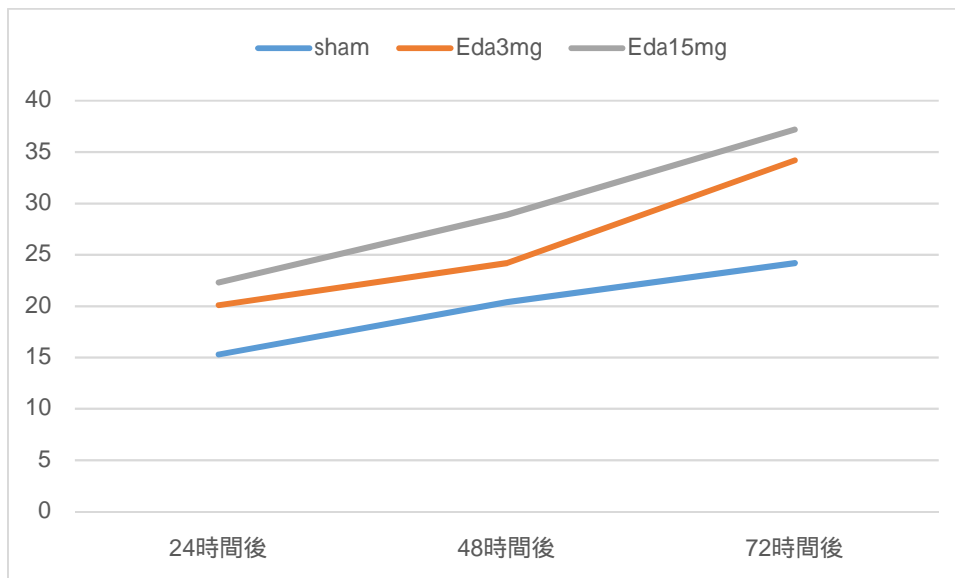
下記の図 5,6 の通り balance beam/walk test でも sham 群よりも Eda3mg、更に Eda15mg の方が運動機能評価値も改善傾向を示した。Balance walk test の結果は(24/48/72hr 値)で sham(21/17.3/16.1 秒)、エダラボン 3mg(18.2/15.2/14.3 秒)、エダラボン 15mg(17.1/14.3/13.9 秒)であった。また balance beam test では同様に sham(15.3/20.4/24.2 秒)、エダラボン 3mg(20.1/24.2/34.2 秒)、エダラボン 15mg(22.3/28.9/37.2 秒)であった。

図 5 balance walk test



Eda:edaravone

図 6 balance walk test



Eda:edaravone

以上よりエダラボンはくも膜下出血の発症 1 時間前に投与すれば、早期脳損傷を抑制し、脳浮腫や神経細胞脱落の抑制により、運動機能及び神経学的予後の改善に寄与する可能性が示唆された。今後はくも膜下出血の患者にエダラボンを投与することで、神経学的予後の改善が認められるか検証する必要があると思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----