

令和 3 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16583

研究課題名(和文) くも膜下出血後早期脳損傷における皮質拡延性抑制と癲癇の関連の解明と新規治療法探索

研究課題名(英文) Research for early brain injury after subarachnoid hemorrhage about the mechanism of cortical spreading depression and seizure

研究代表者

角野 喜則 (Kadono, Yoshinori)

大阪大学・医学系研究科・特任研究員

研究者番号：60770675

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：今研究では、くも膜下出血(SAH)モデルラットによるSAH後早期脳損傷(EBI)に関する実験を実施した。自己血注入法モデルを用い、グルタミン酸系を介した神経興奮とEBIの関係を明らかにするために抗てんかん薬を用いた実験を行った。生存率や神経予後について、現時点では有意な結果は得られていない。その他の脳損傷の指標については、予想されたCSDやてんかんなどの神経興奮が、EBIの悪化に関連していることを示唆するデータがあり、今後は、重症度や薬剤の投与量、投与時期や判定時期などを調整し、実験の継続を予定している。臨床応用可能な治療法の探索を目指すため、このデータを用いた臨床研究を計画している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果は、SAH後のEBIのメカニズム解明につながる脳血流異常と、てんかん性放電を確認でき、これにグルタミン酸系が関与することが明らかになった。重症SAHにおけるEBIは、患者の予後不良因子となるため、今後これに対する薬物治療や外科的介入判断などにも寄与する病態の解明が待たれる。今研究により、抗てんかん薬などによる薬物治療法のさらなる開発の一助となることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：We conducted research on post subarachnoid hemorrhage (SAH) early brain injury (EBI) model rats in this study. Using an interhemispheric autologous blood injection model, we conducted experiments using antiepileptic drugs to clarify the relationship between nerve excitement through glutamate acid and EBI. We could not have a significant result on survival rate or neurological prognosis. As for other indicators of early brain injury, there are data suggesting that the expected nerve excitement such as cortical spreading depression and epileptic wave are associated with worsening of EBI. We are planning to continue the experiment by adjusting the timing or dose of a drug in order to clarify the proceeding data. On the other hand, we are planning clinical research using this data in order to search for clinically applicable treatments.

研究分野：脳血管障害

キーワード：くも膜下出血 早期脳損傷 てんかん Early Brain Injury CSD AMPA

1. 研究開始当初の背景

臨床的背景

脳血管障害である脳卒中は、現在も死因の上位を占め、要介護者の原因疾患の多数を占める重要な疾患である。脳卒中のうち、くも膜下出血(SAH)はその中でも重篤な経過をたどることで知られる。その致死率や要介護率の高さに加え、発症年齢が他の脳卒中よりも若いことも勘案すると、本疾患がもたらす社会的な損失は大きい。SAH発症の急性期における開頭術や血管内手術で再出血による死亡が減少出来るようになった現在においても、重症例の生存率や社会復帰率は依然として低い。これまでの報告にもあるとおり、研究代表者の後方視的な解析においても、重症例とくに外科治療までの脳神経機能の障害があった症例においては、治療の成功不成功によらず予後が不良で、その原因や治療法の解明が必要と考えられた。

<研究背景>

これまでは、発症数日してからおきる脳血管攣縮が原因とされる遅発性脳障害が、本症の予後増悪に大きく関係しているとされ、多くの研究がなされてきた。近年はこれに加え、SAH発症直後に観察され、重症化に大きく影響する早期脳損傷(Early brain injury: EBI)が遅発性脳障害の原因のひとつと考えられ、このEBIがより重要と考えられるようになり注目されている。EBIの病態は、急激な頭蓋内圧の上昇や脳脊髄液の循環不全、脳灌流低下による脳虚血や脳浮腫などが複雑に関与しながら、皮質拡延性抑制(Cortical Spreading Depolarization: CSD)や血液脳関門の破綻などを経て神経細胞死や内皮細胞死が導かれることがいわれている。また、SAH急性期の病態として非痙攣性癲癇重責状態(Non-convulsive status epilepticus: NCSE)が注目されているが、CSDと同様にEBIに関連しておこる一連の電気生理学的な異常な病態の一部と考えられ、その詳細の解明には至っていない。当科では、これまで脳梗塞モデルや、てんかんモデルに対して、レーザースペックル脳血流計や脳表電極を用いた解析を行ってきた背景があり、このEBIの病態の解明にも応用できると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、SAH発症後のEBIへのCSDやNCSEの与える影響を解明するため、SAHモデル動物の脳皮質内血流変化やCSDなどの電気生理学的変化を測定し、モデル動物の脳皮質に起こる現象とCSDや脳波異常の関係を明らかにする。その上で、CSDや痙攣発作と関わるグルタミン酸系による神経細胞の過剰興奮を抑え、神経保護作用も期待しうる抗てんかん薬をそれらの動物に加え、CSDやてんかんによる神経細胞の異常興奮やグルタミン酸系の亢進の抑制が、SAH発症後の神経細胞や血管内皮細胞のアポトーシスや、神経機能に与える影響を解析し、これらの病態に対する、新たな治療法の効果と適応の確立を目指した。

3. 研究の方法

SDラット(300-400g)を用いて、定位的に自己血注入法にてSAHモデルを作成した。脳圧モニターにてSAHの重症度を調整した。対照(非SAH)群は、生理食塩水を注入した。経頭蓋で脳血流を観察しCSDやてんかん波の有無を判定した。十分に麻酔の覚醒を待ち、ゲージに戻し、翌日まで観察した。神経学的な評価を、術前および術後24hにGarcia test(3-18)によりスコアリングした。さらに24h後において安楽死処置を行ない、脳を取り出し、SAHの程度を脳

槽の血液量で評価したのち、含水量を測定するため脳の重量を計測した。凍結切片を用いた TUNEL 法にて海馬および皮質における神経細胞の壊死、炎症細胞浸潤の状態を計測した。還流固定した標本を用いた免疫染色および ELISA にて炎症マーカーの発現の評価を行い、EBI の程度を評価した。治療薬として、グルタミン酸受容体のうち、選択的に AMPA 受容体を拮抗作用のある薬剤 2mg/Kg をモデル作成前 30 分に経腹腔で投与し、偽薬群は生理食塩水を同様に腹腔内に投与した。それぞれの条件において同様に CSD や脳波異常、神経学的スコアを測定、介入のタイミングと投与量の組み合わせについて効果を検討した。

4 . 研究成果

SAH モデルにおいては、大脳皮質における CSD の発生がみられ、脳波の徐波化がみられた。神経症状はシャム群と比較し有意な低下を認め (12.1 vs 16.1)、脳浮腫の増悪 (79.6% vs 76.2%)、血液脳関門の損傷 (Evans Blue Extravasation 1.79 vs 0.059)、Apoptosis においても差を認めた (19.6% vs 2.9%)。さらに免疫染色を行い好中球浸潤の増加 (307 vs 26/mm²)、活性化ミクログリアの増加を認めた (98 vs 51/mm²)。これら炎症マーカーの上昇は、CSD 発生との相関がみられ、生存率や神経学的予後に影響している可能性が示唆された。

行った実験の範囲では、薬剤投与群と対象群による CSD 発生頻度や、神経学的スコアの改善は見られなかった。自己血注入法においては重症度が低く、その発生頻度が十分に検討できない可能性があり、現在重症度を調整して、薬剤投与量を変更し、再実験を行っている。これらの結果を踏まえた結果を総評し、グルタミン酸受容体を介した興奮性神経伝達が、SAH 後の EBI に対して与える影響を明らかにし、公表を予定している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Y Kadono, Y Nakamura, Y Ogawa, S Yamamoto, R Kajikawa, Y Nakajima, M Matsumoto, H Kishima | 4. 巻 80 |
| 2. 論文標題 A case of COVID-19 infection presenting with a seizure following severe brain edema | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Seizure | 6. 最初と最後の頁 53-55 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.seizure.2020.06.015. | 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 該当する |

| | |
|---|--------------------|
| 1. 著者名 Kadono Y, Koguchi K, Okada KI, Hosomi K, Hiraishi M, Ueguchi T, Kida I, Shah A, Liu G, Saitoh Y. | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Repetitive transcranial magnetic stimulation restores altered functional connectivity of central poststroke pain model monkeys | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 6126 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-85409-w. | 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 Yoshinori Kadono, Hajime Nakamura, Shunsuke Saito, Takeo Nishida, Masatoshi Takagaki, Tomoyoshi Shigematsu, Katsunori Asai, Tomoaki Murakami, Kenichi Todo, Toshiyuki Fujinaka, Manabu Sakaguchi, Koichi Toda, Yoshiki Sawa, Haruhiko Kishima | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Endovascular treatment for large vessel occlusion stroke in patients with ventricular assist devices. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Journal of neurointerventional surgery | 6. 最初と最後の頁 1205 - 1209 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/neurintsurg-2018-014645 | 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 T Murakami, T Nishida, K Asai, Y Kadono, H Nakamura, T Fujinaka, H Kishima | 4. 巻 40 |
| 2. 論文標題 Long-Term Results and Follow-Up Examinations after Endovascular Embolization for Cerebral Aneurysms. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 American journal of neuroradiology | 6. 最初と最後の頁 1191 - 1196 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3174/ajnr.A6101 | 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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 角野 喜則, 西田 武生, 山本 祥太, 梶川 隆一郎, 中島 義和, 貴島 晴彦 |
| 2. 発表標題 頭部外傷後の症候性遅発性脳血管攣縮の2例 |
| 3. 学会等名 第75回日本脳神経外科学会学術総会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 角野 喜則, 中村 雄作, 山本 祥太, 梶川 隆一郎, 中島 義和, 松本 昌泰, 貴島 晴彦 |
| 2. 発表標題 COVID19感染により再燃を繰り返した脳卒中後てんかんの一例 |
| 3. 学会等名 第46回日本脳卒中学会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 角野喜則、中村 元、西田武生、浅井克則、吉矢和久、射場治郎、島津岳士、藤中俊之、貴島晴彦 |
| 2. 発表標題 重症くも膜下出血における入院時予後予測因子の検討 |
| 3. 学会等名 第48回日本脳卒中の外科学会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yoshinori Kadono, Koichi Hosomi, Ken-ichi Okada, Motoki Hiraishi, Keigo Koguchi, Guoxiang Liu, Ikuhiro Kida, Takashi Ueguchi, Yasushi Kobayashi & Yoichi Saitoh |
| 2. 発表標題 Effect of Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation on Neuronal Network for Central Post-stroke Pain Model Monkeys |
| 3. 学会等名 The 41st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (国際学会) |
| 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 |
|-------|---|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 中村 元 (Nakamura Hajime) (80533794) | | |
| 研究協力者 | 高垣 匡寿 (Takagaki Masatoshi) (70724433) | | |
| 研究協力者 | 川端 修平 (Kawabata Shuhei) (20764062) | | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|