

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K09459

研究課題名（和文）視床下部傷害に着目したくも膜下出血の新たな予後決定病態の解明

研究課題名（英文）Significant Prognostic Pathophysiology of Subarachnoid Hemorrhage Focusing on Hypothalamic Injury

研究代表者

長谷川 雄（Hasegawa, Yu）

国際医療福祉大学・福岡薬学部・教授

研究者番号：40599114

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：前回の申請研究では、腎除神経術は視床下部傷害を軽減し交感神経活動を抑制した結果SAH後の脳血管攣縮が改善することを示した。本研究では、視床下部傷害に由来するSAH後の脳血管の形態的変化の特徴を調べた。その結果、超急性期の脳動脈の不安定性と脳静脈のうっ滞、24時間後の脳動静脈の攣縮を認めた。次に、交感神経の活性化に関与する脳血管周囲マクロファージを薬理的に失活させたところ、急性期予後は改善するが、その効果は脳実質内の細胞障害性変化ではなくSAH後超急性期脳血流低下の抑制と関連した。以上の結果から、SAH後視床下部傷害は予後と直結する脳血管動静脈傷害や超急性期脳血流低下と関連することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カテコラミンサージと関連すると考えられるSAH後視床下部傷害について、予後と直結する脳血管動静脈傷害や超急性期脳血流低下に影響することが考えられた。一方、SAH後の早期脳損傷と脳血管攣縮はそれぞれ全脳虚血と局所脳虚血により脳損傷が起こる。視床下部傷害は超急性期の病態形成に加えて、その二大予後決定病態のトリガーとなっている可能性も示唆される結果となった。

研究成果の概要（英文）：In the previous study, renal denervation reduced hypothalamic injury via sympathetic nerve deactivation and improved cerebral vasospasm after SAH. In this study, we investigated the morphological changes in cerebral vessels post-SAH due to hypothalamic injury. The results demonstrated that instability in cerebral arteries and congestion in cerebral veins during the hyperacute phase, and vasospasm in both cerebral arteries and veins at 24 hours after SAH. Next, pharmacological deactivation of perivascular macrophages, which are involved in sympathetic activation, improved neurological function after SAH. This effect was associated with the suppression of cerebral blood flow reduction in the hyperacute phase, rather than cytotoxic changes in the brain parenchyma. These findings suggest that hypothalamic injury after SAH is linked to cerebral vasculature damage and hyperacute cerebral blood flow reduction, both of which directly impact prognosis.

研究分野：基礎脳卒中学

キーワード：Subarachnoid hemorrhage hypothalamus sympathetic nerve Perivascular macrophage arterial instability venous congestion cerebral blood flow rat

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

くも膜下出血(subarachnoid hemorrhage : SAH)の予後を規定する病態として、発症～3日以内の頭蓋内圧上昇後の全脳虚血に由来する早期脳損傷と、SAH発症4-14日後の虚血性神経脱落症状や脳梗塞を引き起こす遅発性脳虚血(脳血管攣縮)が知られている[1]。それらについては長年研究されてきたが、これまでSAH患者の予後改善は得られていない。従って、申請者は他の新たな予後決定病態を探索する必要があると考えた。

一方、10%超のSAH患者が病院到着前に命を落とす。この致死性SAHの主な原因は、発症直後に生じるカテコラミンサーージが不整脈や神経原性肺水腫等を生じさせること直接的に間脳へ機械的圧迫が加わることと考えられている。カテコラミンサーージや自律神経の中枢である間脳(視床下部と脳幹)への刺激による交感神経活性化は以前より知られており、1970年代を中心に研究されていた。しかし、血中ノルアドレナリンがSAH後短時間で正常化、脳血管の交感神経終末にあるノルアドレナリンがすぐに枯渇、脳血管の交感神経に対する過敏性亢進は持続する、ことが明らかとなったが、ノルアドレナリンを標的とした交感神経抑制薬はSAHの予後に効果無し、と報告され、SAH後交感神経活動が脳の病態に大きく関与することが確認されており、現在ではほとんど研究されていない。

近年申請者は、SAH後視床下部傷害を腎除神経術にて軽減させると脳血管攣縮が改善されることを発見した(科研費番号JSPS 科研費15K10309)。この結果は、交感神経系の上位中枢である視床下部が脳血流供給を担う脳動脈径を制御し、視床下部傷害が起こるとSAHの予後を決定する有意な血管攣縮が生じることを示唆する。従って本研究では、視床下部傷害によるSAH後の脳血管毒性や交感神経活性を修飾する脳血管周囲マクロファージ(Perivascular macrophage: PVM)に着目してSAHの新たな病態にせまる。

2. 研究の目的

以上から、脳血管はSAH直後からどのような形態変化を起こすのか、SAH超急性期における脳動静脈の動的・静的形態変化を中心に脳血管毒性を検討すること[2]、血液脳関門が脆弱な視床下部ではPVMがその環境保全の一部を担っており、視床下部と連携し交感神経活動を制御していると考えられている。この点に着目し、PVMのはたらきを薬理的に制御しSAHの病態がどのように表現されるかについて検討すること[3]、の2つを本申請研究の目的とした。

3. 研究の方法

モデル作成

SAHモデルは視交叉前槽への血液注入法にて作成した。吸入用イソフルレンを用いて麻酔を導入・維持、仰臥位にて尾動脈にポリエチレンチューブを挿入し血管を確保した。次に定位脳手術用固定器に頭蓋骨を固定し、Bregmaより7.5mm前方の正中に穿頭を行った。1ccの注射器を用いて200 μ Lの新鮮血を尾動脈より採取し、27ゲージ針を付けて60度の角度で約11cm注射器を挿入し12秒かけて視交叉前槽に血液を注入した。5分静置した後注射器を抜去、穿頭部を骨蠟で覆い型の如く閉創した。閉創後直ちにメロキシカムを皮下注射し創部をイソジンで消毒した。なお、偽手術群は注射器の挿入のみを行い、対照群は同量の生理食塩水を同じ速度で視交叉前槽に注入した。

-1 実験1の群分けとプロトコル

23 匹の SD ラットを偽手術群 (S 群、n=9) 対照群 (V 群、n=9)、動脈血投与群 (SAH 群、n=14) に分けた。左側に 5X6mm の骨窓を設け、顕微鏡下に血液注入後の皮質動脈の動的変化を 10 分間ビデオ撮影し観察、2 分毎に区切りその時間内で最も動脈径が変化 (収縮または拡張) した割合を計算した。また、その 10 分間で静脈に「to and flow」や「bluish」の変化が認められた場合を静脈うっ滞と定義し、それらを観察・評価した。24 時間後に再度吸入麻醉管理を行いながら開創し、動静脈写真を撮影後各々の血管について 50%以上の狭窄または閉塞した血管を攣縮血管と定義して、骨窓内にある全体の動静脈に占めるその割合を計算した。なお、注射器注入後 1 時間後と 23 時間後に梁歩行試験、ロタロッド試験を行って神経機能予後を評価した。

-2 実験 2 の群分けとプロトコル

クロドロン酸 (Clodronate : CLD) を用いて薬理的な介入法により PVM を抑制し、SAH におけるその役割を検討した。80 匹の SD ラットについて、うち 10 匹を CLD 投与後 SAH 作成前の PVM 減少量を計測し CLD の適切な量を探索、以後 CLD7mg/mL を投与することにした。次に、SD ラット 23 匹を軽症群 (200 μ L 注入) 群、47 匹を重症群 (300 μ L 注入) に割り当てた。まず吸入麻醉下に CLD を脳室内に 10 μ L 投与、その 72 時間後に実験 1 と同じように SAH 群/対照群 (V 群) を作成、血液注入直後から 5 分間脳血流の変化をレーザースペックル法にて計測した。モデル作成後 24 時間、72 時間後に神経学的所見 (ロタロッド試験) を計測、引き続き深麻酔下に脳を摘出し、Bregma より前方の脳を rt-PCR 用に、後方の脳は組織染色用に保存し適宜使用、V 群と比較検討しながら解析を行った。

4 . 研究成果

実験 1 の結果

動脈の変化について、S 群では特に大きな変化は認めなかった。V 群では SAH から 6 分後以降に 60%のラットに血管拡張が認められた。SAH 群では、直後から血管の拡張や収縮が全例で認められた (Fig.1A)。静脈のうっ滞について、V 群、SAH 群では同等に全例認められたが、S 群では

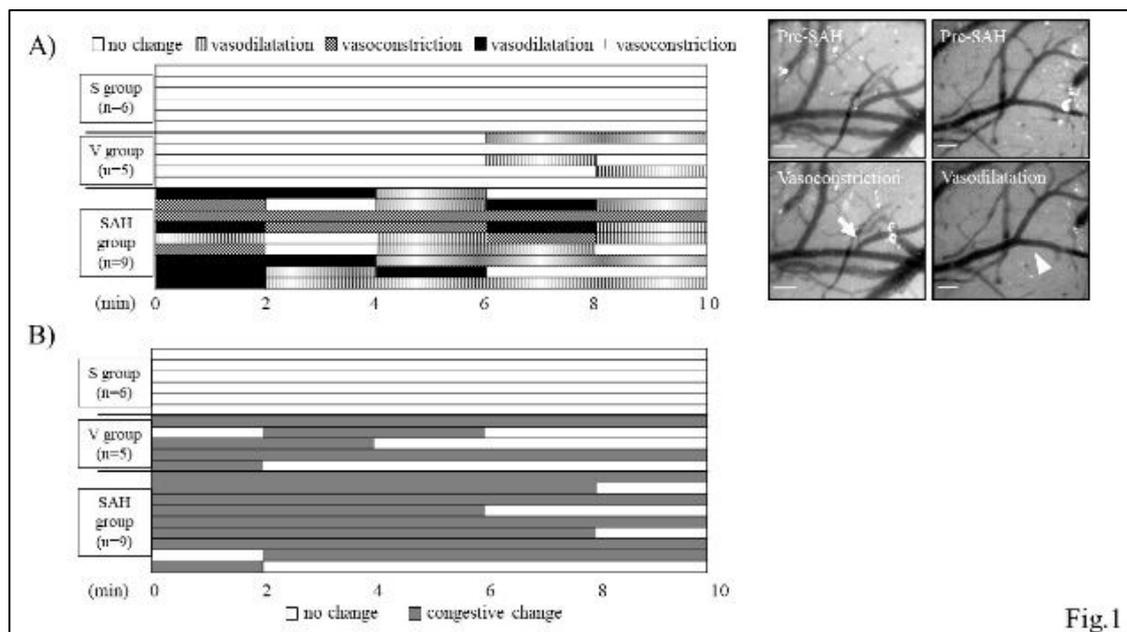


Fig. 1 A) 左図 : SAH 直後からの脳動脈径の経時的変化、右写真 : 血管の収縮/拡張の代表例。

B) SAH 直後からの脳静脈うっ滞の経時的変化。(文献 2、一部改変)

その変化は無かった (Fig. 1B)。24 時間後では、V 群では S 群と比べ攣縮動脈の増加を認めたが、SAH 群では動静脈においてさらに攣縮血管の有意な増加を認めた (Fig. 2A, B)。神経機能予後について、注入 1 時間後では V 群、SAH 群とも S 群と比し有意な増悪を認めたが、23 時間後には V 群のラットは回復し、SAH 群のみ増悪所見が残存した (Fig. 2C-F)。

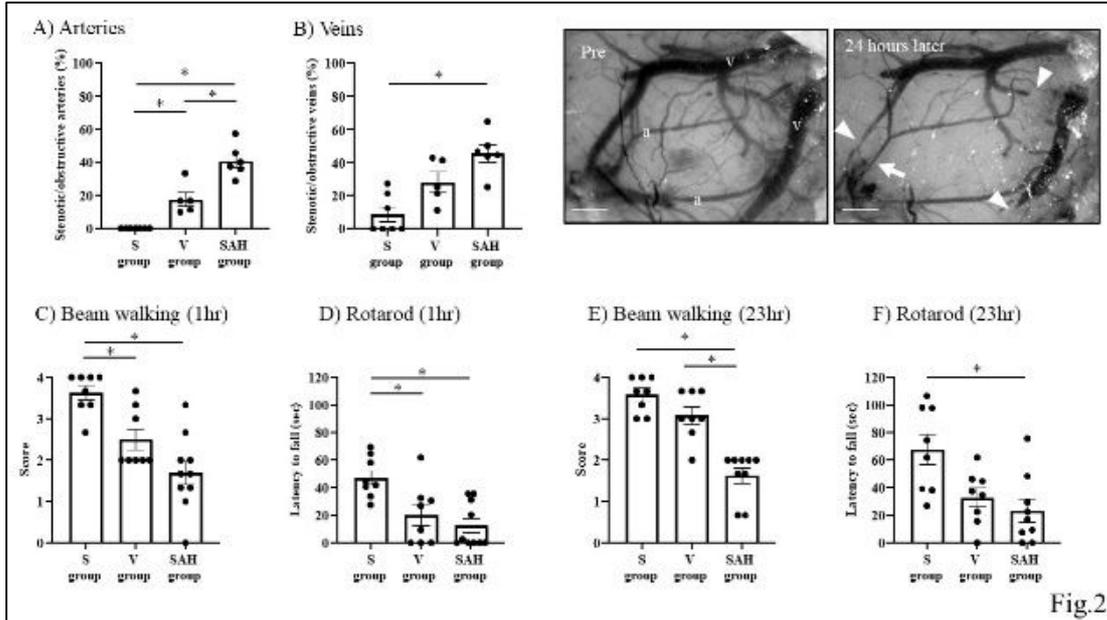


Fig.2:モデル作成 1 日後の脳動脈 A)と脳静脈 B)の血管攣縮割合。右写真：血管の収縮/閉塞の代表例。モデル作成後 1 時間 C), D)と 23 時間後 E), F)の神経所見。(文献 2、一部改変)

実験 2 の結果

まず CLD7mg/mL にて PVM が 50%程度減少した (data not shown)。次に SAH の軽症群では神経所見の増悪は軽度であり、CLD 投与による改善効果は明瞭では無かった (data not shown)。一方 SAH 重症群では、CLD 投与にてロタロッド試験の改善率が有意に上昇 (Fig. 3A) SAH 超急性期の脳血流低下は有意に抑制された (Fig. 3B, C)。続いて免疫染色や rt-PCR を行ったが、hypoxia-

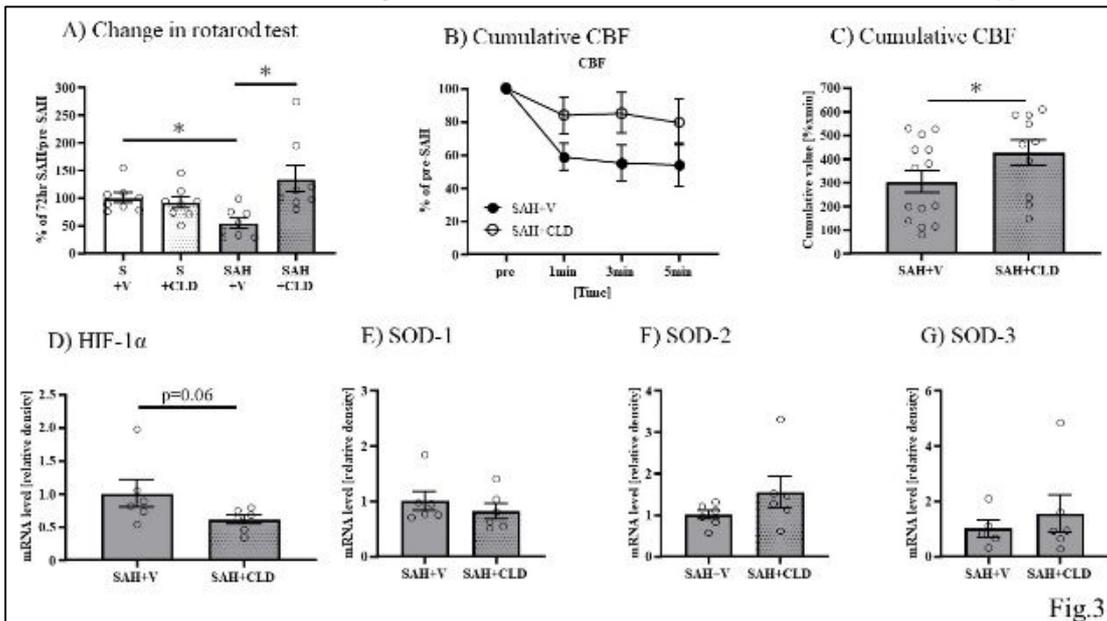


Fig.3:モデル作成 3 日後のロタロッド試験の改善率 A)。脳血流の経時的变化 B)と変化量 C)。HIF-1 D)や酸化ストレス消去系 E-G)の m-RNA 発現量。(文献 3、一部改変)

inducible factor 1 (HIF-1) は有意に低下する傾向にあったものの、酸化ストレスの産生系、消去系、活性化マクログリアをはじめとした炎症系について明らかな差は認められなかった (Fig.3D-G、その他 data not shown)。以上の結果から、CLD による保護効果は SAH 後の脳血流低下と関連することが示唆された。

実験 1 について、今回の SAH モデルでは、いわば生理食塩水投与群は脳圧上昇、SAH 群は脳圧上昇 + くも膜下腔の血腫の病態 (髄液灌流障害やヘモグロビン由来の細胞障害性変化) を反映する。生理食塩水投与では注入 6 分後に動脈拡張、動脈血投与では投与直後から血管の拡張や収縮が両方認められた。動脈の instability は SAH 特有の変化であり、脳圧上昇だけでも脳血管攣縮は起こるが、くも膜下腔の血腫の存在が相加的に脳血管攣縮を増悪することがわかった。静脈の急性期変化は頭蓋内圧上昇による血管の圧迫が主であるものの、SAH では静脈傷害も有意に持続することから、くも膜下腔の血腫は静脈に対しても継続的に負の効果を発揮すると考えられる。そして、これらの動静脈の有意な傷害が神経所見の増悪と関連する可能性が示唆された。

実験 2 について、PVM は脳卒中など病的変化が起こると活性化し炎症反応を惹起、脳傷害を誘導する。本研究結果から、CLD により SAH の予後は改善したがその効果は酸化ストレスや神経炎症に対するものではなく、SAH 後超急性期の脳血流低下に対する抑制効果が主であると考えられた。つまり、SAH 後交感神経活動の活性化は脳実質に対する細胞障害性変化よりも脳血流変化との関連性が高いことが示唆された。

以上の結果から、SAH 後視床下部傷害は予後と直結する脳血管動静脈傷害や超急性期脳血流低下と関連することがわかった。一方、SAH 後の早期脳損傷と脳血管攣縮はそれぞれ全脳虚血と局所脳虚血により脳損傷が起こる。視床下部傷害は超急性期の病態形成に加えて、その二大予後決定病態のトリガーとなっている可能性も示唆する。本研究結果より得た知見により、中枢性交感神経の活性化が SAH の新たな予後決定病態となり得ることを総説として発表[4]、Journal of neurochemistry の Top cited article(2022-2023)に選ばれた。また、実験 2 で得られた知見を基に脳血管障害における PVM の病的関与についても総説を発表した[5]。

1. Macdonald, R.L., *Delayed neurological deterioration after subarachnoid haemorrhage*. Nat Rev Neurol, 2014. **10**(1): p. 44-58.
2. Fujimori, K., et al., *Microscopic observation of morphological changes in cerebral arteries and veins in hyperacute phase after experimental subarachnoid hemorrhage: an in-vivo analysis*. Neuroreport, 2023. **34**(3): p. 184-189.
3. Uchikawa, H., et al., *Pretreatment with Clodronate Improved Neurological Function by Preventing Reduction of Posthemorrhagic Cerebral Blood Flow in Experimental Subarachnoid Hemorrhage*. Neurocrit Care, 2023. **39**(1): p. 207-217.
4. Hasegawa, Y., et al., *Central sympathetic nerve activation in subarachnoid hemorrhage*. J Neurochem, 2022. **160**(1): p. 34-50.
5. Uchikawa, H., K. Uekawa, and Y. Hasegawa, *Perivascular macrophages in cerebrovascular diseases*. Exp Neurol, 2024. **374**: p. 114680.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名 Uchikawa Hiroki, Uekawa Ken, Hasegawa Yu | 4. 巻 374 |
| 2. 論文標題 Perivascular macrophages in cerebrovascular diseases | 5. 発行年 2024年 |
| 3. 雑誌名 Experimental Neurology | 6. 最初と最後の頁 114680 ~ 114680 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.expneurol.2024.114680 | 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 K Fujimori, S Kajiwara, Y Hasegawa, H Uchikawa, M Morioka | 4. 巻 34 |
| 2. 論文標題 Microscopic observation of morphological changes in cerebral arteries and veins in hyperacute phase after experimental subarachnoid hemorrhage: An in vivo analysis | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Neuroreport | 6. 最初と最後の頁 184-189 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/WNR.0000000000001879. | 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 H Uchikawa, K Kamenno, K Kai, S Kajiwara, K Fujimori, K Uekawa, Y Fujiwara, A Mukasa, S Kim-Mitsuyama, Y Hasegawa | 4. 巻 in press |
| 2. 論文標題 Pretreatment with clodronate improved neurological function by preventing reduction of posthemorrhagic cerebral blood flow in experimental subarachnoid hemorrhage | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Neurocritical care | 6. 最初と最後の頁 in press |
| 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 Hasegawa Y, Uchikawa H, Kajiwara S, Morioka M | 4. 巻 260 |
| 2. 論文標題 Central Sympathetic Nerve Activation in Subarachnoid Hemorrhage. | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry | 6. 最初と最後の頁 34-50 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.15511. | 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 長谷川雄, 岳元裕臣, 林建佑, 森岡基浩. | 4. 巻 36 |
| 2. 論文標題 くも膜下出血の前臨床的治療研究における主要評価項目と副次評価項目を考える. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 脳血管攣縮 | 6. 最初と最後の頁 6-10 |
| 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 - |

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 長谷川雄, 森岡基浩 |
| 2. 発表標題 くも膜下出血の病態における中枢性交感神経活動 |
| 3. 学会等名 脳循環代謝学会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 藤森香奈, 長谷川雄, 梶原壮翔, 森岡基浩 |
| 2. 発表標題 ラットくも膜下出血後脳表動静脈の動的変化と予後についての検討 |
| 3. 学会等名 脳循環代謝学会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 藤森香奈, 長谷川雄, 梶原壮翔, 森岡基浩 |
| 2. 発表標題 ラットくも膜下出血後脳表動静脈の動的変化と予後についての検討 |
| 3. 学会等名 stroke2023 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 長谷川雄 |
| 2. 発表標題 遅発性脳虚血治療に必要な脳血管攣縮のメカニズムと薬物の作用点 |
| 3. 学会等名 Stroke2022 (招待講演) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 梶原壮翔、長谷川雄、藤森香奈、森岡基浩 |
| 2. 発表標題 ラットくも膜下出血後皮質動静脈の経時的変化の特徴 |
| 3. 学会等名 Stroke2022 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 藤森香奈、長谷川雄、梶原壮翔、森岡基浩等 |
| 2. 発表標題 当院におけるaneurysmal SAH後cerebral vasospasm(CVS)/symptomatic vasospasm(SVS)の発症状況の分析 |
| 3. 学会等名 Stroke2022 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 長谷川雄、森岡基浩 |
| 2. 発表標題 ARRIVEガイドラインに即した前臨床的脳卒中治療研究の考察 |
| 3. 学会等名 第74回日本薬理学会西南部会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 長谷川雄 |
| 2. 発表標題 実験的くも膜下出血の研究計画を立てる～私達が考える最適な研究計画の立て方～ |
| 3. 学会等名 Stroke2020 |
| 4. 発表年 2020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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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