

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K18375

研究課題名（和文）くも膜下出血後早期脳損傷におけるLOX-1の役割

研究課題名（英文）Role of LOX-1 in early brain injury after subarachnoid hemorrhage

研究代表者

松田 尚也（Matsuda, Naoya）

弘前大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30587663

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）：くも膜下出血後のEarly Brain Injuryを引き起こす酸化ストレスを抑えることで、予後向上が期待される。lectin-like oxidized LDL receptor-1(LOX-1)阻害によるEarly Brain Injury抑制効果を明らかにすることを目的とした。ラットSAHモデルの脳血管壁において酸化LDL、LOX-1の発現が増加している可能性が示唆された。神経細胞・血管内皮細胞のapoptosis検出、血液脳関門の破綻、脳浮腫の程度、脳微小血栓・脳内微小血管内皮細胞障害の測定に関しては再現性が得られず検討を続けている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

くも膜下出血後の超急性期に生じる脳障害は、近年Early Brain Injuryと称され、超急性期の重症度を左右し、遅発性脳血管攣縮発生や予後に多大なる影響を与えることで注目されている。Early Brain Injuryを引き起こす一大要因が酸化ストレスであることが示されており、それを最小限に抑えることで、生命予後向上に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Reducing oxidative stress that causes Early Brain Injury after subarachnoid hemorrhage is expected to improve patient prognosis. The aim of this study was to clarify the inhibitory effect of lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) inhibition on Early Brain Injury. We suggested that the expression of oxidized LDL and LOX-1 may be increased in the cerebral vascular wall of rat SAH model. The results are not reproducible and are still under investigation in terms of detection of apoptosis of neurons and vascular endothelial cells, disruption of blood-brain barrier, degree of brain edema, and measurement of cerebral microthrombi and intracerebral microvascular endothelial cell damage.

研究分野：脳血管障害

キーワード：脳血管障害

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

くも膜下出血後の超急性期に生じる脳障害は、近年 Early Brain Injury と称され、超急性期の重症度を左右し、遅発性脳血管攣縮発生や予後に多大なる影響を与えることで注目されている。くも膜下出血後には頭蓋内圧(ICP)亢進による脳虚血に基づく脳損傷 (necrosis と cytotoxic edema) が生じることは、古くから指摘されてきた。最近では ICP 亢進に加え、くも膜下出血に由来する様々な物質や反応により病態が進展することが示され、この病態は Early Brain Injury と呼ばれている。Early Brain Injury の中核をなす要素としては以下がある。

- ・ apoptosis による神経細胞死
- ・ 内皮細胞 apoptosis や血液脳関門破綻による vasogenic edema
- ・ 脳微小血栓、脳微小血管の狭小化 (収縮) による脳微小循環障害

Early Brain Injury を引き起こす一大要因が酸化ストレスであることが示されており、それを最小限に抑えることで、予後向上に繋がることが期待される。これまで我々は、動脈壁の酸化 low density lipoprotein(LDL)とそのレセプターである lectin-like oxidized LDL receptor-1(LOX-1)が、脳血管攣縮の成因に関与する新たな酸化ストレス産生経路であることを証明した。しかし、Early Brain Injury と LOX-1 の関連に関する研究は未だ成されていない。

2. 研究の目的

酸化ストレスを介した両者の関係性につき証明するとともに、LOX-1 阻害による Early Brain Injury 抑制効果および、くも膜下出血患者の予後改善に繋げることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

ラットくも膜下出血モデルを作成し、EBI の病態と LOX-1 の作用に共通する、apoptosis による神経細胞死、血液脳関門破綻による vasogenic edema、脳微小血栓・脳微小循環障害に関して以下の項目を検討することで、EBI と LOX-1 の関連を明らかにする。

ラット内頸動脈穿通によるくも膜下出血モデル作成

SD 雄ラットを用い puncture モデルを作成する。手術直後の死亡率は約 30-50%である。

ラット 40 匹を、以下の 4 群に分ける。

- A: Control 群 (n=10)
- B: Sham operation 群 (n=10)
- C: SAH - low dose procyanidin 投与群 (n=10)
- D: SAH - high dose procyanidin 投与群 (n=10)

検討項目

上記各群に関して下記項目につき測定し、統計学的検討を行う。

- ・ 酸化 LDL、LOX-1 の検出
- ・ 神経細胞の apoptosis (ELISA) 検出
- ・ 血管内皮細胞の apoptosis (TUNEL 染色) 検出
- ・ 血液脳関門の破綻 (Evans blue 染色)
- ・ 脳浮腫の程度 (脳乾燥法)
- ・ 脳微小血栓の測定
- ・ 脳内微小血管内皮細胞障害の測定

4. 研究成果

ラット SAH モデルおよびコントロール群の作成を行い、以下の項目の検討を行った。

・ 酸化 LDL、LOX-1 の検出：脳血管壁における酸化 LDL、LOX-1 の免疫染色、及び RT-PCR による発現量を計測する。本項目では、SAH モデルの脳血管壁において酸化 LDL、LOX-1 の発現が増加している可能性が示唆された。

以降の項目に関しては結果に再現性が得られず検討を続けている。

・ 神経細胞の apoptosis (ELISA) 検出：Caspase3 を ELISA にて測定する。生体標本として取り出し-80 にて保存した大脳皮質から蛋白を抽出し、ELISA にて測定、アポトーシスの指標とする。

・ 血管内皮細胞の apoptosis (TUNEL 染色) 検出：両側基底核および両側脳皮質の切片を摘出し、TUNEL 染色を行う。DNA 断片化を光顕にてコントロール群と比較してアポトーシスの指標とする。

・ 血液脳関門の破綻 (Evans blue 染色)：予め Evans blue (50mg/kg) を腹腔内投与し灌流固定する。測定値を Evans blue の標準曲線 (0.5-40 $\mu\text{g/ml}$) から色素量として計算し、血液脳関門破綻の指標とする。

・ 脳浮腫の程度 (脳乾燥法)：生体摘出標本にて、脳乾燥による重量測定により、脳浮腫を評価する。

・ 脳微小血栓の測定：脳皮質細動脈における FITC-dextran 蛍光染色、Fibrinogen 免疫染色、

Collagen4 免疫染色にて微小血栓の検出を行う。

・脳内微小血管内皮細胞障害の測定：脳底動脈切片を摘出し、eNOS・MMP-9 抗体染色および ELISA を行う。また、末梢血 d-ROM 測定を行い、酸化ストレスによる血管障害・炎症所見の指標とする。

今後も上記検討を継続していく予定である。

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

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