

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18421

研究課題名（和文）CD38 によるくも膜下出血後の予後改善に関する検討

研究課題名（英文）Study on prognosis improvement after subarachnoid hemorrhage by CD38

研究代表者

中尾 庸人 (Nakao, Tsunehito)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：60792596

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（subarachnoid hemorrhage：SAH）発症後、3 割以上の症例において症候性脳血管攣縮が生じる。近年、SAH 患者の予後規定因子として、出血後 72 時間以内に生じる早期脳損傷（early brain injury：EBI）という概念が注目されてきている。そこで、新規神経保護因子 CD38 が、SAH 後の脳血管攣縮の改善や脳保護に寄与する分子メカニズムを解明することを目的に開始したが、予定通りに進行できず、脳血管攣縮の改善や脳保護に寄与する分子メカニズムを解明するに至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、新規神経保護因子 CD38 が、くも膜下出血（subarachnoid hemorrhage：SAH）発症後の脳血管攣縮の改善や脳保護に寄与する分子メカニズムを解明することを目的に開始した。しかし、予定していた評価を十分に進めることができず、TUNEL法や活性化caspase-3 による免疫組織化学を用いた神経細胞死の検出、qRT-PCR や ELISA 法を用いた炎症性サイトカインの検出などでの、SAH の病態評価も十分に進めることはできず、Wild type マウス、CD38 KO マウスでの SAHにおける差は示すことができず、目的を達成できなかった。

研究成果の概要（英文）：After the onset of subarachnoid hemorrhage (SAH), symptomatic cerebral vasospasm occurs in more than 30% of cases. In recent years, the concept of early brain injury (EBI), which occurs within 72 hours after hemorrhage, has attracted attention as a prognostic factor for SAH patients. Therefore, the novel neuroprotective factor CD38 was initiated with the aim of clarifying the molecular mechanism that contributes to amelioration of cerebral vasospasm and brain protection after SAH. We have not been able to elucidate the molecular mechanism that contributes to the protection.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：くも膜下出血 早期脳損傷 CD38

1. 研究開始当初の背景

くも膜下出血（subarachnoid hemorrhage：SAH）は、主に脳動脈瘤破裂により発症し、日本では 10 万人あたり毎年約 20 人が発症する。一般に脳梗塞や脳内出血といった他の脳卒中と比較して、SAH 患者の重症度は高い。SAH 患者の約 3 割は死亡し、約 3 割は重篤な障害を後遺する。そして、約 3 割以上の患者に、発症 4 日目以降に症候性脳血管攣縮が起こり、これが死亡または四肢の麻痺や感覚障害、言語障害などの重篤な後遺障害の原因となる。また、SAH 患者の年齢別内訳で、生産年齢での発症が約 6 割と多く、脳血管攣縮の制御による後遺障害の予防は極めて重要である。現在、実臨床では脳血管攣縮を予防する目的で Rho キナーゼ阻害剤である塩酸ファスジルが使用されているが、予後の明らかな改善には至っていない（Zhao et al, Neurol Med Chil 2011）。

また、大規模臨床試験の結果から、血管攣縮のみを治療しても予後は改善されないことが明らかとなった（Macdonald et al, Lancet Neurol 2011）。そして、新たに SAH 患者の予後を規定する因子として、早期脳損傷（early brain injury：EBI）という概念が注目されてきている。EBI は、脳圧上昇に起因する脳浮腫や細胞障害性変化などを主態とする病態であり、経過での症状悪化症例との関連が示唆されており、脳血管攣縮に代わる新たな治療ターゲットとして近年注目されている。

そこで申請者は、血管攣縮と EBI の双方の予後改善が期待できる因子として CD38 に着目した。CD38 は NAD グリコヒドラーゼ、ADP リボシルシクラーゼ、cADPR 水解酵素などの活性を有する酵素で、活性化した T 及び B 細胞、NK 細胞、単球、形質細胞及び胸腺髄質細胞に発現している。

また、われわれは、CD38 ノックアウト（KO）マウス（東北大学 岡本宏名誉教授より供与）により、アストロサイトやオリゴデンドロサイトといったグリア細胞の発達遅延が起こることを報告している（Hattori et al, Glia 2017）。そして、脳血管障害に関しては、脳虚血時にアストロサイトがニューロンの修復や保護を行う際に、CD38 が必要であるとの報告がされている（Hayakawa et al, Nature 2016）。これらは、CD38 が脳血管攣縮による脳虚血の際や EBI に至る過程での脳保護に寄与する可能性を示唆している。

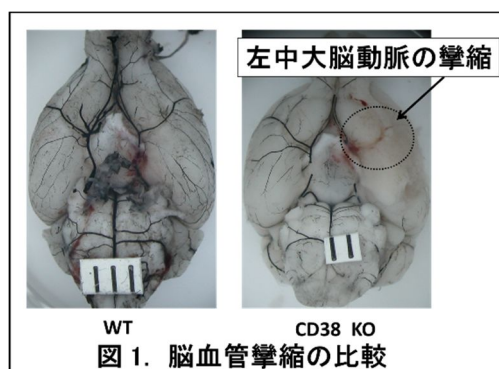


図 1. 脳血管攣縮の比較

一方、CD38 はミトコンドリアや他の因子を介して血管保護に寄与することも示唆されている。これにより、血管攣縮の際にも血管保護につながることが期待される。実際、マウス SAH モデルを用いた実験では、wild type (WT) と CD38 KO マウスの血管攣縮の程度を比較すると、CD38 KO マウスでは明らかに血管狭窄の程度が強かった（図 1）。つ

まり、

CD38 の欠損により、脳血管攣縮が増悪すると考えられる。また、神経学的所見も CD38 KO マウスで有意に低いことが示された（図 2）。このことから、CD38 が血管保護作用を介して、脳血管攣縮を予防することが期待される。

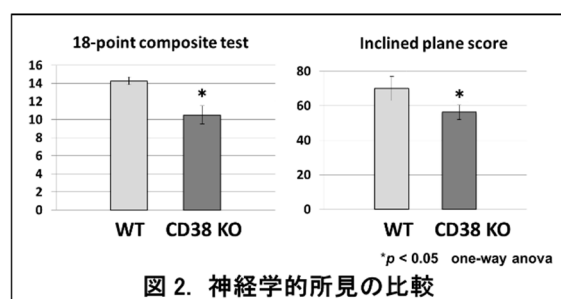


図 2. 神経学的所見の比較

さらに、CD38 と脳血管攣縮および EBI の関連が明らかとなった場合、CD38 活性化剤などによる 脳血管攣縮や EBI 治療の可能性も検討すべき課題である。そこで、申請者はレチノイン酸に着目した。レチノイン酸は、既に急性前骨髄性白血病などに対して、実臨床において投与されている薬剤であるが、CD38 の発現増強を促進することが報告されている (Kishimoto et al, J Biol Chem 1998)。このことから、レチノイン酸は、CD38 の脳血管攣縮や EBI における血管保護作用や神経細胞の保護作用を増強することが考えられ、治療薬となりうる可能性がある。

2. 研究の目的

SAH 患者の予後改善のため、以前から亜急性期の脳血管攣縮に主眼が置かれてきたが、治療法は未だ確立されていない。また、近年注目されている急性期の EBI も未だ治療法の確立には至っていない。よって、これらの治療法確立は早急に検証すべき課題であり、本研究の目的である。

3. 研究の方法

1) マウス SAH モデルの作成と病態評価

マウス SAH の血管穿通モデルを使用して、脳水分含有量計測による脳浮腫の評価、TUNEL 法や活性化 caspase-3 による免疫組織化学を用いた神経細胞死の検出、qRT-PCR や ELISA 法を用いた炎症性サイトカインの検出を行い、SAH の病態を詳細に評価する。

2) SAH 後の CD38 発現

マウス SAH モデルにおいて、CD38 の発現の評価を下記のとおりに行う。すなわち、qRT-PCR および in situ hybridization による CD38 mRNA の検出、抗 CD38 抗体を用いた Western blotting や血管壁および脳実質の免疫組織化学における CD38 蛋白の検出を試みる。また、CD38 の発現と病態変化との関連を明らかにするため、SAH 後 6 時間、12 時間、24 時間、48 時間と経時的に上記実験を行う。

3) WT マウスと CD38 KO マウス間での比較

申請者らは、既に予備実験において、CD38 KO マウスでは、SAH 後の脳血管攣縮や神経学的所見が増悪することが示した (図 1, 2)。本研究では、上記 1) の方法で、WT マウスと CD38 KO マウスにおける脳血管攣縮、脳浮腫、神経細胞死、炎症反応の評価を行い、どの時点で CD38 KO マウスの病態が増悪するかを確認する。

4) SAH 後の CD38 作用の分子メカニズム

上記 3) の実験で得られた結果に関して、分子メカニズムを明らかにする。具体的には、CD38 は NAD から cADPR を合成する酵素であるが、CD38 KO マウスにおいて、NAD の過剰または cADPR の不足のどちらが SAH の病態に対して影響しているのかを検討する。SAH 作成直後の WT マウス に NAD または cADPR 阻害剤である 8-Br-cADPR を投与して、6 時間後、12 時間後、24 時間後、48 時間後の病態を評価する。

5) レチノイン酸投与による治療実験

マウス SAH モデルにおいて、CD38 活性化剤とされるレチノイン酸を投与した結果、SAH の神経学的所見が改善するかを検討する。まず、レチノイン酸を SAH 作成直後および 24 時間後に投与して、SAH 作成 48 時間後に病態を評価する。投与量は 3 種類に振り分け、濃度依存性

に神経学的所見が改善するかを検証する。コントロールはレチノイン酸の溶媒を投与するモデルとする。

4. 研究成果

Wild type マウスと、CD38 KO マウス間での TUNEL 法や活性化 caspase-3 による免疫組織化学を用いた神経細胞死の検出、qRT-PCR や ELISA 法を用いた炎症性サイトカインの検出などでの SAH の病態評価も十分に進めることはできず、Wild type マウス、CD38 KO マウスでの SAH における差は示すことができなかった。そのため、脳血管攣縮の改善や脳保護に寄与する分子メカニズムを解明するに至らなかった。

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
---------	---------