

機関番号 : 32202

研究種目 : 基盤研究 (C)

研究期間 : 2008 ~ 2010

課題番号 : 20591695

研究課題名 (和文) くも膜下出血急性期における細胞内シグナルの解析 : AT1 受容体との関係について

研究課題名 (英文) Signaling pathway for acute stage in SAH: protective mechanism with ARB for brain damage

研究代表者

草鹿 元 (KUSAKA GEN)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号 : 00265258

研究成果の概要 (和文) :

ウレタン麻酔を施したSD雄性ラット(300-350g)を人工呼吸器管理下に左の頸部内頸動脈より6.0ナイロン糸を挿入し、頭蓋内内頸動脈を穿通することによりくも膜下出血モデルラットを作製した。アンギオテンシンⅡAT1受容体阻害薬による治療群は、くも膜下出血後30分でオルメサルタン(24mg/kg)を投与し、コントロール群は同様にvehicleのみそれぞれ腹腔内投与し、手術中は血圧(大腿動脈より観血的に測定)、体温、血液ガス分圧をモニターし、実験中の個体のコンディションにばらつきがでないように全身管理を行った。術後24時間でラットの神経スコア、血圧、体温を測定し、その後全身麻酔下に4℃に冷却した燐酸バッファーにて心臓還流し、迅速に脳を摘出した。これを4℃の燐酸バッファーで満たされたシャーレ内で冷却しながら、顕微鏡下に脳底動脈と脳実質組織を摘出し、それぞれ-80℃で保存した。これらの検体は、脳浮腫に関連するMAPK, Srcなどの細胞内シグナル活性やVEGFの発現、定量などをウエスタンブロット法で測定中である(VEGFについての蛋白質の測定結果では、無治療群に比較し治療群で明らかな発現量の減少を認めている)。くも膜下出血24時間後の血圧と神経スコアについての治療群とコントロール群の比較では、治療群ではコントロール群に比較し血圧は約30-40%低下し、神経スコアは改善の傾向を認めている。脳浮腫の評価では、くも膜下出血後24時間での脳の水分含有量を測定している。これまでの実験結果では治療群の方がコントロール群に比して、脳の水分含有量が減少傾向にある。

研究成果の概要 (英文) :

Using a rat SAH model, the authors explored the role of vascular endothelial growth factor (VEGF) and mitogen- activation protein kinase (MAPK) in early brain injury. Male Sprague-Dawley rats (n = 40) weighing 300 to 350 g were used for the experimental SAH model, which was induced by puncturing the bifurcation of the left anterior cerebral and middle cerebral arteries. The blood-brain barrier (BBB), brain edema, intracranial pressure, and mortality were evaluated at 24 hours after SAH. The phosphorylation of VEGF and different MAPK subgroups (ERK1/2, p38, and JNK) were examined in both the cortex and the major cerebral arteries. Experimental SAH increased intracranial pressure, BBB permeability, and brain edema and produced high mortality. SAH induced phosphorylation of VEGF and MAPKs in the cerebral arteries and, to a lesser degree, in the cortex., AT1 receptor-bloccker reduced, brain edema, and mortality and decreased the phosphorylation of VEGF and MAPKs. We conclude that VEGF contributes to early brain injury after SAH by enhancing the activation of the MAPK pathways, and that the inhibition of these pathways might offer new treatment strategies for SAH.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科

キーワード：①脳・神経②シグナル伝達③くも膜下出血④急性期脳損傷⑤脳血液関門

1. 研究開始当初の背景

脳動脈瘤破裂によるくも膜下出血では、36時間以内の死亡率は50%に達し、亜急性期から慢性期では後遺症を残すか死亡に至る例が全体の15%程度である。くも膜下出血では急性期死亡率が最も多く、急性期の脳損傷の程度が恒久的な神経障害と強い相関関係にある。しかし、これまでの脳神経外科領域の関心は、主に破裂脳動脈瘤に対する再破裂の予防（直達手術の方法や血管内手術手技など）や、くも膜下出血後の遅発性脳血管攣縮に対する薬物療法などに向けられてきた。これは、くも膜下出血発生直後の急激な脳圧亢進による物理的損傷や脳還流圧の相対的な減少による全脳虚血が急性期脳損傷の主体という考え方が既定概念になっており、すなわちくも膜下出血急性期の脳損傷は治療不能な病態であると認識されてきたのである。しかし最近の私達の研究などで、くも膜下出血急性期の脳損傷はくも膜下出血発生直後の脳圧上昇という単なる一次的な要因よりむしろ、数十分から数時間後にみられる再還流損傷などによる二次的損傷が重要であることが示さ

れるようになってきた。このような病態のメカニズムとして、ストレス蛋白であるMAPKの活性化や血管内皮細胞や神経膠細胞由来のVEGFの増加が、脳血液関門の透過性を亢進させて、脳浮腫を引き起こし、脳損傷を惹起することが示唆される。このような研究は、まだ研究の方向性が見出された段階であり、くも膜下出血急性期の病態に焦点を絞った報告は国内外にほとんどみられない。

2. 研究の目的

ラットのくも膜下出血モデル(Kusaka et al., 2004)を使用し、カンデサルタン投与群と非投与群について急性期脳損傷について比較する。比較項目としては脳浮腫の程度、神経学的な重症度、ストレス蛋白の定量など(Kusaka et al., 2004)を主に行う。

なお、実際の研究については主に研究代表者である草鹿が行い、研究分担者でsupervisorでもある石川と具体的な実験方法、実験結果について綿密に検討を重ねながら研究を進める。

I 研究計画・方法

① 雄性SDラット(体重300-350g)を用い全

- 身麻酔下に呼吸管理を行いながら、左頸部内頸動脈よりナイロン糸を挿入し、頭蓋内内頸動脈を穿刺して、くも膜下出血モデルを作製する。この手術直後の死亡率はおよそ15%である。術後生存したラットを実験に供する。くも膜下出血作成より30分後にカンデサルタン0.5mg/kg、またはプラセボを腹腔内に投与する。
- ② くも膜下出血モデルラットは、術後24時間で4℃の燐酸バッファーにて心臓還流後断頭して、側頭葉底部の脳皮質組織を切り出し、p42/p44 MAPK、p38 MAPK、Srcのリン酸化をウエスタンブロット法で解析し、2群間の差異を検討する。
- ③ 更に脳より脳底動脈を分離採取して、同様の検討を行う。
- ④ くも膜下出血後24時間での死亡率、神経学的所見をカンデサルタン群とプラセボ群で比較する。
- ⑤ 脳浮腫、脳圧や脳血管の透過性についても同様に比較する。脳浮腫については、オープンを用いて脳を乾燥させ、乾燥前後の質量の差より水分量を算出し、脳全体における水分の割合として算定する。また脳圧については、我々が開発した経腰椎的脳圧測定法 (Kusaka G. et al.: A new lumbar method for monitoring cerebrospinal fluid pressure in rats. *J Neurosci Methods* 135, 2004) により行う。脳血管の透過性については、全身麻酔下に頭蓋骨を開窓したラットに、蛍光アルブミンを静脈内投与し、蛍光顕微鏡を用いて、脳表の動脈からのアルブミンの漏出度をコンピューターの解析ソフトで数値化し比較する。
- ⑥ カンデサルタンまたはプラセボを投与したラットに脳梗塞を作製して、AT1受容体拮抗薬の脳保護作用をくも膜下出血ラットのそれと対比する。
- イ) 脳梗塞モデルラットは、術後24時間で4℃の燐酸バッファーにて心臓還流後断頭して、側頭葉底部の脳皮質組織を切り出し、p42/p44 MAPK、p38 MAPK、Srcのリン酸化をウエスタンブロット法で解析し、2群間の差異を検討する。
- ロ) 更に脳より脳底動脈を分離採取して、同様の検討を行う。
- ハ) くも膜下出血後24時間での死亡率、神経学的所見をプラセボ群とカンデサルタン治療群で比較する。(当初の予定は無かったが、カンデサルタン以外のARB治療群として、オルメサルタン治療群も作成した)
- ニ) 脳浮腫、脳圧や脳血管の透過性についても同様に比較する。脳浮腫については、
- ハ) 脳梗塞後3時間、6時間、24時間での死亡率、神経学的所見をカンデサルタン群とプラセボ群で比較する。
- ニ) 脳浮腫、脳圧や脳血管の透過性についても同様に比較する。脳浮腫については、オープンを用いて脳を乾燥させ、乾燥前後の質量の差より水分量を算出し、脳全体における水分の割合として算定する。また脳圧については、経腰椎的脳圧測定法により行う。脳血管の透過性については、全身麻酔下に頭蓋骨を開窓したラットに、蛍光アルブミンを静脈内投与し、蛍光顕微鏡を用いて、脳表の動脈からのアルブミンの漏出度をコンピューターの解析ソフトで数値化し比較する。
- ② AT1受容体とAT2受容体の相互関係作用を検討するため、AT2受容体拮抗薬(PD123319)を用いたくも膜下出血ラットを作製する(AT2受容体拮抗薬もAT1受容体拮抗薬と同様の方法にてラットに投与する)。カンデサルタン群のくも膜下出血ラットと対比検討する。
- イ) くも膜下出血モデルラットは、術後3時間、6時間、24時間で4℃の燐酸バッファーにて心臓還流後断頭して、側頭葉底部の脳皮質組織を切り出し、p42/p44 MAPK、p38 MAPK、Srcのリン酸化をウエスタンブロットで解析し、2群間の差異を検討する。
- ロ) 更に脳より脳底動脈を分離採取して、同様の検討を行う。
- ハ) くも膜下出血後24時間での死亡率、神経学的所見をプラセボ群とカンデサルタン治療群で比較する。(当初の予定は無かったが、カンデサルタン以外のARB治療群として、オルメサルタン治療群も作成した)
- ニ) 脳浮腫、脳圧や脳血管の透過性についても同様に比較する。脳浮腫については、

オーブンをを用いて脳を乾燥させ、乾燥前後の質量の差より水分量を算出し、脳全体における水分の割合として算定する。また脳圧については、経腰椎的脳圧測定法により行う。脳血管の透過性については、全身麻酔下に頭蓋骨を開窓したラットに、蛍光アルブミンを静脈内投与し、蛍光顕微鏡を用いて、脳表の動脈からのアルブミンの漏出度をコンピューターの解析ソフトで数値化し比較する。

4. 研究成果

イ) 各治療群ラットデータ

使用総数 40 (24時間以内の死亡数 11)

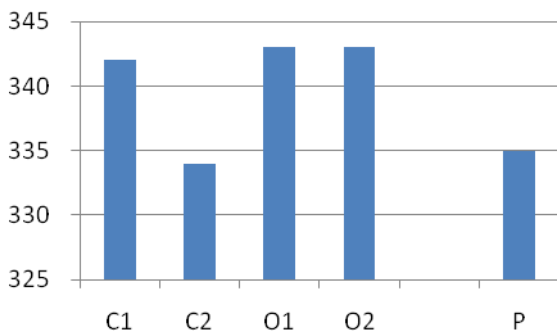
各治療群数

C1: カンデサルタン 4mg/kg	4
C2: カンデサルタン 10mg/kg	8
O1: オルメサルタン 8mg/kg	5
O2: オルメサルタン 24mg/kg	4
P: 少量のDMSO(プラセボ)	9

平均体重

C1: 342g
C2: 339g
O1: 343g
O2: 343g
P: 335g

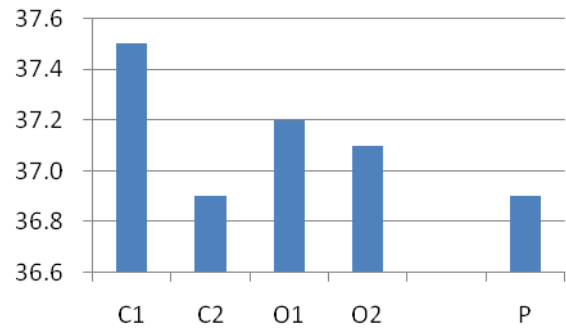
BW(g)



平均体温 (°C)

C1: 37.5
C2: 36.9
O1: 37.2
O2: 37.1
P: 36.9

preBT(°C)

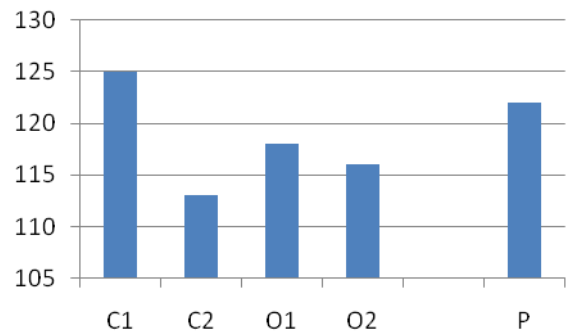


血圧

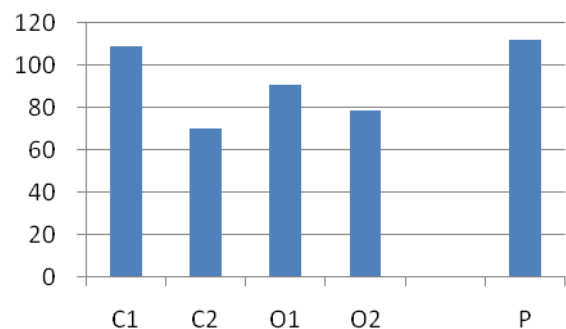
くも膜下出血 前 24時間

C1:	125	115
C2:	113	67
O1:	118	91
O2:	116	69
P:	122	112

preAV



24h後AV

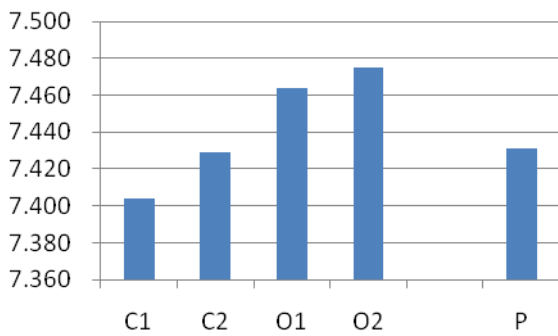


血液ガスデータ平均値

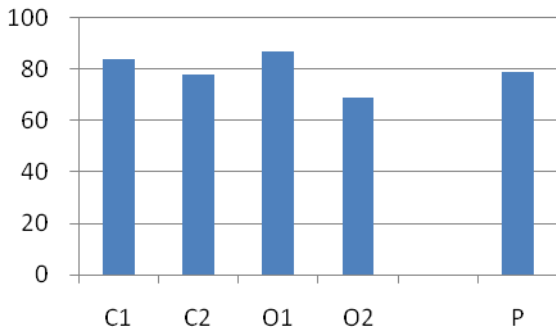
	Ph	PCO2	PO2
C1:	7.404	42.6	84
C2:	7.402	40.0	76
O1:	7.464	33.2	81
O2:	7.475	41.8	69
P:	7.431	40.6	79

各治療群間において、対象となるラットの体重、体温、血液ガスに異常は認めなかった。

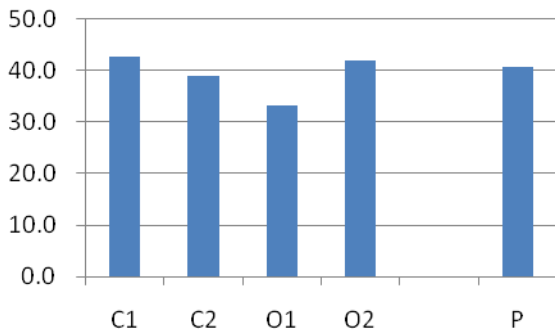
pH



PO2(mmHg)



PCO2(mmHg)



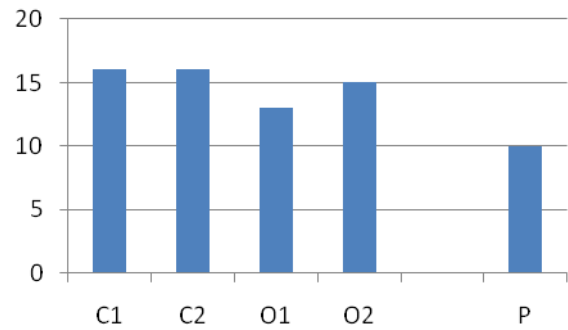
ロ) 各群治療成績比較

神経学的スコア(平均値)

	項目1	2	3	4	5	6	計
C1:	1	3	3	3	3	3	16
C2:	3	3	3	2	3	3	17
O1:	3	3	3	3	3	3	14
O2:	2	3	3	1	2	3	15
P:	1	2	1	1	2	3	10

神経学スコアは ARB 治療群でプラセボ群と比較し、ARB 治療群で改善の傾向を認めた。

計

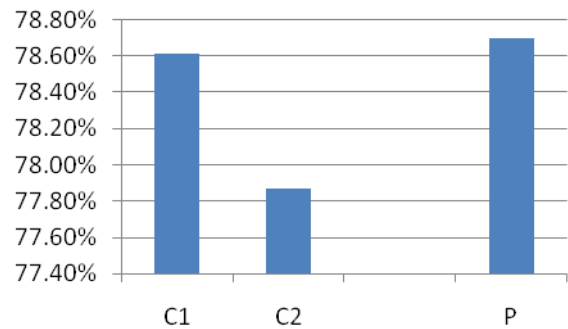


脳水分量 (%)

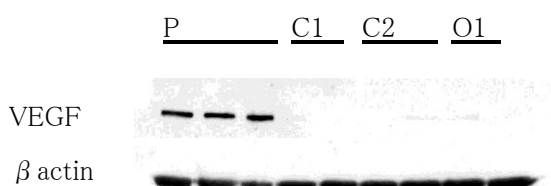
C1:	1.6053
C2:	1.4892
O1:	
O2:	
P:	1.6117

脳の水分含有量は ARB 治療群でプラセボ群と比較し、ARB 治療群で減少の傾向を認めた。

水分(%)



VEGF 発現量(ウエスタンブロット)



脳血管 VEGF の発現量は ARB 治療群でプラセボ群と比較し、ARB 治療群で著明に抑制されていた。

結論

くも膜下出血急性期の脳損傷に深くかかわりのある脳浮腫の発生を ARB が抑制し、神経所見の改善に寄与した。また、このような ARB の脳浮腫抑制効果は、脳浮腫の発生と関係の深い細胞内シグナルである VEGF の抑制効果による可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- 1) Kusaka G, Kuno S, Inoue T, Shoda M: Surgical Strategy for Degenerative Lumbar Scoliosis. *J Spinal surg.* 46:653-656
- 2) Kusaka G, Kuno S, Inoue T, Shoda M :Root sleeve lumbosacral neurinoma. *J Spinal suarg.* 48:853-856
- 3) Ishikawa M, Kusaka G, Takashima, Kamaochi H, Shinoda S :Intraoperative monitoring during surgery for Hypoglossal Schwannoma. *J Clin Neurosci surg.* 46:653-656
- 4) Ishikawa M, Kusaka G(4 番目), (6 名): Treatment with botulinum toxin improves the hyperexcitability of the facial motoneuron in patients with hemifacial spasm. *Neural Res.* 32:656-660
- 5) Ishikawa M, Kusaka G, (5 名). Clipping of a vertebral artery aneurysm behind the hypoglossal nerve under the monitoring of lower cranial nerves. *Clin Neurol Neurosurg.* 112:450-453
- 6) Yoshida T, Ishikawa S(9 番目), (11 名). Association of CD40 ligand levels in the culprit coronary arteries with subsequent prognosis of acute myocardial infarction. *Atherosclerosis.* 4: epub ahead of print
- 7) Ikoma A, Ishikawa S(8 番目), (8 名). Bilateral aldosteronoma associated with secondary aldosteronism in a chronic hemodialysis subject. *Intern Med.* 49:1017-1021
- 8) Yoshida M, Ishikawa S(6 番目), (9 名). Voltage-dependent metabolic regulation of Kv2. 1 channels in pancreatic beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 28:304-309

9) Sasaki M, Ishikawa S(4 番目), (4 名). Elavation of plasma retinol-binding protein 4 and reduction of plasma adiponectin in subjects with cerebral infarction. *Metabolism.* 59:527-532

10) Ishikawa M, Kusaka G, (6 名) :Platelet and Leukocyte adhesion in the microvasculature at the cerebral immediately after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery.* 64:546-553

[学会発表] (計 3 件)

- 1) Kusaka G, Kuno S, Tatsushi I, Shoda M: Surgical Strategy for Degenerative Lumbar Scoliosis. *International Spinal Surgery Conference 2009*
- 2) Kusaka G, Kuno S, Tatsushi I, Shoda M: Surgical Strategy for Degenerative Lumbar Scoliosis. *The 7th Biennial Japan-Korea Conference on Spinal Surgery*
- 3) Kusaka G, Kuno S, Tatsushi I, Shoda M: Hybrid Cervical Cage Technique. 1st WFNS Spine Committee Conference

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

草鹿 元 (KUSAKA GEN)
自治医科大学・医学部・講師
研究者番号 : 00265258

(2) 研究分担者

石川三衛 (ISHIKAWA SANE)
自治医科大学・医学部・講師
研究者番号 : 70112620