

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09343

研究課題名(和文)好中球のRAGEによるくも膜下出血後脳血管攣縮機構

研究課題名(英文) Neutrophils induce cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage through receptor for advanced glycation endproducts

研究代表者

石井 宏史 (Ishii, Hiroshi)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：90634171

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)：好中球のRAGEがいかにくも膜下出血(SAH)後の脳血管攣縮を誘導するか研究を開始した。その結果

【1】隔壁培養により血腫由来HMGB1-好中球RAGE経路を介した好中球の遊走と核が細胞外に放出されるNETosisが観察された。そして攻撃モードに入るシグナル伝達経路を調べた結果、好中球RAGEの下流分子として活性化型Rhoが関与することが分かった。また【2】SAHマウスモデルにおいて好中球エラスターゼ(NE)による脳血管攣縮誘導機構が分かった。【3】自律神経を介した微小脳血管攣縮機構が分かった。好中球と自律神経による協働機構がSAHの早期脳損傷及び脳血管攣縮機構に関わるかは現在研究中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでくも膜下出血(SAH)後の脳血管攣縮(CVS)の治療標的としては脳血管自体のRhoシグナルやエンドセリンシグナルを対象にした治療薬が日本では認可されてきた。ところが今回我々が発見した新規CVS誘導機構は、血管が攣縮する遙か早くにRAGE依存的に末梢血や骨髄の好中球が脳血管に遊走、浸潤することで引き起こされることによるものと解明された。今後好中球のRAGEを介したシグナルを標的とすることでより早期により効果的な治療効果が期待される。これによりCVSだけでなくCVSに先行すると想定される早期脳損傷(EBI)の病態機構である可能性が示唆されたためEBIおよびCVS両者の治療標的となりうる。

研究成果の概要(英文)：We started to study how neutrophil RAGE induces cerebral vasospasm (CVS) after subarachnoid hemorrhage (SAH).

Results 【1】 We found by using transwell culture system that clot-derived HMGB1-neutrophil RAGE pathway triggered neutrophil migration and neutrophil extracellular trap. As a downstream molecule of RAGE in neutrophil, we identified active Rho using Western blotting. 【2】 Neutrophil elastase (NE) was found to aggravate CVS after SAH in WT mice. 【3】 Autonomic nerve-mediated micro-vasoconstriction mechanism after SAH was found. Whether the orchestrated mechanism between neutrophils and autonomic nervous system is involved in early brain injury and cerebral vasospasm after SAH is under investigation.

研究分野：脳神経外科、脳卒中、神経炎症、神経免疫、中枢神経系外傷

キーワード：くも膜下出血 脳血管攣縮 RAGE 好中球

## 1. 研究開始当初の背景

くも膜下出血(SAH)は主に脳動脈瘤の破裂により発症する。脳梗塞等他の脳卒中に比べ SAH 患者はより重症で、患者の3割以上は脳血管が攣縮し、死亡ないし麻痺・言語障害と重い後遺症を残す。また患者の約6割は生産年齢にあり、障害の予防法開発は極めて重要である。ここで研究代表者らは、新規 SAH 後脳血管攣縮誘導因子として好中球に発言する損傷関連分子 RAGE を同定した。研究開始当初に我々は以下 (1) - (6) の実験結果を得ていた。(1) SAH 後の神経症状が野生型(WT)に比べ RAGE 欠損(RAGE<sup>-/-</sup>)型で顕著に改善した。(2) SAH 後、WT に比べて RAGE<sup>-/-</sup>型では大脳細動脈及び主幹脳動脈の攣縮が強く抑制される。(3) 超急性期の脳動脈周囲に活性化した好中球が集積する一方で、RAGE<sup>-/-</sup>マウス SAH において殆ど観察されなかった。(4) 血管内皮特異的 RAGE<sup>-/-</sup>マウスでは SAH 後に神経症状と脳血管攣縮が改善されなかった。一方、好中球特異的 RAGE<sup>-/-</sup>マウスでは、神経症状と脳血管攣縮の改善が認められた。(5) マウス白血球を血腫と隔壁共培養すると、RAGE 依存的に好中球が血腫側に遊走する。そして細胞核を放出する NET(neutrophil extracellular trap)を起こす攻撃モードに入る。(6) SAH 後に新規 RAGE 阻害剤(C11)を投与するとマウスの神経学症状と脳血管攣縮が改善した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は DAMPs-RAGE 軸に依存した好中球による SAH 後の脳血管攣縮及び脳損傷メカニズムの解明と新規治療法の開発である。本研究が学術的に飛び抜けているのは、SAH 後病態の核心に迫ること、従って患者応用への有望性が挙げられる。しかし、これまでは脳血管攣縮における内皮細胞による攣縮作用のみが着目され、これが内皮細胞の細胞骨格制御分子 Rho キナーゼに対する阻害剤(塩酸ファスジル)が臨床適用されている根拠となっている。しかし依然顕著な患者予後の改善にまでは至っていない。これに対して、本研究は初めて末梢の好中球動員が SAH 後病態の核心であることを解明するものである。

## 3. 研究の方法

### 【1】好中球の遊走及び活性化における RAGE 下流シグナルの解明

SAH 3 時間後マウス末梢血の白血球 RT-PCR 実験にて、塩酸ファスジルの標的分子でもある RhoA/Rock1 の発現上昇を確認している。従って、好中球における Rac と RhoA の活性化を GTP 結合プルダウンアッセイ及びウェスタンブロットにて確認する。そして新規 RAGE 阻害剤 C11 による好中球の遊走能及び活性化に対する阻害効果を評価する。

### 【2】SAH 後の NET と酵素反応による脳血管攣縮誘導機構の検証

細胞培養系で観察された好中球による neutrophil extracellular trap (NET)が、SAH 後の脳血管周囲で DAMPs-RAGE 依存的に、実際に起こっているのかを検証する。DAPI による核染色と NET マーカーの抗ヒストン抗体を用い、特に SAH 後の超急性期である数時間を中心にまずは調べる。好中球に特徴的な消化酵素である neutrophil elastase (NE)は、NET の際に核に局在して、細菌や他の細胞を攻撃することが分かっている。そこで NE 欠損マウスにより、そして NE 阻害剤を SAH マウスモデルに投与することで、脳血管攣縮及び脳損傷が軽減するかを観察する。

### 【3】好中球による自律神経を介した脳血管攣縮誘導機構の解明

SAH後の脳血管攣縮は全周囲性に攣縮することから、好中球による炎症を契機とした自律神経、特に交感神経を介する血管攣縮機構が想定される。従ってSAH後に上頸神経節切除による交感神経遮断によりこれを立証する。【2】におけるNE欠損マウスやNE阻害剤投与実験の結果と比較することで、活性化好中球が脳動脈の交感神経を刺激して脳血管攣縮を誘導するのか検証する。

## 4. 研究成果

### 【1】好中球の遊走及び活性化における

#### RAGE下流シグナルの解明

野生型マウス骨髄より単離した好中球をHMGB1により刺激することで活性化Rhoが上昇することが分かった。一方でRAGE<sup>-/-</sup>マウス由来の好中球では同活性が低減する(図1)ことが分かり、RAGEの下流シグナルとしてRhoが関わることを示唆された。Rho阻害剤が日本ではSAH後のCVS予防薬および治療薬としてSAH発症後数日以降に使用されるが、好中球の

Rhoを治療標的の候補として想定すれば発症直後速やかに投与することが理想的だが、Rhoを抑制することで脳内出血のリスクを上げることが考えられているため、Rhoの上流分子である好中球のRAGEを標的とすることがより合理的だと考えられる。

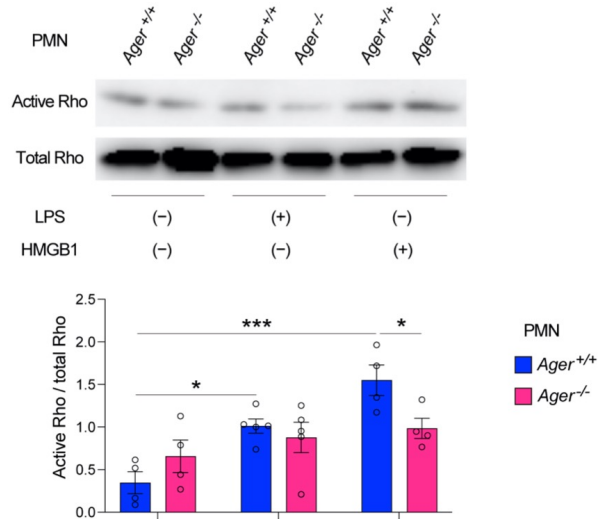


図1 RAGEに依存して活性化型Rhoが上昇する。

### 【2】SAH後のNETと酵

#### 素反応による脳血管攣縮誘導機構の検証

SAH作製直後にNET阻害剤を投与した結果、神経学スコアとCVSの改善を認めた(図2)。またRAGEのリグランドであるHMGB1の阻害剤を用いた実験でも同様の結果を確認できた。

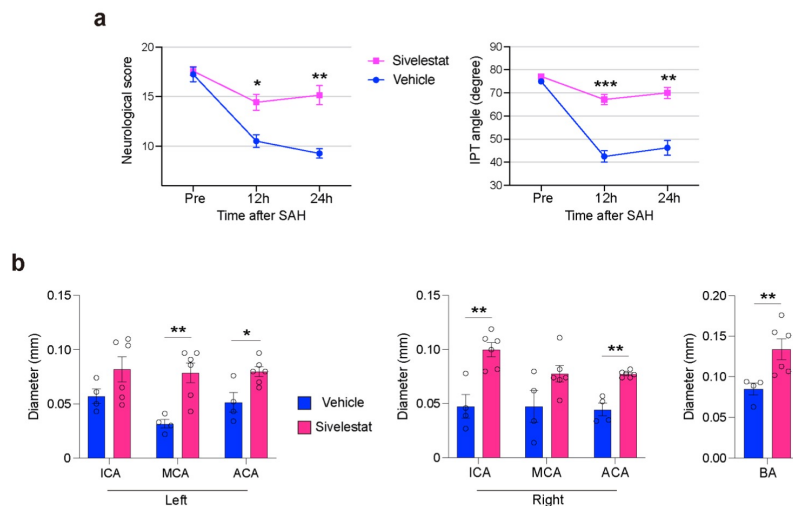


図2 好中球阻害剤投与により脳血管攣縮が改善する。

### 【3】好中球による自律神経を介した脳血管攣縮誘導機構の解明

SAH マウスモデルにおいて固定後に墨汁灌流することで大脳皮質の黒染を定量化したところ、超急性期の1-3時間において脳灌流量が一過性に低下することが分かった(図3)。

ここで研究代表者は「SAH後の脳損傷は、まず交感神経刺激による脳血管収縮が誘導され、更に協働する RAGE に依存した好中球の脳血管炎症が追い打ちをかけ不可逆な攣縮に至ることで完成する」と仮説を立て検証することにした。なぜなら超急性期に一過性に好中球による炎症だけでは可逆的に SAH 後6時間経ってから血流は回復しないだろうし、超急性期の1時間で既に灌流量が低下するにはやはり炎症反応による説明では余りに早過ぎるからである。

SAH 直後超急性期の血流低下(図3)は脳血管への交感神経によるものであるのかを確認するため、頭蓋内への交感神経支配の起点である上頸神経節を両側性に切除してから SAH を作製した。すると SAH 後1時間の脳血流が改善した(図4 矢頭:白く抜けた虚血像を指し示す; SCGX:上頸神経節切除)。そして脳浮腫の軽減と共に神経機能スコアも改善した。これらから SAH 後超急性期に交感神経が脳血流を抑制することで脳障害を来していることが示唆された。更に RAGE-/-マウスを用いて SCGX を施行することで SAH 後の CVS と脳血流の改善効果に相乗作用があるか否かを検証する予定である。

以上の研究結果より、好中球に発現する RAGE により、SAH 後の抹消血や骨髄の好中球が血腫の存在する脳血管へ遊走すること、そして好中球の炎症により CVS が誘導されることが示唆された。この好中球の遊走と活性化には RAGE 下流シグナルとして Rho が関わる可能性が示唆された。更に SAH 後超急性期には交感神経刺激により脳血流が一過性に傷害されることが分かった。それ以後に RAGE に依存した好中球による炎症が協働的に SAH 後の病態を司るか否かを検証するため引き続き研究を続ける予定である。

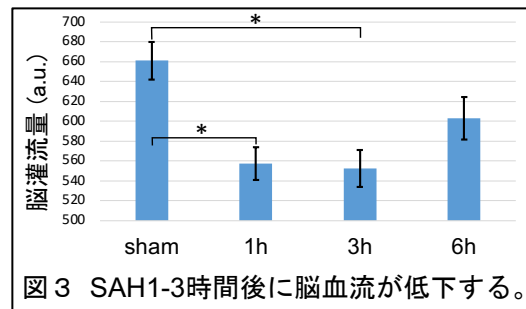


図3 SAH1-3時間後に脳血流が低下する。

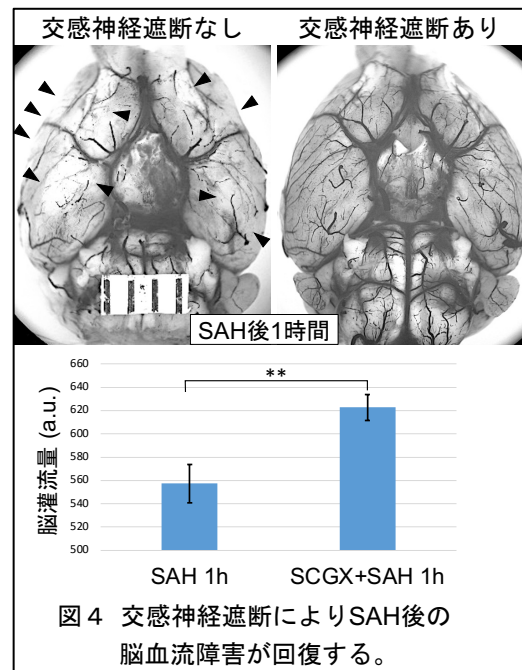


図4 交感神経遮断によりSAH後の脳血流障害が回復する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Munehiro Demura, Hiroshi Ishii, Mika Takarada-Iemata, Tomoya Kamide, Akifumi Yoshikawa, Mitsutoshi Nakada, Osamu Hori	4. 巻 54(6)
2. 論文標題 Sympathetic Nervous Hyperactivity Impairs Microcirculation Leading to Early Brain Injury After Subarachnoid Hemorrhage	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Stroke	6. 最初と最後の頁 1645-1655.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/STROKEAHA.123.042799.	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hiroshi Ishii, Yasuhiro Aida, Kosuke Okuma, Seiichi Munesue, Jureepon Robin, Tsuyoshi Hattori, Mika Takarada-Iemata, Mitsutoshi Nakada, Yasuhiko Yamamoto, Osamu Hori
2. 発表標題 DAMPs receptor-dependent leukocyte accumulation is critical pathology of cerebral vasospasm/neuronal dysfunction after subarachnoid hemorrhage
3. 学会等名 Neuro2022, Urasoe Japan
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石井 宏史, 会田 泰裕, 出村 宗大, 棟居 聖一, 服部 剛志, 實田 美佳, 山本 靖彦, 中田 光俊, 堀 修
2. 発表標題 くも膜下出血後のDAMPs依存的好中球炎症による脳血管攣縮分子病態
3. 学会等名 日本分子脳神経外科学会、金沢
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 脳血管攣縮抑制剤	発明者 石井 宏史、堀 修	権利者 石井 宏史、堀 修、国立大学法人金沢大学
産業財産権の種類、番号 特許、2022-47038	取得年 2022年	国内・外国の別 国内

〔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
---------	---------