

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17926

研究課題名（和文）出血性脳卒中の新たな治療ターゲットとしてのferroptosisの解明

研究課題名（英文）Ferroptosis as a New Therapeutic Target for Hemorrhagic Stroke

研究代表者

松原 博文（Matsubara, Hirofumi）

岐阜大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00800244

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：近年目覚ましい発展を遂げている虚血性脳卒中（脳梗塞）と比較し、出血性脳卒中（脳内出血およびくも膜下出血）の治療の進歩は停滞している感がある。本研究では、出血性脳卒中に着目し、機能予後の改善につながる治療ターゲットの模索を行った。中でもより重篤なくも膜下出血についてマウスモデルを用いた検討を行い、くも膜下出血後急性期に生じる脳血流の低下が、神経学的予後及び亜急性期の高次脳機能障害に寄与することを発見し、報告した。また、透析などに使用されるナファモスタットがくも膜下出血後の神経予後を改善する事を発見し、報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

出血性脳卒中は全脳卒中の10-15%程度を占める疾患であるが、半年後の日常生活自立率は約20%とされ、罹患者のみならずその家族の負担も大きい。発症後の症状の緩和・改善は罹患者・家族の負担軽減のみならず、医療経済にも大きく貢献できると考える。今回くも膜下出血後の脳血流低下が予後増悪に関与する事、ナファモスタットが新規治療薬の可能性のある事を報告した。出血性脳卒中後に生じる神経障害への治療法は皆無である現在において、直接的な神経傷害の軽減につながる報告となったと言える。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on hemorrhagic stroke and explored therapeutic targets that could improve functional prognosis. In a mouse model of subarachnoid hemorrhage, we found that decreased cerebral blood flow in the acute phase after subarachnoid hemorrhage contributes to neurological function and cognitive dysfunction in the subacute phase. We reported that nafamostat, an existing drug, improves neurological findings after subarachnoid hemorrhage.

研究分野：出血性脳卒中，虚血性脳卒中

キーワード：出血性脳卒中 フェロトーシス 急性脳障害

1. 研究開始当初の背景

近年目覚ましい発展を遂げている虚血性脳卒中（脳梗塞）に対する臨床的治療と比較し、出血性脳卒中（脳内出血；intracerebral hemorrhage；ICH およびクモ膜下出血；subarachnoid hemorrhage；SAH）の治療の進歩は停滞している感がある。基礎研究の領域においても、脳神経傷害の発生、進展機序の解明は遅れており、出血性脳卒中において臨床的に脳神経傷害を軽減する治療法は皆無と言ってよい。近年、新たな細胞死の経路として、ferroptosis が提唱された。Ferroptosis は apoptosis や necrosis とは形態の異なる、細胞内の遊離鉄に依存するタイプの細胞死であり、細胞内外からの鉄供給により活性酸素種（Reactive oxygen species；ROS）が産生されることにより発生する。脳神経疾患における ferroptosis の研究の歴史は非常に浅く、脳卒中との関連については不透明な部分が多かった。しかし、出血性脳卒中においては、脳実質内または脳脊髄腔内に放出された多量の血液の主成分である赤血球やその代謝産物である鉄が神経傷害に強く関与することはこれまでの数多くの報告より知られており、さらに多量の ROS の発生による酸化ストレスは出血性脳卒中後の神経傷害に関与するメカニズムの1つであることが示されている。よって、出血性脳卒中後の脳障害の機序として Ferroptosis がどのように関連するかを解明し、新たな治療ターゲットとしての可能性を模索した。

2. 研究の目的

本検討においてはより重篤な病態であるくも膜下出血に着目し、研究を行った。くも膜下出血後に生じる病態としてどのようなものが存在し、悪化に寄与するかを解明する事を検索した。さらに予後改善につながる治療薬が存在するか、どのような作用を呈するのかを検討した。最後に Ferroptosis との関連について、予後悪化に寄与するかを検討した。

3. 研究の方法

(1) In vivo model

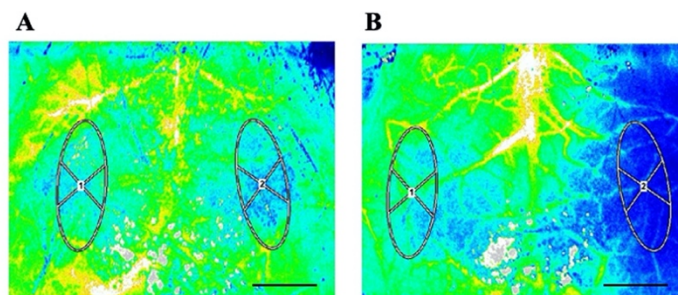
ddY マウスを使用したくも膜下出血のマウスモデルを作成した。具体的にはイソフルラン麻酔下に、マウスの頸部を切開し、外頸動脈を切断。切断部から 5-0 nylon 糸を挿入し、内頸動脈に挿入。内頸動脈終末部を穿孔し、くも膜下出血を引き起こす。その後外頸動脈は凝固・止血し手術を終了とした。この手技ののちに生じる変化として脳血流。神経学的所見、脳サンプルを用いたウエスタンブロット、脳切片による免疫染色などで評価した。

(2) In vitro model

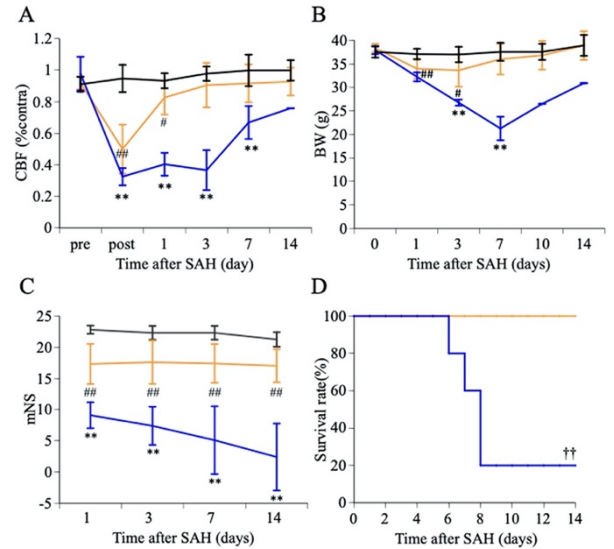
ヒト脳微小血管内皮細胞を用いた、くも膜下出血後病態を模したモデルを作成し、確立した。具体的には培養したヒト脳微小血管内皮細胞にトロンピンを添加し、低酸素処置を行った。その後細胞生存活性やウエスタンブロットでの評価を行った。

4. 研究成果

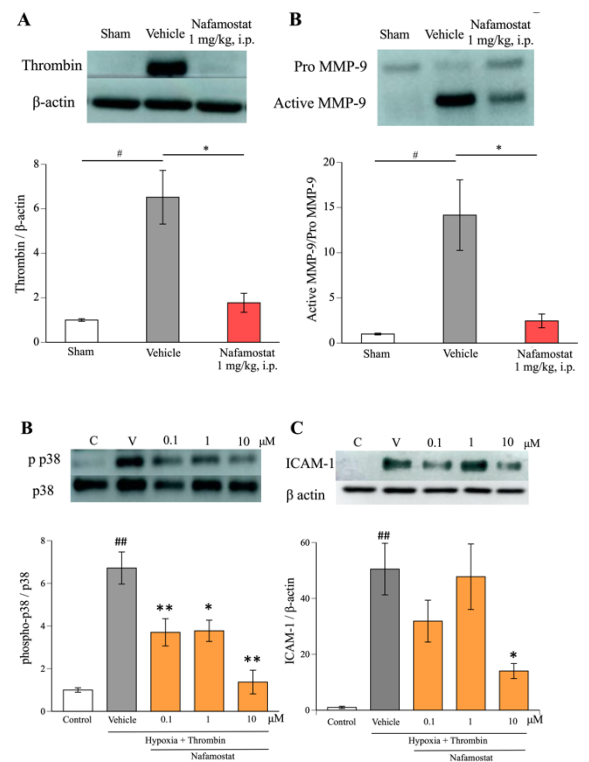
(1) 上述のくも膜下出血マウスモデルを用いた検討で、急性期の脳血流低下を極度に来たす例とそれ以外の例では、導入から1日後における神経学的所見に有意差がある事を発見し、報告した(JSCVD 2020)。図Aの例では神経学的悪化は軽微であったが、図Bでは悪化が顕著となった。つまり、くも膜下出血後に生じる脳血流の低下が急性期神経学的所見の悪化に寄与すると考えられた。



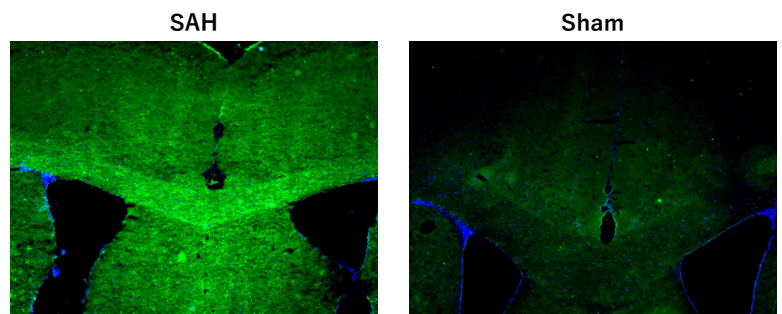
(2) 上述のくも膜下出血後の脳血流低下が長期予後に関与するかを検討した。結果脳血流低下が顕著な例では手技後の死亡率が有意に増加し、神経学的所見が増悪、さらに認知機能低下にも関与する事を発見した(JSCVD 2021)。右図における青線が血流低下群、黄色が血流維持群で、黒はコントロール群である。Aは脳血流、Bは体重、Cは神経学的所見、Dは生存率を示している。いずれの項目においても黄色の線である血流維持群が有意に改善していることが示された。脳血流の低下は急性期のみならず、亜急性期の状態悪化に寄与することが判明した。これに関しては第63回日本脳循環代謝学会で発表している。



(3) 既存薬であるナファモスタットを用いてくも膜下出血への有効性を検討した。これまで使用したくも膜下出血マウスモデルに対して手技直後、2・4・6時間後の合計4回ナファモスタット0.1 or 1 mg/kgを腹腔投与し、検討した。結果 vehicle 群と比べて1 mg/kg 投与群では有意に神経学的所見が改善した。また、術側脳サンプルを用いたウエスタンブロットではトロンビン、MMP-9の発現を有意に抑制していた(右図 A, B)。また、ヒト脳微小血管内皮細胞において、トロンビン+低酸素処置を行い、ナファモスタットの効果を検討したが、ナファモスタットは有意に p-38 のリン酸化と ICAM-1 の発現を抑制し(右図 B, C)、神経学的所見の改善に寄与したメカニズムの一つと考えた。これらについては第64回日本脳循環代謝学会で発表し、JPS 2022 に投稿している。



(4) くも膜下出血後の Ferroptosis と鉄蓄積について検討した。これまで使用した脳サンプルにおいて、導入1日後の術側脳サンプルを用いたウエスタンブロットで ferroptosis 関連因子の発現について検討を行った。しかし、今回の検討では GPX-4、4HNE 共に sham 群との有意差を見出せなかった。次に Ferroptosis と関連する鉄蓄積についてくも膜下出血脳サンプルを用いて免疫染色を行った。鉄のマーカーである Ferritin を用いたが、白質においてのみ Ferritin の発現上昇を認めることが発見された。先述のウエスタンブロットでは脳全体をサンプリングしており、白質などの局所に着目した検討では有意差が生まれる可能性がある。くも膜下出血においてのみ鉄蓄積が認められたことから、脳障害の一助に Ferroptosis が関与することが示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsubara Hirofumi, Imai Takahiko, Yamada Tetsuya, Egashira Yusuke, Nakamura Shinsuke, Shimazawa Masamitsu, Iwama Toru, Hara Hideaki	4. 巻 29
2. 論文標題 Importance of CBF measurement to exclude concomitant cerebral infarction in the murine endovascular perforation SAH model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases	6. 最初と最後の頁 105243 ~ 105243
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2020.105243	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 Matsubara Hirofumi, Imai Takahiko, Tsuji Shohei, Oka Natsumi, Ohba Takuya, Yamada Tetsuya, Egashira Yusuke, Nakamura Shinsuke, Shimazawa Masamitsu, Iwama Toru, Hara Hideaki	4. 巻 30
2. 論文標題 Involvement of Cerebral Blood Flow on Neurological and Behavioral Functions after Subarachnoid Hemorrhage in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases	6. 最初と最後の頁 105952 ~ 105952
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2021.105952	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 Matsubara Hirofumi, Imai Takahiko, Tsuji Shohei, Oka Natsumi, Egashira Yusuke, Enomoto Yukiko, Nakayama Noriyuki, Nakamura Shinsuke, Shimazawa Masamitsu, Iwama Toru, Hara Hideaki	4. 巻 148
2. 論文標題 Nafamostat protects against early brain injury after subarachnoid hemorrhage in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 65 ~ 72
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2021.10.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	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 松原博文, 今井貴彦, 岡なつみ, 江頭裕介, 中村信介, 嶋澤雅光, 原 英彰
2. 発表標題 くも膜下出血急性期におけるCBFは機能予後と関連する
3. 学会等名 第63回日本脳循環代謝学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松原博文, 今井貴彦, 辻 翔平, 岡なつみ, 江頭裕介, 中村信介, 嶋澤雅光, 岩間 亨, 原 英彰
2. 発表標題 ナファモスタットはマウスくも膜下出血後の早期脳損傷を抑制する
3. 学会等名 第64回日本脳循環代謝学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 松原博文, 原 英彰	4. 発行年 2021年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 115~128
3. 書名 脳卒中エキスパート 神経保護・神経再生療法 ~今後の展望と課題	

〔産業財産権〕

〔その他〕

岐阜大学医学部脳神経外科 http://www.med.gifu-u.ac.jp/neurosurgery/

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