

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16605

研究課題名(和文) くも膜下出血後の早期脳損傷における上皮成長因子受容体の役割の解明

研究課題名(英文) Role of epidermal growth factor receptor in early brain injury after subarachnoid hemorrhage

研究代表者

中野 芙美 (Nakano, Fumi)

三重大学・医学部附属病院・診療等従事者

研究者番号：50850731

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：くも膜下出血(Subarachnoid hemorrhage, SAH)後の脳血管攣縮および早期脳損傷(Early brain injury, EBI)が遅発性脳障害に至ると考えられている。EBIは神経細胞アポトーシスなど様々な病態を含み、その診断、治療法は確立していない。本研究ではマウスSAHモデルにおいてSAH後の上皮成長因子受容体(epidermal growth factor receptor, EGFR)活性化の神経細胞アポトーシスへの関与、及びその下流経路としてnuclear factor-kappa B (NFkB) inducing kinase/NFkBが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SAH患者の30-40%でDCIが生じ、これが脳梗塞へと発展すると転帰不良の原因となる。

本研究結果は、DCIへ至る原因の一つである神経細胞アポトーシスに関して、EGFRの活性化及びその下流にnuclear factor (NF)-kappa B inducing kinase (NIK)/NF-kappaB経路が働くことを示している。これにより、将来的にはEGFRを分子標的とした新しいEBI治療法の開発、そして予後の改善へと発展していくことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Subarachnoid hemorrhage (SAH) is a devastating disease which affecting relatively young people. Cerebral vasospasm and early brain injury (EBI) have been suggested to contribute to delayed cerebral ischemia (DCI) after SAH. EBI, such as neuronal apoptosis, has not been fully investigated. In this study, we investigated whether epidermal growth factor receptor (EGFR) activation results in neuronal apoptosis and sought signaling pathways under EGFR activation in a mouse SAH model.

SAH mouse showed deteriorated neurological function, brain edema, increased neuronal apoptosis, and these observations were improved in SAH-EGFR inhibitor group. Western blot and immunohistochemistry revealed that expressions of phosphorylated (p-) EGFR, nuclear factor-kappa B (NFkB) inducing kinase (NIK) in the nucleus, NFkB were increased in neurons of the SAH group, and decreased in the SAH-EGFR inhibitor group. EGFR/NIK/NFkB is suggested to be involved in neuronal apoptosis after SAH in mice.

研究分野：脳血管障害

キーワード：くも膜下出血 早期脳損傷

1. 研究開始当初の背景

くも膜下出血 (subarachnoid hemorrhage, SAH) は脳卒中の病型の中で比較的若年が罹患しかつ予後不良な疾患であり、約半数の症例が死亡する。救命し得ても遅発性神経脱落症状が認められ不良な転帰を辿ることが多い。SAH の治療成績は近年向上しているが、重症例においては依然として予後は不良である。遅発性脳障害の原因として 60 年以上前より脳血管攣縮が挙げられ研究されてきたが、近年、それに加え早期脳損傷 (early brain injury, EBI) の概念が提唱され盛んに研究されている。これは脳動脈瘤破裂から脳血管攣縮の起こる前までの頭蓋内イベントの総称で、脳動脈瘤破裂による頭蓋内圧の急激な上昇、それに引き続く脳灌流圧低下により起こると想定されている。微小循環障害、血液脳関門の破綻などの病態が含まれ最終的に神経細胞死を招くと考えられている。現在では脳血管攣縮および EBI はともに遅発性脳虚血障害 (delayed cerebral ischemia, DCI) の原因と見なされている。

動物モデルを用いて EBI に関わる様々な機序が報告されてきたが全貌は解明されておらず、有効な治療法が存在しない。EBI の発生機序として、凝固活性化、炎症、神経細胞アポトーシスなどが想定されており、これらにより微小血栓形成、血液脳関門の破綻、神経細胞死に至り (Budohoski, et al. J Neurol Neurosurg Psychiatry 85:1343-1353, 2014) 臨床上の問題となる DCI につながると考えられている。SAH 患者の 30-40% で DCI が生じ、これが脳梗塞へと発展すると転帰不良の原因となる。脳血管攣縮を伴わない脳梗塞症例の存在が広く知られるようになり、EBI と DCI あるいは転帰不良との因果関係が着目されるようになってきた (Vergouwen, et al. Stroke 42:924-929, 2011) このような流れにおいて、EBI の主要病態である神経細胞アポトーシスの発生機序を解明することは重要と考えられる。

研究代表者は以前より SAH 後の病態に様々な受容体やそのリガンドが関与することを報告してきた。その中で上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) に着目し、EGFR が EBI 発生に関与するという仮説を立てた。本研究ではマウス SAH モデルを用いて EGFR が SAH 後の EBI の中でも特に神経細胞アポトーシス発生に関与するかどうかを検討した。

2. 研究の目的

これまで研究代表者は特殊な細胞外マトリックス蛋白であるマトリセルラー蛋白に属するテネイシン C に着目した検討を行ってきた。テネイシン C は EGFR のリガンドの一つであり、ヘパリン結合性上皮成長因子 (epidermal growth factor, EGF) などと共に SAH 後に発現増強し、EGFR を活性化することで炎症様の作用を示し神経所見の増悪につながると考えられる。研究代表者や研究代表者が属する研究グループでは EGFR 活性化による脳血管攣縮の増悪 (Nakano, et al. Mol Neurobiol 56:4730-4740, 2019) テネイシン C の発現増強による SAH 後の血液脳関門障害 (Fujimoto, et al. J Neurosurg 124:1693-1702, 2016) 神経細胞アポトーシスや神経炎症 (Liu, et al. Mol Neurobiol 55:8346-8354, 2018) の発生に関する多くの報告を行ってきた。これらの知見より、EGFR の活性化が EBI の病態に寄与しているという仮説を立てた。

この仮説が証明された場合、EGFR が新たな EBI 治療の標的分子になり得ると考え、本研究を計画した。

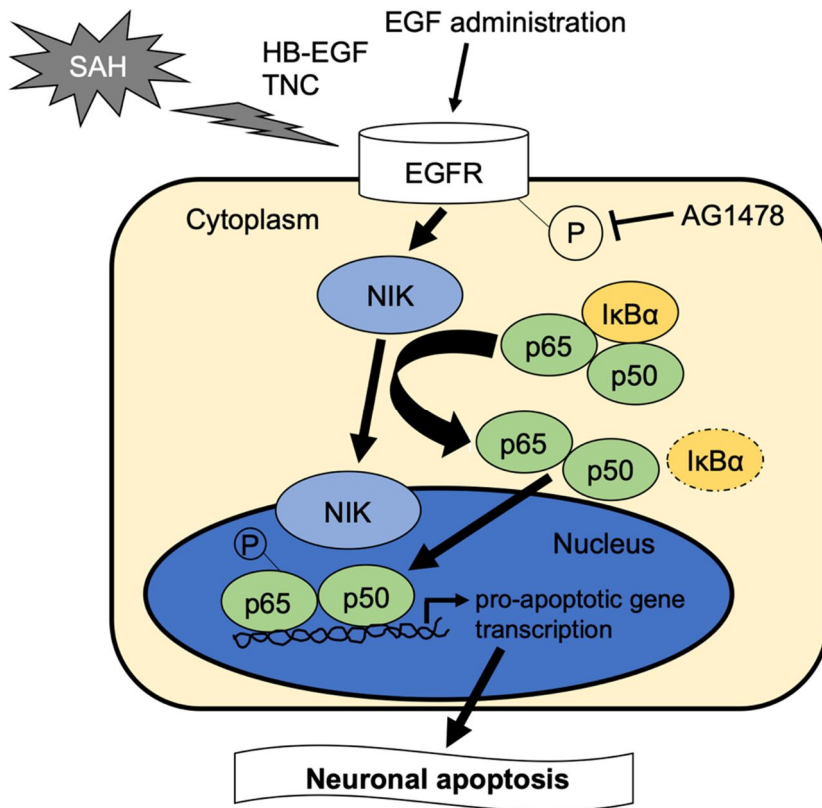
本研究の目的は SAH 後の EGFR 活性化により神経細胞アポトーシスが誘発されることを示すことである。EBI と EGFR の関連については、研究代表者が知る限り今までに 1 報のみ報告がある (Peng, et al. Exp Neurol 320:113008, 2019) この論文では選択的 G 蛋白質共役受容体 30 作動薬である G1 が SAH 後の神経細胞アポトーシスを抑制することを報告しており、その作用機序の一部として EGFR の活性化が関与する可能性を示していることから、本研究の趣旨とは正反対の機序であった。しかし、この選択的 G 蛋白質共役受容体 30 作動薬 G1 の神経保護効果はオスのラットでのみ認められ、メスのラットでは認められなかったことや、SAH 患者は女性で多いことなどを考えると、Peng らの論文 (Exp Neurol 320:113008, 2019) の内容はさらに検証する必要があると考えられる。一方で、EGFR の活性化に伴う有害事象については、SAH 動物モデルにおいては細動脈の血管攣縮の発生 (Koide, et al. Acta Neurochir Suppl 115:179-184, 2013) 脊髄損傷モデルにおいてはグリア細胞を介する神経損傷の発生機序への関与 (Ju, et al. Glia 60:1801-1814, 2012) など、多くの報告がある。EGFR の下流の細胞内情報伝達機構に関わる因子として細胞外シグナル調節キナーゼ 1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2, ERK1/2) があり、この分子は脳虚血モデルにおいて 2 面性、すなわち軽度・一過性の脳虚血刺激では神経保護、重度・持続性の脳虚血刺激では神経損傷の方向に働くことが報告されている (Zhou, et al. ASN Neurol 7:1-16, 2015) したがって、実験条件 (SAH の重症度など) により EGFR の活性化が神経保護あるいは神経損傷のどちらに寄与するのか異なる可能性も考えられる。本研究では、臨床でみられる SAH 状態を最も再現すると考えられ、急性期 SAH モデルとして確立している血管内穿孔法による SAH モデルを用いて、EGFR が SAH 後の EBI 発生にどのように関与するのかに関し明らかにするのを目的とする。過去に EGFR そのものが EBI 発生に関与するかどうかを直接、検討した研究はなく、その点で本研究の獨創性は高いと考える。

3. 研究の方法

血管内穿通法によるマウス SAH モデルにて、特異的 EGFR 阻害薬を脳室内投与することで SAH 後の神経所見及び神経細胞アポトーシスが抑制されるかを検討し、その下流経路の検索を行った。SAH モデルはオスのマウス (C57BL/6, 体重 20-25g) を用いた。全身麻酔後、顕微鏡下で頸部を皮膚切開、頸動脈を露出させ、外頸動脈より挿入した先端を尖らせた 4-0 ナイロン糸を内頸動脈へ進め、前大脳動脈と中大脳動脈の分岐部で穿孔させ、SAH を起こさせた。Sham 手術では同様の操作を行うが、ナイロン糸で血管穿孔は起こさずに手術を終了した。薬剤の脳室内投与は、マウスを定位頭部固定装置に固定し、頭頂部の皮膚を切開、顕微鏡下で bregma から 0.2mm 尾側、1.0mm 外側に burr hole を穿ち、ハミルトンシリンジを用いてモデル作成 30 分後に各薬剤を脳室内注入した。神経学的所見の評価は、6 項目 (活動性、四肢の自発運動、上肢の進展反射、登板能力、体幹部の感覚、頬ひげの刺激への反応) を評価し、総合点で比較した。神経細胞アポトーシスの評価は terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated d-UTP nick-end labeling (TUNEL) 法及び cleaved-caspase 3 染色で行った。また脳浮腫の改善が見られるかは脳水分含有量を計算し観察した。次に EGFR の下流経路に含まれる分子の発現量変化をウエスタンブロット法で、脳内発現の局在変化を免疫染色法を用いて検討した。さらに SAH マウス及び sham マウスに EGF を投与することで、EGFR 阻害薬による反応とは逆の現象が観察されることを確認した (神経細胞アポトーシス、神経学的所見、免疫染色法)。

4. 研究成果

SAH マウスにおいて、モデル作成 24 時間後の temporal base cortex における cleaved-caspase 3 発現増強と神経細胞アポトーシス増加、神経所見増悪、脳浮腫増悪を認め、EGFR 阻害薬投与によりこれらが抑制された。モデル作成 72 時間後においても同様に EGFR 阻害薬の治療効果が見られた。12.6-3160.0ng の EGFR 阻害薬を投与したところ、最も治療効果の高い量は 632.0ng であった。以降の検討は 632.0ng 投与で行った。研究代表者は以前の検討で SAH 後の脳血管攣縮における EGFR-ERK1/2 経路の関与を報告したが (Nakano, et al. Mol Neurobiol 56:4730-4740, 2019) phosphorylated (p-) ERK1/2 の免疫染色を行ったところアポトーシスを起こしている神経細胞での発現増強を認めなかった。SAH 後の神経細胞アポトーシスにおいて、EGFR の下流に ERK1/2 以外の経路が関与していると想定し検索を行った。モデル作成 24 時間後の脳皮質を用いたウエスタンブロットでは、SAH 後には p-EGFR、nuclear factor-kappa B (NF-kB)-inducing kinase (NIK)、NFkB サブタイプのうち p50 及び p-p65 の発現量が増加しており、EGFR 阻害薬投与により p-EGFR、p50、p-p65 の発現量が低下していた。NFkB サブタイプのうち NFkB2 の成熟体である p52 は SAH 脳では検出されなかった。核分画を抽出しウエスタンブロットを行なったところ、SAH 後に発現増加していた NIK は EGFR 阻害薬投与により発現量が低下していた。免疫染色を行い temporal base cortex を観察すると、ウエスタンブロットで発現増加が見られていた分子が形態的にアポトーシスを起こしている神経細胞において同様に発現増強し、EGFR 阻害薬投与により発現が減少していることがわかった。これらの神経細胞内局在は SAH 後には p-EGFR は細胞体、NIK、p105/50、p-p65 は核であり、EGFR 阻害薬投与により NIK は細胞質での発現にとどまっていた。NIK と p-EGFR の免疫二重染色を行ったところ、SAH 群のアポトーシスを起こしている神経細胞において二重陽性を認め、EGFR 阻害薬投与により二重陽性細胞が減少したことより、SAH 後の神経細胞アポトーシスのシグナル伝達経路として p-EGFR の下流に NIK が存在することが示唆された。EGF 投与により上記 EGFR 阻害薬の治療効果が打ち消されることを神経所見、神経細胞アポトーシス、免疫染色により確認した。すなわち、SAH 後に EGFR 阻害薬に加えて EGF 投与を行った群では神経所見の悪化、神経細胞アポトーシスの増加を認め、免疫染色において神経細胞体での p-EGFR、神経核での NIK、p-p65 及び p105/50 の発現増強を認めた。これらの実験結果より、SAH 後の神経細胞アポトーシスに EGFR/NIK/NFkB (p65 及び p50) 経路が関与していることが示唆された (下図参照)。今後、EGFR を分子標的とした新しい EBI 治療法の開発へと発展していくことが期待される。本研究結果は米国心臓協会のオフィシャルジャーナルである Stroke 誌に採択され、その表紙に採用された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Fumi Nakano, Hideki Kanamaru, Fumihiro Kawakita, Lei Liu, Yoshinari Nakatsuka, Hirofumi Nishikawa, Takeshi Okada and Hidenori Suzuki | 4. 巻 54 |
| 2. 論文標題 Epidermal growth factor receptor mediates neuronal apoptosis after subarachnoid hemorrhage in mice | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Stroke | 6. 最初と最後の頁 1616-1626 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/STROKEAHA.122.041977 | 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 Hidenori Suzuki, Fumihiro Kawakita, Reona Asada, Fumi Nakano, Hirofumi Nishikawa, Masashi Fujimoto | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Old but still hot target, glutamate-mediated neurotoxicity in stroke. | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Translational Stroke Research | 6. 最初と最後の頁 216-217 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12975-021-00958-6 | 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 Hideki Kanamaru, Fumihiro Kawakita, Hirofumi Nishikawa, Fumi Nakano, Reona Asada, Hidenori Suzuki | 4. 巻 18 |
| 2. 論文標題 Clarithromycin ameliorates early brain injury after subarachnoid hemorrhage via suppressing periostin-related pathways in mice | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Neurotherapeutics | 6. 最初と最後の頁 1880-1890 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13311-021-01050-5 | 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 Fumihiro Kawakita, Fumi Nakano, Hideki Kanamaru, Reona Asada, Hidenori Suzuki | 4. 巻 15 |
| 2. 論文標題 Anti-apoptotic effects of AMPA receptor antagonist peramppanel in early brain injury after subarachnoid hemorrhage in mice | 5. 発行年 2024年 |
| 3. 雑誌名 Translational Stroke Research | 6. 最初と最後の頁 462-475 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12975-023-01138-4 | 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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 中野英美、金丸英樹、川北文博、Liu Lei、中塚慶徳、西川拓文、岡田健、芝真人、鈴木秀謙 |
| 2. 発表標題 マウスくも膜下出血モデルにおける上皮成長因子受容体阻害剤の神経アポトーシス抑制効果の検討 |
| 3. 学会等名 第22回日本分子脳神経外科学会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 鈴木秀謙、川北文博、浅田玲緒尚、中野英美 |
| 2. 発表標題 早期脳損傷およびスパズムを含む遅発性脳虚血の基礎病態 |
| 3. 学会等名 第80回日本脳神経外科学会総会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 鈴木 秀謙, 川北 文博, 中野 英美, 金丸 英樹, 西川 拓文, 藤本 昌志, 安田 竜太, 当麻 直樹 |
| 2. 発表標題 くも膜下出血後の遅発性脳虚血に対する介入標的としてのテネイシンCの可能性 |
| 3. 学会等名 第55回日本結合組織学会 |
| 4. 発表年 2023年 |

〔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 |
|---------|---------|
|---------|---------|