

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462164

研究課題名(和文) くも膜下出血後脳血管攣縮の新たな分子機構の解明と発症予測バイオマーカーの同定

研究課題名(英文) Elucidation of novel molecular mechanisms underlying the development of cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage and searching for biomarkers of vasospasm

研究代表者

吉川 雄一郎 (Kikkawa, Yuichiro)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80423515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：くも膜下出血(SAH)後の脳血管攣縮は、遅発性に発症する主幹脳動脈の持続性の狭小化をもたらし、脳虚血を引き起こすことでSAH患者の予後を大きく左右する。しかし、その詳細な分子メカニズムは解明されていない。本研究では、くも膜下出血後のウサギ攣縮脳血管におけるマイクロアレイ解析により発現上昇を示した分子であるrelaxin、TIMP-1、MMP9の血管収縮性増大における役割を明らかにした。SAH後のrelaxin受容体の発現低下はくも膜下出血後の血管平滑筋持続収縮に、TIMP1/MMP9のアンバランスはくも膜下出血後の血管リモデリングの亢進に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage (SAH) is characterized by delayed and prolonged contraction of cerebral arteries, which causes cerebral ischemia, thereby determining the prognosis of both life and neurologic function of SAH patients. The molecular mechanisms of cerebral vasospasm remain to be elucidated. In this study, we investigated the roles of several molecules including relaxin, TIMP-1 and MMP9, which were revealed to be upregulated in the rabbit basilar artery after SAH by microarray analysis, in increased vascular contractility after SAH. As a result, it is suggested that down-regulation of relaxin receptor expression and impaired TIMP-1/MMP9 balance contribute to acquiring persistency of vascular smooth muscle contraction and enhancement of vascular remodeling after SAH, respectively.

研究分野：脳神経外科

キーワード：くも膜下出血 脳血管攣縮 血管平滑筋収縮 血管リモデリング

1. 研究開始当初の背景

くも膜下出血 (SAH) 発症後数日を経て生じる脳血管攣縮は、脳主幹動脈が遅発性、持続性かつ可逆的に狭窄する現象であり、これにより、脳虚血が引き起こされ、SAH 患者は神経脱落症状を呈し死亡に至ることもあるため、SAH に続発する脳血管イベントの中でも最も重要なものの一つと考えられている。したがってくも膜下出血患者治療においては脳血管攣縮の予防と治療が重要な役割を担う。これまでに、脳血管攣縮の発症や進行に寄与すると考えられるさまざまなメカニズムが明らかにされてきたが、未だ決定的な機序の解明には至っていない。

我々はこれまでに、血管平滑筋収縮機構ならびにその関連分子の発現に着目し、くも膜下出血後の血管平滑筋収縮性増大が、脳血管攣縮の発症基盤として重要な役割を担うことを明らかにしてきた。さらに、網羅的遺伝子発現解析により、くも膜下出血発症早期に攣縮血管における遺伝子発現が大きく変化し、遅発性の血管平滑筋形質転換に寄与する可能性も明らかにした。血管攣縮は複雑で様々な因子が関与した病態であると考えられている。したがって病態の鍵となるような遺伝子の抽出や、それらの多彩な遺伝子機能ネットワーク内の相互作用の解明により、病態メカニズムを明らかにできる可能性があると考えられる。本研究では動物病態モデルの攣縮脳血管の遺伝子発現解析に基づき、くも膜下出血後の血管平滑筋収縮性増大に関与する分子を同定し、その役割を明らかにすることを目標とした。

2. 研究の目的

くも膜下出血後の脳血管攣縮発症に関与すると考えられる新規分子を同定し、脳血管収縮性増大におけるその役割を解明するとともに、脳血管攣縮発症における発症予測バイオマーカーとしての役割を検討する。

3. 研究の方法

オス日本白色ウサギを用い、初日、2日目の2回、大槽内に自家血を投与し、くも膜下出血モデルを作成した。対照モデルは自家血の代わりに生食を大槽内に注入した。発症X日目に摘出した脳底動脈を用い、microarray解析による網羅的遺伝子発現解析、リアルタイムPCR法による mRNA 発現解析、ミオシン軽鎖のリン酸化レベル測定、免疫染色、免疫プロット法、ELISA による蛋白質発現解析を行った。攣縮血管径の評価は、CT アンギオグラフィもしくは灌流固定切片における血管径測定により行った。

4. 研究成果

(1) ウサギ SAH モデル脳底動脈における relaxin ならびに受容体の発現
ウサギ SAH モデルの摘出脳底動脈におけるマ

イクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析により、SAH 後に有意な変動を認めた分子のひとつである relaxin に着目し、さらなる検討を行った。まず、ウサギ SAH モデル脳底動脈における relaxin の発現変化を PCR 法を用いて検討したところ、relaxin は SAH 発症3日目より上昇し始め7日目に有意となった。Relaxin はその受容体 RXFP1 を介して血管平滑筋の弛緩に関与すると考えられるが、PCR 解析の結果、RXFP1 の発現は発症3日後より有意に発現低下し、7日目まで持続した。さらにウサギ SAH モデルの髄液中の relaxin 濃度は、SAH 発症後に徐々に上昇し5日目に有意となり7日目にピークに達した。一方、血中の relaxin 濃度は SAH 発症後、有意な変動を示さなかった。また、免疫プロット法により RXFP1 の局在ならびに発現変化を検討したところ、血管平滑筋層を中心に、発症3日目より7日目まで持続する有意な発現低下を認めた。ヒト培養平滑筋細胞を用いて relaxin により前処置を行ったものとそうでないものとの、血管収縮刺激物質であるエンドセリンにより刺激を行い、ミオシン軽鎖 (MLC) リン酸化反応の推移を調べたところ、relaxin により前処置を行った平滑筋細胞では刺激後の持続相における MLC リン酸化反応が有意に低下した。したがって、relaxin は血管平滑筋の持続収縮を抑制的に制御している可能性が示唆された。SAH 後のウサギ脳底動脈においては、SAH 後に relaxin の上昇を認める一方でその受容体発現は持続的に低下し、relaxin の作用自体は減弱していると考えられる。そのため、SAH 後の relaxin 受容体の発現低下により SAH 後の平滑筋収縮の持続相の抑制が障害されている可能性が示唆された。

(2) ウサギ SAH モデル脳底動脈における TIMP-1、MMP9 の発現

網羅的遺伝子発現解析により、SAH 後に有意な変動を示した分子の中で、脳血管攣縮の時間経過と一致して経時的にもっとも大きな変動を示した分子のひとつである TIMP1、MMP9 に関する検討を行った。これらの分子は血管平滑筋の弛緩や血管リモデリングにも深く関与しており、脳血管収縮制御機構に関与している可能性があると考えたためである。まず、ウサギ SAH モデル脳底動脈における経時的発現変化を、PCR、免疫染色、ELISA 法を用いて検討した。TIMP1 mRNA の発現は3日目をピークに一過性に上昇し、その後減少した。タンパク質の発現は、3日目をピークに5日目まで有意に発現上昇しその後減少した。MMP9 のタンパク質発現は7日目をピークに徐々に上昇した。活性化型の MMP9 タンパク質の発現は徐々に上昇し day7 に有意な上昇を示した。MMP9/TIMP1 比は漸増し発症7日目に著明な上昇を示した。したがって、発症7日目にかけて TIMP-1 の発現に比べ相対的に MMP9 が過剰に発現し、血管のリモデリングが

発症7日目のスパズム極期にかけて亢進している可能性が示唆された。免疫染色では、TIMP-1は発症3日目において、中膜と内膜でその発現亢進を認め、その後徐々に発現が低下した。また、MMP9は発症3日目より内膜、中膜で発現し始め、5~7日目で最も強発現した。その結果TIMP1は発症後3~5日目にかけて上昇しその後徐々に減少するが、MMP9は発症後7日目にかけて漸増することが明らかとなり、こうしたTIMP1/MMP9のアンバランスがSAH後の脳血管におけるリモデリングの亢進に寄与している可能性が示唆された。

(3)SAH患者の髄液・血液中のrelaxin、TIMP-1、MMP9の発現

TIMP1、MMP9、relaxinといった攣縮血管における発現変動分子が実際のSAH患者の血液、髄液中においてどのような変化を示すかについて検証した。くも膜下出血発症後1、3、5、7、9、11日に患者の髄液、血液サンプルを採取した。ELISAによりTIMP1、MMP9、relaxinの髄液中、血中濃度を測定した。その結果、いずれの蛋白質の発現も検出できなかった。また、髄液、血液サンプルからmRNAを抽出し同分子の発現をリアルタイムPCRにより測定した。その結果いずれの分子においてもmRNA発現は認められたが有意な経時的発現変化は認めなかった。したがって、SAHモデルで認められた攣縮血管におけるTIMP1、MMP9、relaxinの発現変化は血中、髄液中には反映されていない可能性が示唆され、現時点ではSAH患者の脳血管攣縮発症の生物マーカーとしての役割は低いと考えられた。

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20件)

1. Yokosako S, Kikkawa Y, Takeda R, Ikeda T, Kurita H: Acute ophthalmoplegia in patients with ruptured middle cerebral artery aneurysm. *J Med Invest* 64(1.2):165-167, 2017. doi: 10.2152/jmi.64.165. (査読あり)
2. 吉川雄一郎、大熊理弘、佐藤大樹、柳川太郎、鈴木海馬、浦丸浩一、中島弘之、池田俊貴、竹田理々子、栗田浩樹: 当施設におけるくも膜下出血開頭手術患者の術後経過における年齢因子の関与。脳血管攣縮 32: 10-13, 2016 (査読あり)
3. 吉川雄一郎、栗田浩樹: 脳卒中に対する予防的外科手術。特集 脳卒中はこう診る~新ガイドラインで何が変わったか。内科臨床誌 medicina 53 (2), 医学書院, 東京, 2016, pp. 310-312 (査読なし)
4. 吉川雄一郎: スパズム期の看護。BRAIN NURSING 32 (8), メディカ出版, 東京, 2016, pp. 92-95 (査読なし)
5. 佐藤大樹、吉川雄一郎、武裕士郎、大熊理弘、中島弘之、竹田理々子、柳川太郎、鈴木海馬、池田俊貴、栗田浩樹: 破裂動脈瘤に対する非急性期における開頭手術。脳血管攣縮 32: 31-35, 2016 (査読あり)
6. Kikkawa Y, Kurogi R, Sasaki T: The single and double blood injection rabbit subarachnoid hemorrhage model. *Transl Stroke Res* 6(1):88-97, 2015. doi: 10.1007/s12975-014-0375-5. (査読あり)
7. Kikkawa Y, Kameda K, Matsuo S, Kurogi R, Nakamizo A, Mizoguchi M, Sasaki T: Mechanism underlying Increased Vascular Smooth Muscle Contractility in the Rabbit Basilar Artery following Subarachnoid Hemorrhage. *Acta Neurochir Suppl* 120:95-8, 2015. doi: 10.1007/978-3-319-04981-6_16. (査読あり)
8. Kurogi R, Kikkawa Y, Matsuo S, Nakamizo A, Mizoguchi M, Sasaki T: Upregulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 contributes to restoration of the extracellular matrix in the rabbit basilar artery during cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *Brain Res* 1616: 26-36, 2015. doi: 10.1016/j.brainres.2015.04.049 (査読あり)
9. Ikeda S, Takai K, Kikkawa Y, Takeda R, Ikeda T, Kohyama S, Kurita H: Ruptured posterior spinal artery aneurysm: intraoperative and histological findings with appreciable thrombosis. *Spine J.* 2015. doi: 10.1016/j.spinee.2015.11.015. (査読あり)
10. 吉川雄一郎、池田俊貴、中島弘之、山口陽平、竹田理々子、小倉文司、大井川秀聡、栗田浩樹: くも膜下出血急性期のclipping: 現状と展望。Neurosurg Emerg 20: 45-48, 2015. (査読あり)
11. 吉川雄一郎、池田俊貴、中島弘之、山口陽平、竹田理々子、小倉文司、大井川秀聡、栗田浩樹: 当施設におけるくも膜下出血開頭術後患者の周術期管理と治療成績。脳血管攣縮 31: 21-25, 2015. (査読あり)
12. 中溝 玲、吉川雄一郎、黒木亮太、松島俊夫、飯原弘二: もやもや病患者におけるうつ状態の発生と前頭葉機能に関する検討。脳卒中の外科 43, 289-293, 2015. (査読あり)
13. 栗田浩樹、竹田理々子、池田俊貴、吉川雄一郎、伏原豪司、大井川秀聡、小倉文司、石原正一郎: 脳動脈瘤・脳動静脈奇形に対するhybrid手術の現状と展望: 直

- 達術の立場より．脳外誌 24: 173-179, 2015. (査読あり)
14. 黒木亮太、佐山徹郎、瀧口昌弘、中瀧 玲、森 恩、橋口公章、天野敏之、吉川雄一郎、吉本幸司飯原弘二：ラットくも膜下出血モデルにおける MMP-9 関連 microRNA の発現解析．脳血管攣縮 31: 87, 2015. (査読あり)
 15. Kikkawa Y: A Rabbit Cisterna Magna Double Injection Subarachnoid Hemorrhage Model. Acta Neurochir Suppl 120:331-5, 2015. doi: 10.1007/978-3-319-04981-6_57. (査読あり)
 16. Kayahara T, Takeda R, Kikkawa Y, Take Y, Kurita H: Hyperperfusion syndrome after aneurysm surgery: case report. Acta Neurochir (Wien) 157 (11): 1855-1857, 2015. doi: 10.1007/s00701-015-2567-5.(査読あり)
 17. Kikkawa Y, Matsuo S, Kurogi R, Nakamizo A, Mizoguchi M, Sasaki T: Upregulation of relaxin after experimental subarachnoid hemorrhage in rabbits. Biomed Res Int:836397, 2014. doi: 10.1155/2014/836397. (査読あり)
 18. 吉川雄一郎、松尾諭、黒木亮太、中瀧 玲、瀧口昌弘、飯原弘二、佐々木富男：ウサギくも膜下出血モデルにおける ultra-high resolution CT を用いた脳血管攣縮と脳微小循環評価の試み．脳血管攣縮 30: 63, 2014. (査読なし)
 19. 栗田浩樹、大井川秀聡、竹田理々子、池田俊貴、吉川雄一郎、伏原豪司、石原正一郎：Multimodal treatment 時代の AVM 直達術：technical considerations . Mt. Fuji Workshop on CVD 32: 19-23, 2014. (査読なし)
 20. 黒木亮太、吉川雄一郎、松尾諭、中瀧 玲、瀧口昌弘、飯原弘二、佐々木富男：ウサギくも膜下出血モデルの脳血管における細胞外マトリックス代謝調節メカニズムとその役割に関する検討．脳血管攣縮 30: 64, 2014. (査読なし)
- [学会発表](計 16 件)
1. Kikkawa Y, Uramaru K, Sato H, Yanagawa T, Suzuki K, Okuma M, Nakajima H, Takeda R, Kurita H: Analyses of CSF and serum miRNA expression in SAH patients suggest important roles in restoration of impaired vascular homeostasis after SAH. International Stroke Conference 2017 (17/2/22-24, Houston, USA)
 2. Uramaru K, Kikkawa Y, Sato H, Yanagawa T, Suzuki K, Okuma M, Nakajima H, Takeda R, Kurita H: Acute catecholamine surge in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage: Characteristics and prognostic value. International Stroke Conference 2017 (17/2/22-24, Houston, USA)
 3. 吉川雄一郎:「報告講演」 脳血管攣縮の発症メカニズムに関する研究．第 4 回 Clinical Science Forum (17/1/21 日高, 埼玉)
 4. 吉川雄一郎:「講演」 文献レビュー(基礎研究編): 第 42 回日本脳卒中学会総会・第 46 回日本脳卒中の外科学会学術総会・第 33 回スパズム・シンポジウム (STROKE 2017) (17/3/16-19 大阪国際会議場, 大阪)
 5. 吉川雄一郎: くも膜下出血後の髄液・血清中の miR15a および KLF4 の経時的発現変化 (シンポジウム「スパズムの萌芽的研究・治療」). 第 42 回日本脳卒中学会総会・第 46 回日本脳卒中の外科学会学術総会・第 33 回スパズム・シンポジウム (STROKE 2017) (17/3/16-19 大阪国際会議場, 大阪)
 6. Kikkawa Y: [Special lecture] Mechanisms underlying increased vascular contractility after subarachnoid hemorrhage. 13th International Conference on Neurovascular Events after SAH, Vasospasm2015 (15/9/17-19, Karuizawa, Japan)
 7. Kikkawa Y, Ooigawa H, Ikeda T, Nakajima H, Ito S, Yamaguchi T, Shimohigoshi W, Teranishi A, Ikegami M, Kurita H: Management and clinical outcome of aneurysmal subarachnoid hemorrhage patients with surgery in our institute: seven-year survey in Saitama medical university international medical center. 13th International Conference on Neurovascular Events after SAH, Vasospasm2015 (15/9/17-19, Karuizawa, Japan)
 8. Kikkawa Y, Matsuo S, Kurogi R, Takeda R, Ikeda T, Yamaguchi Y, Nakajima H, Ogura T, Ooigawa H, Kurita H: Upregulation of relaxin after experimental subarachnoid hemorrhage. 14th Asian Australasian Congress of Neurological Surgeons (AACNS) (15/4/15-18, Jeju Island, Korea)
 9. Kikkawa Y, Kurogi R, Matsuo S, Takeda R, Ikeda T, Yamaguchi Y, Nakajima H, Ogura T, Ooigawa H, Kurita H: Chronological change of vasospasm and microcirculatory disturbance after experimental subarachnoid hemorrhage. 14th Asian Australasian Congress of Neurological Surgeons (AACNS) (15/4/15-18, Jeju Island, Korea)
 10. Kikkawa Y, Kurogi R, Matsuo S, Mizoguchi M, Kayahara T, Yokosako S,

- Ueno R, Yamaguchi Y, Fushihara G, Ikeda T, Takeda R, Ogura T, Ooigawa H, Sasaki T, **Kurita H**: Correlation between vasospasm and microcirculatory disturbance in early and delayed phase following experimental subarachnoid hemorrhage. International Stroke Conference 2015 (15/2/11-13, Nashville, USA)
11. **Kikkawa Y**, Matsuo S, Kurogi R, **Mizoguchi M**, Kayahara T, Yokosako S, Ueno R, Yamaguchi Y, Fushihara G, Ikeda T, Takeda R, Ogura T, Ooigawa H, Sasaki T, **Kurita H**: Upregulation of relaxin after experimental subarachnoid hemorrhage. International Stroke Conference 2015 (15/2/11-13, Nashville, USA)
12. **吉川雄一郎**、竹田理々子、池田俊貴、伏原豪司、栢原智道、山口陽平、横佐古卓、上野龍、大井川秀聡、**栗田浩樹**: 当施設におけるくも膜下出血開頭術後患者の周術期管理と治療成績。(シンポジウム「周術期の循環管理」) 第31回スパズム・シンポジウム(STROKE 2015) (15/3/16-29 広島)
13. **吉川雄一郎**: 「教育講演」クモ膜下出血後の脳血管攣縮 そのメカニズムと当科における取り組み。埼玉西部脳循環センター地域医療連携懇話会 (15/3/18 日高)
14. 黒木亮太、佐山徹郎、**溝口昌弘**、**中溝玲**、森恩、橋口公章、**天野敏之**、**吉川雄一郎**、吉本幸司、飯原弘二: ラットくも膜下出血モデルにおける MMP9 関連 microRNA の発現解析。(シンポジウム「DCI の病態」) 第31回スパズム・シンポジウム(STROKE 2015) (15/3/16-29 広島)
15. **Kikkawa Y**, Takeda R, Ikeda T, Fushihara G, Yamaguchi Y, Ueno R, Yokosako S, Kayahara T, Take Y, Ooigawa H, **Kurita H**: Modern management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage and cerebral vasospasm. The 12th Korean and Japanese Friendship Conference on Surgery for Cerebral Stroke (KJFC 2014) (14/9/26-27, Osaka, Japan)
16. **吉川雄一郎**、大井川秀聡、栢原智道、横佐古卓、上野龍、山口陽平、伏原豪司、池田俊貴、竹田理々子、小倉文司、**栗田浩樹**: 「講演」くも膜下出血患者の周術期管理 当科におけるスパズム予防とその基礎的背景。第8回埼玉ブレインセミナー (14/11/7 深谷)

〔図書〕(計2件)

1. **Kikkawa Y**, Ooigawa H, Ikeda T, Takeda R, Nakajima H, Ogura T, **Kurita H**: Management and clinical outcomes of aneurysmal subarachnoid hemorrhage treated surgically; a 7-year survey,

in Sasaki T, Ohkuma H, Kanamaru K, Suzuki M (eds): Neurovascular Events after Subarachnoid Hemorrhage. Tokyo: NARUNIA Inc, 19-21, 2017

2. **Kikkawa Y**: Mechanisms of increased vascular contractility after subarachnoid hemorrhage, in Sasaki T, Ohkuma H, Kanamaru K, Suzuki M (eds): Neurovascular Events after Subarachnoid Hemorrhage. Tokyo: NARUNIA Inc, 15-17, 2017

〔産業財産権〕
出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等: なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川雄一郎 (KIKKAWA, Yuichiro)
埼玉医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 80423515

(2) 研究分担者

溝口昌弘 (MIZOGUCHI, Masahiro)
九州大学, 医学研究院, 共同研究員
研究者番号: 50380621

中溝玲 (NAKAMIZO, Akira)
九州大学, 医学研究院, 共同研究員
研究者番号: 80529800

天野敏之 (AMANO, Toshiyuki)
九州大学, 医学研究院, 共同研究員
研究者番号: 70448413

栗田浩樹 (KURITA, Hiroki)
埼玉医科大学, 医学部, 教授
研究者番号: 70262003