

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16562

研究課題名(和文) Neutrophil extracellular trapsの脳血管障害への影響

研究課題名(英文) Neutrophil extracellular traps attribute to cerebral vascular disease

研究代表者

高麗 雅章 (KORAI, Masaaki)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・徳島大学専門研究員

研究者番号：60794013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：くも膜下出血や脳梗塞などの脳卒中は、寝たきり原因の国内一位である。白血球はエラスターゼやミエロペルオキシダーゼなどの殺菌性蛋白分解酵素により細菌を死滅する。Peptidylarginine Deiminase (PAD4) により核内ヒストンがシトルリン化されたNeutrophil extracellular traps (NETs) は血栓形成や動脈硬化に關与する。本研究では脳動脈瘤破裂モデルの脳血管におけるNETsの役割を示し、PAD4 抑制あるいはdeoxyribonucleaseによる形成後のNETs 分解が脳動脈瘤破裂抑制に寄与することを明らかにし、治療標的としてのNETsの有用性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

くも膜下出血の原因となる脳動脈瘤破裂などの脳血管障害の成因には不明の点が多いが、重篤な予後を呈する場合もあり、本人のみならず社会的な損失も大きい。今回、脳動脈瘤破裂など重篤な脳血管障害とNETs発現との関連性を調べ、NETs形成を活性化するメカニズムやNETs制御による脳血管障害への影響を明らかにできれば、NETs発現を指標として発症予防だけでなく、治療標的としての創薬の可能性もあるため、高齢化社会での社会的意義は高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have demonstrated the relationships between the vascular inflammation and the ruptured intracranial aneurysms (IAs). Here, we examined the role of NETs in IAs rupture to test out hypothesis that the presence of neutrophil extracellular traps (NETs) may promote the rupture of IAs. Other study reported that granulocyte-specific knockout of peptidyl arginine deiminase 4 (PAD4) reduced the rate of aneurysm rupture. We found that pharmacological blockade of the NET formation by Cl-amidine (hydrochloride); an irreversible pan-PAD inhibitor reduced the rate of aneurysm rupture and decreased mRNA expression of pro-inflammatory cytokines. These findings suggest that NETs promote the rupture of IAs and that the inhibition of PAD4 or resolution of already-formed NETs by deoxyribonuclease may represent a potential therapeutic strategy for preventing aneurysmal rupture. We also confirmed the presence of NETs in the other cerebral vascular diseases.

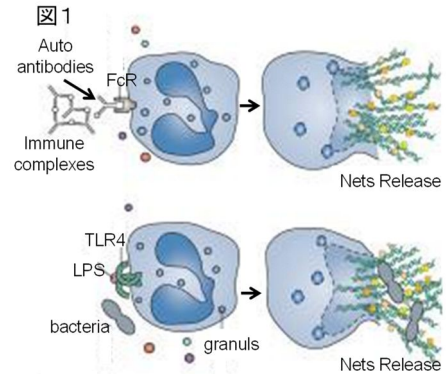
研究分野：脳血管障害

キーワード：NETs 脳血管障害 PAD4 炎症性変化 脳動脈瘤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

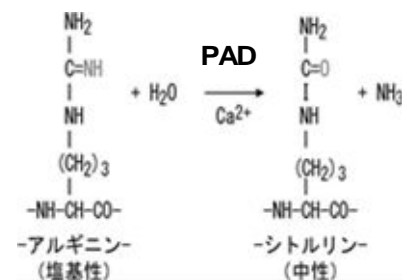
脳卒中は国内死因の第4位、寝たきり原因の第1位である。近年の画像解析の進展により、未破裂動脈瘤患者が増加している。未破裂脳動脈瘤は無症状だが、一旦破裂すると約2/3が死亡または重篤な後遺症を来す。近年、血管壁の炎症と関連して集積する白血球から核外に放出された Neutrophil extracellular traps (NETs) が多機能を有すると注目されている (Mariana J et al, J Immunol, 2012, 図1)。研究代表者も留学先のカリフォルニア大学サンフランシスコ校にて脳動脈瘤と NETs の関連性を見出している。NETs は好中球エラスターゼやミエロペルオキシダーゼなどの殺菌性蛋白分解酵素を含んでおり、網状構造物でトラップした細菌をヒストンと殺菌酵素により死滅させる。好中球死滅後もこの作用が持続するため自然免疫においても重要な役割を担うと考えられている。一方、細菌を認識した血小板が好中球に結合すると数分以内に NETs が放出され、血栓形成にも関与すると考えられている (Clark SR et al, Nat Med 2007)。NETs に含まれる酵素などから、血管壁崩壊などの血管障害への影響も推察されるが、脳血管障害との関連性やそのメカニズムについての報告はほとんどなく詳細は不明である。



2. 研究の目的

本研究では NETs に着目し、脳動脈瘤モデル動物を用いて脳動脈瘤破裂と NETs の関連性を明らかにし、NETs 形成を活性化するメカニズムを解明し、治療の標的としての有用性を評価することを目的として検討を行った。ペプチド中の塩基性アミノ酸であるアルギニンは中性アミノ酸であるシトルリンに酵素的に修飾 (シトルリン化/脱イミノ化) される。PAD4 は核内たんぱく質のシトルリン化酵素であり (図2) ヒストン (H3) をシトルリン化して転写を制御する。NETs はシトルリン化 H3 (CitH3) として検出されることから炎症性反応や脂質酸化の認められる動脈硬化とも関連していることが報告されている。そこで CitH3 の発現に着目して検討を進めることとした。臨床応用の可能性を調べるために、ヒト頸動脈剥離術 (CEA) から摘出したプラークや他の脳血管障害での組織での検討も行い、NETs の発現とその制御の意義を明らかにすることを旨とした。

図2



3. 研究の方法

脳動脈瘤などの脳血管障害では炎症性サイトカインの放出による血管障害が想定される。これまでに破裂血管壁では炎症性サイトカインや細胞外マトリックスメタロプロテアーゼの高い発現を報告している (宮本、JCBFM, 2017)。本研究ではこれらの血管壁における NETs 活性化の指標となる peptidyl arginine deiminase 4 (PAD4) の発現と炎症性サイトカインや細胞外マトリックスメタロプロテアーゼの発現を調べる。PAD4 は好中球において高い発現を認めるとされている。これまでの研究において確立された脳動脈瘤破裂モデルにおいて、NETs 活性化に関する PAD4 の発現と炎症性サイトカインや細胞外マトリックスメタロプロテアーゼ発現との関係を遺伝子および蛋白レベルにより解析する。さらに、臨床応用を目的としてヒト脳血管障害から摘出した組織標本での解析を行う。

4. 研究成果

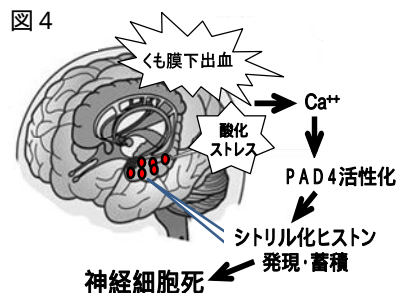
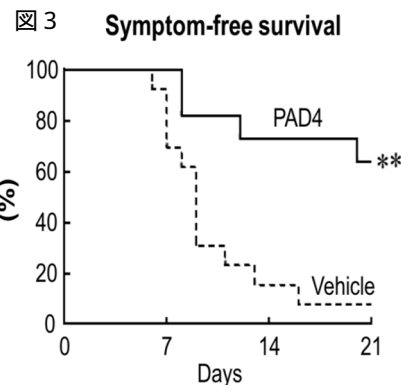
脳血管障害において、脳動脈瘤の発生頻度は低いが一旦破裂すると生存率は半数が死に至り、重篤な後遺症のため寝たきりが最も高い。しかし診断や破裂予防に対する治療の選択肢が限られており、新たな診断法や治療法の開発に期待が寄せられていることから、研究代表者は独自のモデルを開発し、破裂予防の選択肢として、薬物治療の開発に向けて継続的に取り組んでおり、海外のトップレベルの研究施設とも共同研究を行い、本分野では常に世界を牽引する体制で研究を進めている。本研究で着目した NETS に関して中枢神経系では PAD2 と PAD4 が発現しているが、特に PAD4 は核内に移行し、クロマチンの構成単位であるヒストンのシトルリン化に関与していることから、PAD4 に着目して検討を進めた。

(1) 研究代表者は国際共同研究としてマウス脳動脈破裂モデルでの検討を行い、まず PAD4 の阻害剤が破裂を有意に抑制する(図3)ことから PAD4 と脳動脈瘤破裂との関係を見出し、米国脳卒中学会で発表した。

(2) また、PAD4 の遺伝子欠損マウスを用いた脳動脈瘤破裂モデルにおいて、NETs の形成抑制が脳動脈瘤破裂を抑制することを新たに明らかにした(Hypertension 2021、in proof)。マウスモデルはエラスターゼを用いて脳動脈瘤破裂を誘導しているモデルであるため、NETs 単独あるいはエラスターゼの影響が懸念されるが、エラスターゼを用いない術式によって誘導したより生理的な条件下でのラット脳動脈瘤モデルおよびヒト脳動脈瘤組織での解析を行った他の研究施設からの報告においても NETs と脳動脈瘤破裂との関係が明らかにされた(Scientific report, 2021)。

(3) さらに、NETs 形成後に deoxyribonuclease による NETs の除去により破裂が抑制されることも明らかにしており、NETs を標的とした治療の可能性が示唆された。これらの成果は現在英文誌に受理され、proof が準備されている(Hypertension, 2021、in proof)。

(4) 一方、脳動脈破裂後の遅発性脳損傷について、未破裂脳動脈瘤の段階での脳損傷あるいは破裂後急性期における脳損傷が影響している可能性があるため(図4)、薬剤を用いた検討を行っている。治療中、治療後の評価を行い、その治療への応用の可能性と有効性のメカニズムの解析から有用性が期待できると考え、現在検討中である。さらに、NETs に関しては血中での解析が可能になっており、画像解析と合わせて、くも膜下出血発症予知や発症後の予後の改善の指標としての有用性について解析を進めている。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 4件／うちオープンアクセス 13件）

1. 著者名 Munji RN, Soung AL, Weiner GA, Sohet Fabien, Semple BD, Trivedi Alpa, Gimlin Kayleen, Kotoda Masakazu, Korai Masaaki, Aydin Sidar, Batugal Austin, Cabangcala AC, Schupp PG, Oldham MC, Hashimoto Tomoki, Noble-Haeusslein Linda J., Daneman Richard	4. 巻 22
2. 論文標題 Profiling the mouse brain endothelial transcriptome in health and disease models reveals a core blood?brain barrier dysfunction module	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1892 ~ 1902
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41593-019-0497-x	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 該当する

1. 著者名 Shikata Fumiaki, Shimada Kenji, Sato Hiroki, Ikedo Taichi, Kuwabara Atsushi, Furukawa Hajime, Korai Masaaki, Kotoda Masakazu, Yokosuka Kimihiko, Makino Hiroshi, Ziegler Emma A., Kudo Daisuke, Lawton Michael T., Hashimoto Tomoki	4. 巻 73
2. 論文標題 Potential Influences of Gut Microbiota on the Formation of Intracranial Aneurysm	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hypertension	6. 最初と最後の頁 491 ~ 496
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.11804	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 該当する

1. 著者名 Shimada Kenji, Yamaguchi Tadashi, Miyamoto Takeshi, Sogabe Shu, Korai Masaaki, Okazaki Toshiyuki, Kanematsu Yasuhisa, Satomi Junichiro, Nagahiro Shinji, Takagi Yasushi	4. 巻 134
2. 論文標題 Efficacy of intraarterial superselective indocyanine green videoangiography in cerebral arteriovenous malformation surgery in a hybrid operating room	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 1544 ~ 1552
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3171/2020.3.JNS20319	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 -

1. 著者名 Yamaguchi I, Kanematsu Y, Shimada K, Korai M, Miyamoto T, Shikata E, Yamaguchi T, Yamamoto N, Yamamoto Y, Kitazato KT, Okayama Y, Takagi Y	4. 巻 9
2. 論文標題 Active Cancer and Elevated D-Dimer Are Risk Factors for In-Hospital Ischemic Stroke	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cerebrovas Dis Extra	6. 最初と最後の頁 129 ~ 138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000504163	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 -

1. 著者名 Yamaguchi Tadashi, Miyamoto Takeshi, Kitazato Keiko T., Shikata Eiji, Yamaguchi Izumi, Korai Masaaki, Shimada Kenji, Yagi Kenji, Tada Yoshiteru, Matsuzaki Yoshihito, Kanematsu Yasuhisa, Takagi Yasushi	4. 巻 -
2. 論文標題 Time-dependent and site-dependent morphological changes in rupture-prone arteries: ovariectomized rat intracranial aneurysm model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 1~9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3171/2019.6.JNS19777	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 -

1. 著者名 Yamamoto Nobuaki, Yamamoto Yuki, Yamaguchi Izumi, Ishihara Manabu, Miyamoto Takeshi, Korai Masaaki, Shimada Kenji, Kanematsu Yasuhisa, Izumi Yuishin, Takagi Yasushi	4. 巻 70
2. 論文標題 Cone beam-computed tomography angiography by intravenous contrast injection is reliable to evaluate patients with large vessel occlusion	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 67~71
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jocn.2019.08.078	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 -

1. 著者名 OKAZAKI Toshiyuki, KANEMATSU Yasuhisa, SHIMADA Kenji, KORAI Masaaki, SATOMI Junichiro, UNO Masaaki, NAGAIRO Shinji, TAKAGI Yasushi	4. 巻 59
2. 論文標題 A Single-center Retrospective Study with 5- and 10-year Follow-up of Carotid Endarterectomy with Patch Graft	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurologia medico-chirurgica	6. 最初と最後の頁 231~237
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2176/nmc.oa.2018-0309	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 -

1. 著者名 Yamamoto Yuki, Yamamoto Nobuaki, Kanematsu Yasuhisa, Korai Masaaki, Shimada Kenji, Izumi Yuishin, Takagi Yasushi	4. 巻 28
2. 論文標題 The Claw Sign: An angiographic Predictor of Recanalization After Mechanical Thrombectomy for Cerebral Large Vessel Occlusion	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases	6. 最初と最後の頁 1555~1560
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2019.03.007	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 -

1. 著者名 Hioka Akemi, Tada Yoshiteru, Kitazato Keiko, Kanematsu Yasuhisa, Mizobuchi Yoshifumi, Mure Hideo, Shimada Kenji, Okazaki Toshiyuki, Korai Masaaki, Akazawa Naoki, Matsumoto Yuki, Harada Masafumi, Takagi Yasushi, Nagahiro Shinji	4. 巻 60
2. 論文標題 Activation of mirror neuron system during gait observation in sub-acute stroke patients and healthy persons	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 79 ~ 83
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jocn.2018.09.035	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 -

1. 著者名 Kamio Yoshinobu, Miyamoto Takeshi, Kimura Tetsuro, Mitsui Kazuha, Furukawa Hajime, Zhang Dingding, Yokosuka Kimihiko, Korai Masaaki, Kudo Daisuke, Lukas Ronald J., Lawton Michael T., Hashimoto Tomoki	4. 巻 49
2. 論文標題 Roles of Nicotine in the Development of Intracranial Aneurysm Rupture	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stroke	6. 最初と最後の頁 2445 ~ 2452
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/STROKEAHA.118.021706	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 該当する

1. 著者名 KANEMATSU Yasuhisa, SATOMI Junichiro, KORAI Masaaki, OKAZAKI Toshiyuki, YAMAGUCHI Izumi, TADA Yoshiteru, UNO Masaaki, NAGAHIRO Shinji, TAKAGI Yasushi	4. 巻 58
2. 論文標題 Flow Alteration Therapy for Ruptured Vertebral Artery Dissecting Aneurysms Involving the Posterior Inferior Cerebellar Artery	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurologia medico-chirurgica	6. 最初と最後の頁 341 ~ 349
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2176/nmc.oa.2018-0076	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 -

1. 著者名 Kotoda Masakazu, Furukawa Hajime, Miyamoto Takeshi, Korai Masaaki, Shikata Fumiaki, Kuwabara Atsushi, Xiong Xiaoxing, Rutledge Caleb, Giffard Rona G., Hashimoto Tomoki	4. 巻 49
2. 論文標題 Role of Myeloid Lineage Cell Autophagy in Ischemic Brain Injury	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stroke	6. 最初と最後の頁 1488 ~ 1495
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/STROKEAHA.117.018637	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 該当する

1. 著者名 Nagahiro Shinji, Tada Yoshiteru, Satomi Junichiro, Kinouchi Tomoya, Kuwayama Kazuyuki, Yagi Kenji, Nakajima Kohei, Matsushita Nobuhisa, Miyamoto Takeshi, Yamaguchi Tadashi, Shimada Kenji, Korai Masaaki, Mure Hideo, Okayama Yoshihiro, Abe Takashi, Harada Masafumi, Kitazato Keiko T., Kanematsu Yasuhisa	4. 巻 27
2. 論文標題 Treatment of Unruptured Cerebral Aneurysms with the Mineralocorticoid Receptor Blocker Eplerenone Pilot Study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases	6. 最初と最後の頁 2134 ~ 2140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2018.03.008	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 2件)

1. 発表者名 Yamaguchi T, KT.Kitazato, Eiji Shikata, Takeshi Miyamoto, Masaaki Korai, Kenji Shimada, Yoshiteru Tada, Yasuhisa Kanematsu, Yasushi Takagi
2. 発表標題 Downregulation of estrogen receptor alpha activates NLRP3 inflammasome in a rat model of intracranial aneurysms
3. 学会等名 International Stroke Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 KT.Kitazato, Eiji Shikata, Takeshi Miyamoto, Masaaki Korai, Kenji Shimada, Yoshiteru Tada, Yasuhisa Kanematsu, Yasushi Takagi
2. 発表標題 Pro-inflammatory response promoted by Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide enhances the rupture of experimental intracranial aneurysms.
3. 学会等名 Brain and Brain PET2019 (国際学会)
4. 発表年 2019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
---------	---------