

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09319

研究課題名（和文）くも膜下出血後早期脳損傷の軽減をめざして：エダラボンのドラッグリポジショニング

研究課題名（英文）A study to reduce early brain damage after subarachnoid hemorrhage: edaravone drug repositioning Drug Repositioning of Edaravone

研究代表者

針生 新也（Haryu, Shinya）

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：90866120

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）：ラットくも膜下出血モデルを用いて、エダラボンがその生存率向上をもたらすことを確認した。また、脳組織の解析から、活性酸素の産生減少ならびに細胞死の抑制が確認できた。さらなる解析では、細胞死を制御する生存シグナルとして機能するAktおよびGSK-3bのリン酸化の促進が生じて細胞死の抑制をもたらしていると考えられた。免疫組織染色による評価ではこのAkt/GSK-3b survival pathwayの活性はとくに神経細胞にて生じていることが判明した。これらの結果から、エダラボンがくも膜下出血後早期脳損傷を軽減する可能性が示唆され、今後の臨床応用に期待が持たれる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

くも膜下出血は日本人に多くみられ、致死率および要介護率がそれぞれ40%または30%の未だに転帰不良の疾患である。その理由として、発症直後から手術治療に至るまでの間にも脳圧亢進や酸化ストレスなどに起因する細胞障害性変化が始まっており、くも膜下出血後早期脳損傷として注目されている。本研究では脳保護薬であるエダラボンによるくも膜下出血後早期脳損傷の抑制効果をラットモデルにおいて照明した。エダラボンはフリーラジカルスカベンジャーとして、急性期の脳梗塞に対してすでに臨床現場で汎用されている薬剤であり、今後早期のさらなる研究拡大および臨床研究の展開を期待できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We confirmed that edaravone improves survival in a rat model of subarachnoid hemorrhage. Analysis of brain tissue showed that edaravone reduced the production of reactive oxygen species and inhibited cell death. Further analysis suggested that the inhibition of cell death resulted from enhanced phosphorylation of Akt and GSK-3b, which function as survival signals to control cell death. Immunohistochemical analysis revealed that the Akt/GSK-3b survival pathway activity occurs particularly in neurons. These results suggest that edaravone may reduce early brain damage after subarachnoid hemorrhage and hold promise for future clinical applications.

研究分野：脳卒中

キーワード：くも膜下出血 早期脳損傷 エダラボン ラット アポトーシス Akt GSK-3b ドラッグリポジショニング

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

くも膜下出血の3大合併症は「再破裂」「脳血管攣縮」「正常圧水頭症」とされ、とくに急性期治療としての前2者に対しては日々新しい治療法の研究開発が行われている。しかし、近年の臨床試験や症例解析の結果では、有意な臨床転帰の改善が得られているとは言い難い。すなわち、再破裂や脳血管攣縮または遅発性脳虚血による脳梗塞を防ぎ得ても転帰不良に至る症例が多数存在する。こうした中、最近ではくも膜下出血後早期脳損傷 (early brain injury: EBI) という概念が注目されている。これは発症直後から脳血管攣縮期に至るまでの72時間において、出血が招いた脳圧亢進、脳灌流圧低下、細胞内外のイオン濃度や神経伝達物質濃度の変化、各種ケミカルメディエーターによる炎症の惹起などに起因する細胞障害性変化が生じており、従来の止血手術や脳血管攣縮に対する治療とは別個に、解決すべき課題として立ちはだかっている。EBIに対する研究はまだ発展途上にあり、その病態全容の解明には至っておらず、これを標的とした超急性期の治療薬は存在しない。EBIの病態解明および治療法の開発は、くも膜下出血治療に対する次なるブレイクスルーとして、大いに期待される。我々のグループは活性酸素による酸化ストレスがEBIの一因として神経細胞(ニューロン)の最終的なアポトーシスを導くことを早期から研究報告している(Stroke 2006; J Cereb Blood Flow Metab 2007)。そこで、くも膜下出血発症直後の段階から酸化ストレスの抑制軽減を図ることで、アポトーシスの誘導抑制ひいてはくも膜下出血の転帰改善が得られるかどうかを明らかにすべく研究を行うことにした。なお、活性酸素から脳を保護する薬剤は多数知られているが、既に脳梗塞に対して臨床応用されているエダラボンを今回の評価対象として設定した。

2. 研究の目的

本研究の目的はくも膜下出血に対するエダラボンの急性期投与が、早期脳損傷を抑制して転帰の改善につながるかどうかを明らかにすることである。これまでのくも膜下出血に対する治療薬は主に脳血管攣縮の予防と改善を標的としており、血管拡張作用や抗血小板作用をもつ薬剤の開発に力が注がれてきた。具体的にはオザグレルナトリウムや塩酸ファスジルがそれにあたるが、本邦では1995年以降は保険収載に至った新規治療薬は存在せず、研究は停滞している。また、現存する薬剤はいずれも出血を助長する恐れがあるため止血術前には投与禁忌とされており、くも膜下出血の超急性期に直ちに投与できるものではない。EBIを治療対象として超急性期のうちに介入できる治療法の開発はこれまでにない新規の治療法となる。前述の通り、我々のグループは活性酸素による酸化ストレスがEBIの一因となっていること、活性酸素を分解する酵素であるsuperoxide dismutaseの誘導によってEBIからのアポトーシスを抑制できることを研究報告してきた(Stroke 2006; J Cereb Blood Flow Metab 2007)。こうした経緯もあって、今回我々はフリーラジカルスカベンジャーとして酸化ストレスによる脳へのダメージを軽減するエダラボンに着目した。抗酸化作用をもつ物質は他にも多数存在するが、エダラボンは脳梗塞急性期に対して既に臨床使用されている薬剤であり、EBIに対しての効果が示されれば、ドラッグ・リポジショニングによって開発期間の短縮化や研究開発費の削減のもとに新規効能追加を目指せるものと考えられる。

3. 研究の方法

次のような計画を立てて研究を行った。本研究ではラットくも膜下出血モデルを使用した。過去に報告され確立されている方法として、(1)露出した外頸動脈よりナイロン糸を挿入して頭蓋内内頸動脈を穿通して出血を生じさせるendovascular perforationによりモデルを作成した。また、laser speckle flowmetryを用いて出血前後の脳血流量の測定を行った。(2)つぎに、エダラボンを治療薬として生存比較試験を行った。エダラボンは濃度を変えて3群とし、コントロール群には生理食塩水をそれぞれ静脈内に投与した。出血から24時間後の生存率を比較して、エダラボンの効果の有無と至適投与濃度の決定を行った。(3)つづいて、脳組織を用いてそれぞれの群におけるアポトーシスおよび活性酸素反応の比較を行った。アポトーシスで生じる断片化DNAについて組織化学的な定量および組織切片の染色によって評価した。同様に、活性酸素の生成物であるヒドロエチジウムの反応についても評価した。(4)さらに、我々のグループが研究を続けてきたAkt/GSK3b survival pathwayの関与について、Western blottingによる解析を行った。また、それらの反応がニューロン、アストログリア、ミクログリアのいずれの細胞に生じているのかを免疫組織化学染色によって確認した。

4. 研究成果

(1) ナイロン糸による内頸動脈穿通により、びまん性のくも膜下出血が生じることを確認した。laser speckle flowmetryによる計測では、出血直後に両側大脳半球の脳血流量がほぼゼロに低下して徐々に回復していく様子を捉えられた。くも膜下出血は発症時に一過性の全脳虚血を引き起こしていることが示唆された。(2) 4群それぞれ6~10匹のラットを用いた。対照群と比較して、エダラボン 1mg/kg 投与群で24時間生存率の向上がみられた。対照群、エダラボン

0.3mg/kg 群、3mg/kg 群では死亡率 40～43%であったが、1mg/kg 群では 17%と有意差をもって低値であった。3mg/kg 群で死亡率低下が得られなかった理由は不明ながら、1mg/kg が視的治療量と考えられた。(3)くも膜下出血から 24 時間後の脳組織において、エダラポン 1mg/kg または 3mg/kg を投与した群では、断片化 DNA が対照群や 0.1mg/kg と比較して有意に少なく、アポトーシスが抑制されている結果であった。酸化型ヒドロエチジン反応の解析でも、同様にエダラポン高用量の 2 群がその他の群と比べて反応が少なく、活性酸素の産生が抑制されていた。(4)エダラポン 1mg/kg を投与したラットくも膜下出血モデルの脳組織において、リン酸化 Akt の発現が上昇していた。Akt/GSK3b survival pathway ではリン酸化 Akt が GSK3b をリン酸化して不活化することでアポトーシスが抑制されるため、同様にリン酸化 GSK3b の発現を解析したところ、エダラポン投与群で上昇していた。免疫染色でこれらの反応が脳組織内のどの部位で生じているのかを調べたところ、主に神経細胞で生じていることが判明した。

予定していた 3 年の研究機関で上記結果が得られ、フリーラジカルスカベンジャーとして脳梗塞に対してすでに臨床現場で広く使用されているエダラポンが輪唱し要すとして酸化ストレスによる脳へのダメージを軽減するエダラポンがくも膜下出血における早期脳損傷を抑制することが動物実験で示された。転帰の改善につながるかどうか今後の追加実験を模索しつつ、学会や論文にて発表公表する方針である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	新妻 邦泰 (Niizuma Kuniyass) (10643330)	東北大学・医工学研究科・教授 (11301)	
研究分担者	遠藤 英徳 (Endo Hidenori) (40723458)	東北大学・医学系研究科・客員教授 (11301)	
研究分担者	伊藤 明 (Ito Akira) (90867863)	東北大学・医学系研究科・非常勤講師 (11301)	

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