

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：13701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06248

研究課題名(和文)クモ膜下出血後の白質傷害の機序の解明と新規治療法の探索

研究課題名(英文)Exploration for the detailed mechanism of subarachnoid hemorrhage-induced white matter injury.

研究代表者

江頭 裕介 (EGASHIRA, Yusuke)

岐阜大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50547677

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではクモ膜下出血(SAH)において、特に早期神経傷害が起こりやすいと考えられる白質組織に注目した。白質神経傷害の機序解明により新規治療の可能性を見出すことを目的とした。SAH急性期には微小血管の破綻が起こることで白質に選択性の高い浮腫が生じており、matrix metalloproteinase (MMP)-9, Lipocalin (LCN)-2等の因子が関与していることが明らかとなった。白質浮腫は亜急性期以降の白質神経線維脱落と相関し、またMMP-9やLCN-2の抑制によりSAH急性期の白質浮腫と続発する神経傷害を制御できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The detailed mechanism of white matter (WM) injury after subarachnoid hemorrhage (SAH) remains unclear. We hypothesized that blood-brain barrier (BBB) disruption occurs in WM after SAH and it leads to consequent injury. SAH was induced by endovascular perforation in male mice. In SAH mice, BBB leakage along the WM was observed at 24 h after SAH. In microvessels, tight junction detachment and swollen astrocyte endfeet were demonstrated by electron microscopy. Matrix metalloproteinase (MMP)-9 activity and lipocalin (LCN)-2 expression were increased in the WM at the acute stage of SAH. At 8 days after SAH, decreased myelin integrity and an increased density of damaged axon were observed in SAH mice. MMP-9 or LCN-2 deletion effectively suppressed this SAH-induced WM injury. In conclusion, SAH causes BBB disruption and consequent injury in the WM, and MMP-9 and LCN-2 play an important role for those pathologies. These factors could be a novel therapeutic target for SAH-induced WM injury.

研究分野：脳神経外科学分野

キーワード：白質傷害 クモ膜下出血 血液脳関門

1. 研究開始当初の背景

虚血性脳卒中と比較し、出血性脳卒中（脳出血およびクモ膜下出血：subarachnoid hemorrhage: SAH）の治療の進歩はやや停滞している感がある。特に脳神経外科における代表疾患である SAH においては、死亡率が極めて高いにも関わらず、原因となった破裂脳動脈瘤の再出血予防措置以外には臨床的に有効な治療法は皆無といえる。SAH 後の早期脳損傷と生命、機能予後には密接な関係があることは明らかであるが、基礎研究の領域においても、虚血性脳卒中と比較し早期脳損傷の発生、進展機序の解明は遅れている。虚血性脳卒中においては、近年ヒト大脳組織の約 50% を占める白質に対する傷害機序が特に注目を集めており、出血性脳卒中においても白質傷害に対する基礎研究が重要かつ優先すべき課題であるということは研究者間における共通の認識となっている。しかしながら、SAH をはじめ出血性脳卒中での白質における早期脳損傷に対する研究は国際的にもほとんど進んでいなかった。

2. 研究の目的

我々は先行研究において、マウス血管内穿孔法による SAH モデルを用い、SAH 後早期（発症 24 時間後）に極めて高頻度で白質傷害が認められることを報告した (Egashira Y, et al. *Stroke* 45: 2014)。

本モデルの利点として、ヒト SAH の病態と最も近いと考えられる点、および極めて高頻度に白質傷害の発生を認める点が挙げられる。

本研究ではこのモデルを用い、白質傷害の発生、進展機序の解明を進め、将来臨床応用可能な治療法の開発に向けての展望や課題を見出すことを目的とした。

3. 研究の方法

1) SAH 後急性白質傷害に血液脳関門破綻が及ぼす影響の検討：マウス SAH モデルを用い、SAH 後急性期における白質微小血管の構造を電子顕微鏡にて観察する。また免疫染色を用いて血液脳関門破綻の程度について評価を行う。

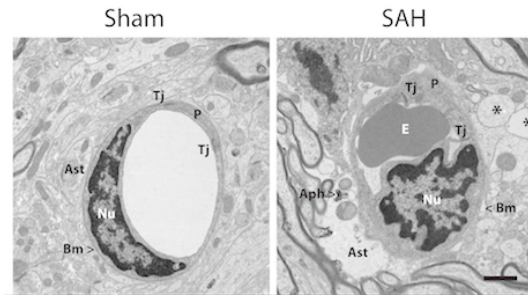
2) SAH 後急性白質傷害、血液脳関門破綻に関与する因子の検討：脳卒中において血液脳関門破綻を来す主要因子と考えられている matrix metalloproteinase (MMP)-9、および lipocalin (LCN)-2 の SAH 後急性期の白質における活性、発現について検討する。

3) SAH 後急性白質浮腫と慢性期の白質神経線維脱落との関連の検討：SAH 後急性期白質浮腫が慢性期の白質神経線維脱落に与える影響を免疫染色にて検討し、また MMP-9 および LCN-2 ノックアウトマウスを用い、慢性期白質傷害軽減の可能性を検討する。

4. 研究成果

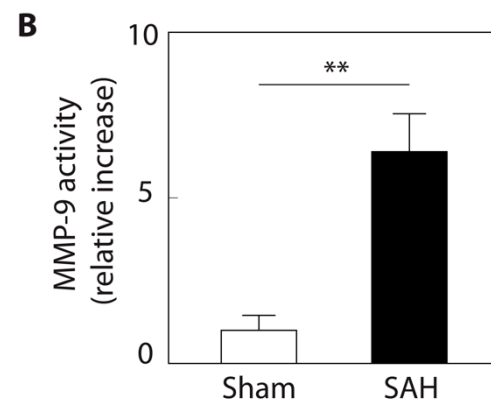
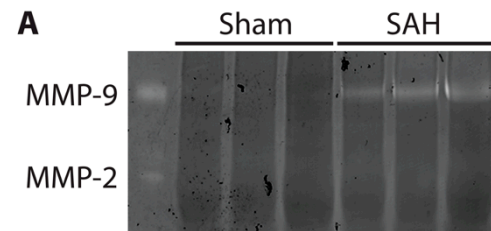
1) SAH 後急性期の脳白質において、電子顕微

鏡にて微小血管構造の破綻が直接的に確認され、免疫染色では白質神経線維の走行と一致して血液脳関門破綻の証明となるアルブミンの血管外漏出が確認された。



図：電子顕微鏡での SAH 後の白質微小血管構造破綻の証明。SAH 例（写真右）において、アストロサイト (Ast) のエンドフットの腫脹、細胞外浮腫 (\*), タイトジャンクション (Tj) の脱落などの所見を認める。

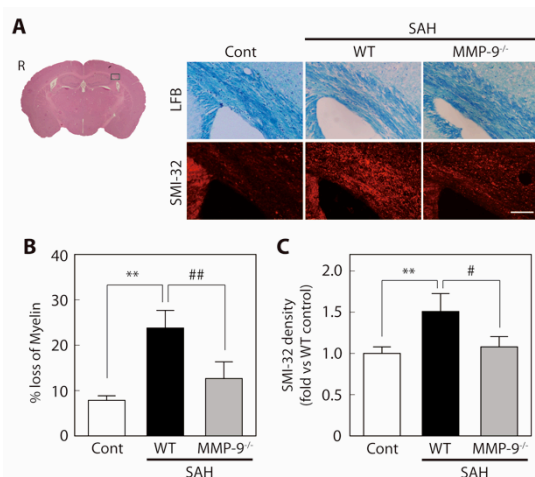
2) SAH 後急性期の白質において、微小血管構造の破綻に強く関与することが知られている MMP-9 の活性化および LCN-2 の発現上昇が見られることが確認された。また、MMP-9 および LCN-2 はアストロサイト、オリゴデンドロサイト前駆細胞で発現しており、傷害により活性化されたアストロサイト、オリゴデンドロサイトがこれらの因子を発現、活性化することで白質浮腫をさらに進展させる可能性が示唆された。



A: 白質神経組織における MMP-9 活性（ゼラチンゼイモグラフィ）。B: MMP-9 活性の定量値。SAH 群で有意な MMP-9 活性の上昇が見られる。

3) SAH8 日後では、wild-type マウスでは SAH 群において sham 群と比較し白質における髄鞘密度の低下と変性軸索の増加が認められた。一方、MMP-9 ノックアウトマウスにおい

では、髄鞘密度の低下は有意に抑制されていた。また、LCN-2 ノックアウトマウスにおいても同様の傾向が得られた。これらの知見は、SAH 後急性期の白質における血液脳関門の破綻がその後の白質神経線維の脱落につながり、かつ MMP-9 や LCN-2 といった血液脳関門破綻を促進する因子を抑制することで白質神経傷害の進展が抑制できる可能性を示唆している。



A: SAH8 日後におけるルクソールファストブルー (LFB) 染色でのミエリン密度および SMI-32 染色での損傷軸索の評価。B: wild-type (WT) マウスではミエリン喪失は有意に多く、C: 損傷軸索も有意に多く見られる。一方、MMP-9 ノックアウト (-/-) マウスではこれらの白質傷害が有意に抑制されている。

## 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 4 件)

- ① Sawada S, Ono Y, Egashira Y, Takagi T, Tsuruma K, Shimazawa M, Iwama T, Hara H: In models of intracerebral hemorrhage, rivaroxaban is superior to warfarin to limit blood brain barrier disruption and hematoma expansion. *Curr Neurovasc Res*, in press 査読あり
- ② Egashira Y, Hua Y, Keep RF, Iwama T, Xi G: Lipocalin 2 and blood-brain barrier disruption in white matter after experimental subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurochir Suppl* 121: 131-134, 2016 査読あり doi: 10.1007/978-3-319-18497-5\_23.
- ③ Egashira Y, Zhao H, Hua Y, Keep RF, Xi G: White matter injury after subarachnoid hemorrhage: Role of blood-brain barrier disruption and matrix metalloproteinase-9. *Stroke* 46: 2909-2915, 2015 査読あり doi: 10.1161/STROKEAHA.115.010351.

- ④ Egashira Y, Xi G, Chaudhary N, Hua Y, Pandey AS: Acute brain injury after subarachnoid hemorrhage. *World Neurosurg* 84: 22-25, 2015 査読あり doi: 10.1016/j.wneu.2015.05.004

[学会発表] (計 7 件)

- ① 澤田重信, 小野陽子, 江頭裕介, 杉山智紀, 松川 悠, 今井貴彦, 山内圭太, 鶴間一寛, 嶋澤雅光, 岩間 亨, 原 英彰: マウス脳出血に対するリバーロキサバンの保護作用. 第 59 回日本脳循環代謝学会学術集会. あわぎんホール(徳島県・徳島市), 2016. 11. 11
- ② Hara H, Egashira Y (Invited Speech): Neuroprotective effects of the conditioned medium of murine and human adipose-derived stem cells on experimental stroke models. 9th Pan Pacific Symposium on Stem Cells and Cancer Research. Windsor Hotel (Taiwan・Taichung), 2016. 5. 14
- ③ 江頭裕介, Ya Hua, Richard F. Keep, Guohua Xi, 岩間 亨: クモ膜下出血後の白質神経障害における matrix metalloproteinase-9 の関与. 第 45 回日本脳卒中の外科学会学術集会. ロイトン札幌 さっぽろ芸術文化の館 札幌市教育文化会館 (北海道・札幌市), 2016. 4. 14
- ④ Egashira Y, Hua Y, Keep RF, Iwama T, Xi G: Matrix metalloproteinase-9 deletion attenuates blood-brain barrier disruption and consequent injury in white matter after subarachnoid hemorrhage. AHA Scientific Sessions 2015. Orange County Convention Center (USA Florida・Orlando), 2015. 11. 9
- ⑤ 江頭裕介, Ya Hua, Richard F. Keep, Guohua Xi, 岩間 亨: クモ膜下出血後の白質神経傷害における matrix metalloproteinase-9 の関与. 第 27 回日本脳循環代謝学会総会. 富山国際会議場 (富山県・富山市), 2015. 10. 31
- ⑥ 江頭裕介, Hua Y, Keep RF, Xi G, 岩間 亨: マウス血管内穿孔モデルを用いたくも膜下出血後の白質傷害に対する検討. 日本脳神経外科学会第 74 回学術総会. ロイトン札幌 さっぽろ芸術文化の館 札幌市教育文化会館 (北海道・札幌市) 札幌, 2015. 10. 14-16
- ⑦ 江頭裕介, Ya H, Keep RF, Xi G, 岩間 亨: マウス血管内穿孔モデルを用いたくも膜下出血後の白質障害に対する検討. 第 40 回日本脳卒中学会総会. リーガロイヤルホテル広島 メルパルク広島 NTT クレドホール 広島グリーンアリーナ (広島県・広島市), 2015. 3. 27

[図書] (計 0 件)

〔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  
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

(1) 研究代表者

江頭 裕介 (EGASHIRA, Yusuke)  
岐阜大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：50547677

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )