

令和 2 年 7 月 5 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10716

研究課題名(和文) くも膜下出血後の早期脳障害における脳細動脈の機能障害の解明と改善

研究課題名(英文) Improvement of vasoactive dysfunction on rat cerebral penetrating arterioles in early brain injury after subarachnoid hemorrhage.

研究代表者

村田 貴弘 (Murata, Takahiro)

信州大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：80533322

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(SAH)の早期脳障害(EBI)では脳循環を調節する脳細動脈で機能障害が起きている。我々はその血管内皮のATP依存性カリウム(KATP)チャンネルの機能障害を調査した。ラット脳細動脈を使用し、SAH後のEBIモデルを作成し、SAH群より摘出した細動脈に、KATPチャンネル作動薬を投与すると血管拡張を認めたが、シャム手術群・生理食塩水群と比較して有意に抑制されていた。この血管拡張の抑制は活性酸素捕捉薬を投与すると一部改善を認めた。SAHのEBIにおいて脳細動脈のKATPチャンネルの機能障害が起きていると考えられ、その原因として活性酸素が一因と推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的は、くも膜下出血(SAH)後の早期脳障害(EBI)による脳細動脈の血管調節機能の低下、とくにATP依存性カリウムチャンネルの機能低下を調査し、その機能が活性酸素捕捉薬で回復するか解明し、SAH後のEBIに対する有効な治療方法を開発することにある。結果、SAHのEBIにおいて脳細動脈のATP依存性カリウムチャンネルの機能障害が起きていると考えられ、その原因として活性酸素が一因と推測された。これらの結果は、特にSAH後のEBIの治療における活性酸素捕捉薬の臨床使用において基礎的な背景を補うと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Early brain injury (EBI) after rupture of rupture inducing subarachnoid hemorrhage (SAH) is characterized by a severe reduction in cerebral blood flow suggesting alterations on the cerebral small vessels. In this early vascular injury on small vessels after SAH, vasoactive dysfunction via potassium channels is unclear. We investigated whether SAH induced immediate ATP-sensitive potassium (KATP) channels dysfunction in rat experimental SAH model, and free radical scavenger restored KATP channels dysfunction. To investigate the KATP channels function, the activator was applied with or without free radical scavenger. The vasodilatory responses to the activator were attenuated in SAH rats but not saline injection and sham surgery rats. Free radical scavenger-treated arteriolar dilatory response to the activator was partially restored compared with non-treated arteriolar response. KATP channels may inactivate immediately after SAH, and the dysfunction may be induced by free radical.

研究分野：脳神経外科

キーワード：脳細動脈の機能障害 くも膜下出血 早期脳障害

様式 C - 19, F - 19 - 1, Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脳動脈瘤破裂によるくも膜下出血 (SAH; subarachnoid hemorrhage) では発症数日後から 2 週間頃にかけて遅発性虚血性神経脱落症状あるいは遅発性脳虚血が生じることがあり、総称して遅発性 (虚血性) 脳障害 (delayed brain injury: DBI) と呼ばれる。DBI の原因は以前より脳血管攣縮と考えられてきた。脳血管攣縮は、SAH 発症後 4 日目頃から 14 日目頃にかけて遅発性に生じる脳動脈の可逆的狭窄で、重篤な神経障害や死をもたらす場合があり、急性期を脱した SAH 患者の機能予後および生命予後を決定する重要な合併症である (1)。DBI は、SAH 発症後一定の時期を経て遅発性に生じるため、予防的治療、早期診断、発症後の迅速な治療などの対応が可能な病態であり、現在までに脳血管攣縮に対してはいくつかの薬剤や治療法が臨床で用いられ一定の効果が得られている。しかしながら未だ DBI 発症の完全予防には至っておらず、最近の前向き研究でも CT 上の脳梗塞発生率は依然として 20% 前後と報告されており (2,3)、新たな予防・治療法の開発が重要である。しかし近年、エンドセリン受容体拮抗薬クラゾセentan のように脳血管撮影上の攣縮を改善するが予後を改善しない薬剤や、逆にカルシウムチャンネル阻害薬ニモジピンのように脳血管撮影上の攣縮は改善しないが予後を改善する薬剤などが明らかとなり、DBI において脳血管攣縮以外の要因が注目されている。現在、DBI の発生には脳血管攣縮のほか、早期脳障害 (early brain injury: EBI) や大脳皮質拡張性抑制などが複合的に関与していると考えられている。

EBI は SAH 発症数分以内から数日間に生じる頭蓋内圧亢進、脳循環自動調節障害、早期血管攣縮、一過性全脳虚血などが誘因となり、2 次的に生じる脳内微小循環障害、血液脳関門障害などによる脳損傷の総称で、広範な神経細胞死の原因となる。特に脳循環を調節する脳細動脈において機能障害 (血管内皮の機能低下、基底膜の損傷などで血管収縮が起きていると推測される) が起き、脳内微小循環障害に関与していることが推測されている (4)。EBI における脳細動脈の機能障害は発症早期の神経損傷に大きく関与し、DBI にも関係していると考えられている。つまり EBI における脳細動脈の機能障害の解明は、SAH の病態解明、治療法開発において非常に重要である。現在までに EBI における脳細動脈の機能障害として、血管内皮の機能低下 (一酸化窒素発生障害) などが報告されているが、イオンチャンネルの機能障害は起きているのかどうか、など不明な点が多数ある。

### 2. 研究の目的

我々は以前より脳細動脈に注目し、その血流制御機構について報告しており、最近では、マグネシウムに注目し、マグネシウムによる脳細動脈の拡張機序を明らかにし、SAH 後の DBI に対する治療の可能性について報告した (5,6)。今回我々は、SAH 後の EBI による脳細動脈の血管調節機能の低下、とくにカリウムチャンネルの機能低下を調査し、その機能が活性酸素捕捉薬で回復するかどうかを研究目的とした。

### 3. 研究の方法

ラット大槽内に自己血を注入してラット SAH モデルの作成を行った。Solomon ら (7) が改良した方法を用いた。SD ラット (雄, 12-20 週齢) をペントバルビタール、メドミジン、ミダゾラムの腹腔内投与で麻酔後、鼠径部の皮膚切開を行い大腿動脈を露出した。次に前頭から後頭を正中切開し項頸筋を骨より剥離し、頭頂骨、後頭骨及び環椎を露出、atlando-occipital membrane を確認し、parieto-occipital suture の正中をドリルで穿頭し、硬膜を露出した。硬膜切開後に後頭骨に沿って PE-50 カテーテルを大槽まで挿入し、カテーテルをアロンアルファで骨に固定、脳脊髄液の漏出を防止し、PE-50 に圧センサー (FTH-1200B-0018, Transonic Scisense, Inc, USA) を入れ、大槽に先端が達したら、固定し、トレンドで圧測定を行った。大腿動脈より自己血を 0.3ml 採取し、大槽を穿刺し注入した。頭蓋内圧センサーからの計測値を確認し、頭蓋内圧の急激な上昇をもって、十分な SAH が起きていると判断した。穿刺部はアロンアルファで閉塞し脳脊髄液の漏出を防止した。1 時間後に断頭し脳を摘出した。同様に大槽内に生理食塩水を注入する生理食塩水群、同じ手術手技を行うが大槽内に注入しないシャム手術群も作製し、1 時間後に断頭し脳を摘出した。

脳細動脈の摘出には Dacey と Durling が開発した方法を用いた (8)。簡潔にはペントバルビタールの腹腔内投与にて十分な麻酔後に、断頭し摘出した脳から中大脳動脈を含む約 5 mm x 8 mm x 5 mm の脳スライスを顕微鏡下で作成した。軟膜とくも膜を利用して脳内を穿通している脳細動脈を摘出した。脳細動脈の片端を臓器槽に装着された微小ガラスピペットを用いてカニューレーションを行い、もう一方の片端は微小ガラスピペットに縫合し閉塞させた。カニューレーションされた脳細動脈の両端を臓器槽内で固定して顕微鏡下に観察し、脳細動脈内に生理的内圧 (60mmHg) を負荷した。臓器槽は脳脊髄液の pH である 7.3、温度は 37 °C に保たれた生理学的溶液を持続的に灌流した。脳細動脈の内径を顕微鏡に接続した CCD カメラを通じて画像として取り込み、血管内径測定装置を用いて測定し記録した。

EBI による脳細動脈の機能障害のによる血管拡張機序の解明のため、SAH 群、生理食塩水群、シャム手術群のそれぞれにおいて、血管径・血管緊張 (tone) 径・薬理的な拡張反応を測定し、血管機能障害 (コントロールの血管緊張 (tone)) について検討した。

SAH 群、生理食塩水群、シャム手術群のそれぞれにおいて ATP 感受性カリウムチャンネル作動薬 pinacidil を臓器槽内に投与し、脳細動脈の血管拡張を計測し、EBI による脳細動脈機能低下を

調査した。

次にシャム手術群の脳細動脈において、活性酸素捕捉薬である edaravone を投与し血管反応を測定、その影響を調査した。更に SAH 群の脳細動脈に edaravone を投与し、ATP 感受性カリウムチャンネル作動薬 pinacidil の血管拡張性低下が回復するか、調査し検討した。

#### 4. 研究成果

脳細動脈の個体数は 32 で、SAH 群、生理食塩水群、シャム手術群の 3 群間の頭蓋内圧を比較したところ、それらの基準値 ( $6.0 \pm 0.2 \text{ mmHg}$ ) において有意差は認めなかった。SAH 群では大槽内に自己血を注入した直後に、有意で著明な頭蓋内圧の上昇 (平均約  $90 \text{ mmHg}$ ) を確認した。生理食塩水群では大槽内に生理食塩水を注入した直後に、有意な頭蓋内圧の上昇 (平均約  $22 \text{ mmHg}$ ) を確認した (Fig.1)。SAH 群、生理食塩水群、シャム手術群の 3 群から摘出した脳細動脈の最大血管径に有意差は認めず、それぞれ  $89.4 \pm 2.8 \mu\text{m}$ ,  $86.4 \pm 2.5 \mu\text{m}$ ,  $89.4 \pm 4.1 \mu\text{m}$  であった。摘出した脳細動脈の生理的内圧負荷後の血管緊張時の血管径と最大血管径からの相対的变化率は、SAH 群は  $57.4 \pm 2.7 \mu\text{m}$  で  $-36.0 \pm 1.2\%$ 、生理食塩水群は  $59.9 \pm 2.0 \mu\text{m}$  で  $-30.8 \pm 0.6\%$ 、シャム手術群は  $65.3 \pm 3.3 \mu\text{m}$  で  $-27.0 \pm 1.1\%$  であった。3 群間でこれらを比較したところ、SAH 群においてシャム手術群より有意に血管緊張の亢進を認め、生理食塩水群ではシャム手術群より血管緊張亢進の傾向を認めた。シャム手術群より摘出した脳細動脈に ATP 感受性カリウムチャンネル作動薬 pinacidil を投与すると、濃度依存的に血管拡張を認めた (Fig.2)。

Fig.1

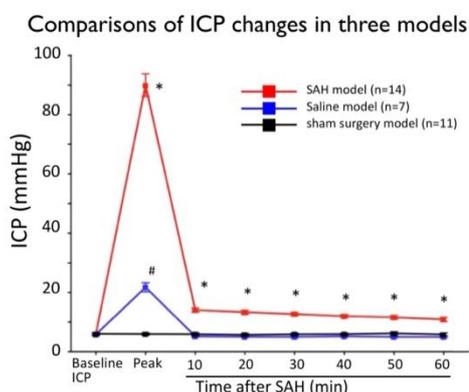


Figure 1.

Line graph showing comparisons of ICP changes in rat SAH model, saline injection model, and sham surgery model. \* $P < 0.05$  vs. saline injection and sham surgery model. # $P < 0.05$  vs sham surgery model.

Fig.2

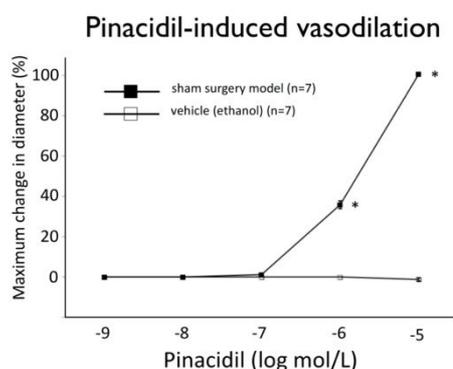


Figure 2.

Vasodilatory responses to increasing concentration of the ATP-dependent potassium channels activator, Pinacidil, in cerebral penetrating arterioles from male rats. \* $P < 0.05$  vs. vehicle.

シャム手術群より摘出した脳細動脈に活性酸素捕捉薬 edaravone を投与し血管反応を測定すると、溶媒である DMSO 単独の血管反応と溶媒に溶かした edaravone の血管反応は、各濃度において有意差は認めなかった (Fig.3)。生理食塩水群より摘出した脳細動脈に pinacidil を投与すると、濃度依存的に血管拡張を認め、シャム手術群での血管拡張と有意差は認めなかった。SAH 群より摘出した脳細動脈に、pinacidil を投与すると血管拡張を認めたが、シャム手術群・生理食塩水群と比較して有意に抑制されていた (Fig.4)。SAH 群より摘出した脳細動脈に、それぞれ  $1 \mu\text{mol/L}$ ,  $10 \mu\text{mol/L}$ ,  $100 \mu\text{mol/L}$  の edaravone 含有の生理学的溶液を持続的に 1 時間灌流した後、pinacidil を投与すると、 $100 \mu\text{mol/L}$  投与群で抑制されていた血管拡張が有意に改善していたが、シャム手術群及び生理食塩水群の血管拡張までの改善は認めなかった (Fig.5)。

Fig.3

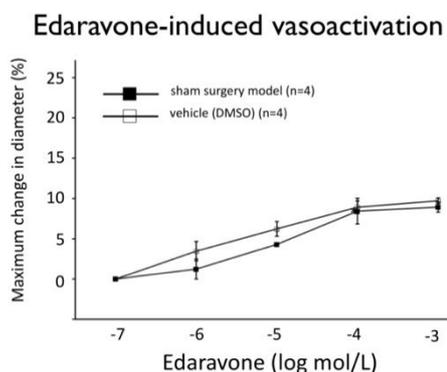


Figure 3. Vasodilatory responses to increasing concentration of Edaravone with vehicle effect. No significant.

Fig.4

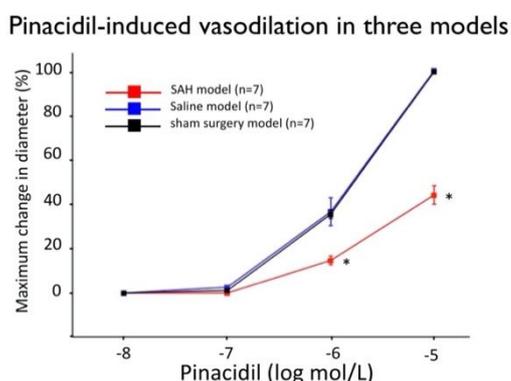


Figure 4. Vasodilatory responses to increasing concentration of Pinacidil in rat SAH model, saline injection model, and sham surgery model. \* $P < 0.05$  vs. saline injection and sham surgery model.

Fig.5

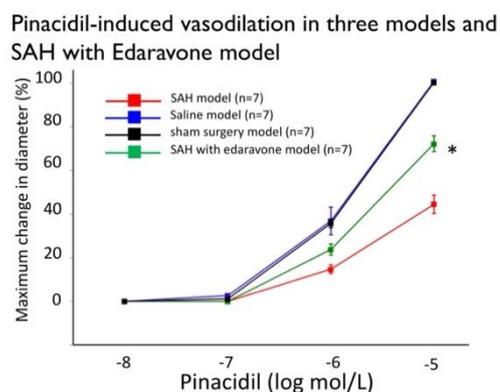


Figure 5. In SAH model, the free radical scavenger Edaravone-treated arteriolar dilatory response to ATP-sensitive potassium channels activator was partially restored compared with non-treated arteriolar response. \* $P < 0.05$  vs. SAH model.

以上の結果から、まず SAH 群の EBI において脳細動脈の ATP 感受性カリウムチャンネル機能障害が行っていることが確認された。SAH 群で認められたこの機能障害は活性酸素捕捉薬で一部改善が認められ、SAH の EBI において脳細動脈の機能障害に活性酸素の関与が推測された。ラット脳細動脈における ATP 感受性カリウムチャンネルの役割としては、堀内ら (9) が脳細動脈の内皮ではなく平滑筋において血管反応に関与していると報告しており、我々の作成したラット SAH 群の EBI モデルにおいても、同様に平滑筋の ATP 感受性カリウムチャンネルにおいて機能障害が起きていると推測された。SAH 後の EBI における脳細動脈障害の原因としては、頭蓋内圧上昇による脳灌流圧低下による血管収縮や、血小板活性化による種々の血管収縮物質の放出、赤血球からのオキシヘモグロビンによる血管内皮一酸化窒素の反応低下などが複合的に関与していると考えられている。今回我々が明らかにした ATP 感受性カリウムチャンネルの機能障害は、EBI で起こる脳細動脈障害に関与している可能性があるとして推測された。通常 ATP 感受性カリウムチャンネルは、細胞内 ATP 減少により開口して、膜の過分極を起こし、結果過分極はカルシウムの細胞内流入を障害し、血管が拡張 (弛緩) する。しかし SAH による頭

蓋内圧上昇で細胞内 ATP 減少しても, ATP 感受性カリウムチャンネルの機能障害が起きているため, チャンネルが開口せず拡張(弛緩)しないと推測された。機能障害の原因としては全てではないものの, 活性酸素が関与していると推測された。これらの結果は, 特に SAH 後の EBI の治療における活性酸素捕捉薬の臨床使用において基礎的な背景を補うと考えられた。

#### 引用文献

1. van Gijn J, Kerr RS, Rinkel GJ. Subarachnoid hemorrhage. *Lancet*. 2007;369(9558):306-18.
2. de Rooij NK1, Rinkel GJ, Dankbaar JW, Frijns CJ. Delayed cerebral ischemia after subarachnoid hemorrhage: a systematic review of clinical, laboratory, and radiological predictors. *Stroke*. 2013;44(1):43-54.
3. Taki W, Sakai N, Suzuki H; PRESAT Group. Determinants of poor outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage when both clipping and coiling are available: Prospective Registry of Subarachnoid Aneurysms Treatment (PRESAT) in Japan. *World Neurosurg*. 2011;76(5):437-45.
4. Sehba FA, Friedrich V Jr, Makonnen G, Bederson JB. Acute cerebral vascular injury after subarachnoid hemorrhage and its prevention by administration of a nitric oxide donor. *J Neurosurg*. 2007;106(2):321-9.
5. Murata T, Horiuchi T, Goto T, Li Y, Hongo K. Vasomotor response induced by change of extracellular potassium and magnesium in cerebral penetrating arterioles. *Neurosci Res*. 2011;70(1):30-4.
6. Murata T, Dietrich HH, Horiuchi T, Hongo K, Dacey RG Jr. Mechanisms of magnesium-induced vasodilation in cerebral penetrating arterioles. *Neurosci Res*. 2016;107:57-62.
7. Solomon RA, Antunes JL, Chen RY, Bland L, Chien S. Decrease in cerebral blood flow in rats after experimental subarachnoid hemorrhage: a new animal model. *Stroke*. 1985;16(1):58-64.
8. Dacey RG Jr, Duling BR. A study of rat intracerebral arterioles: methods, morphology, and reactivity. *Am J Physiol*. 1982;243(4):H598-606.
9. Horiuchi T, Dietrich HH, Hongo K, Goto T, Dacey RG Jr. Role of endothelial nitric oxide and smooth muscle potassium channels in cerebral arteriolar dilation in response to acidosis. *Stroke*. 2002;33(3):844-9.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 村田貴弘, 堀内哲吉
2. 発表標題 くも膜下出血後の早期脳障害における脳細動脈の機能障害
3. 学会等名 第44回日本脳卒中学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahiro Murata, Tetsuyoshi Horiuchi, Kazuhiro Hongo
2. 発表標題 Vasodilation induced by pinacidil are attenuated in early vascular injury after subarachnoid hemorrhage on rat cerebral penetrating arterioles.
3. 学会等名 Neuroscience 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 村田貴弘, 堀内哲吉
2. 発表標題 くも膜下出血後の早期脳障害における脳細動脈の機能障害の改善
3. 学会等名 第78回日本脳神経外科学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahiro Murata, Tetsuyoshi Horiuchi
2. 発表標題 Improvement of vasoactive dysfunction on rat cerebral penetrating arterioles in early vascular injury after subarachnoid hemorrhage.
3. 学会等名 Neuroscience 2019 (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
連携研究者	堀内 哲吉  (Horiuchi Tetsuyoshi)  (40303466)	信州大学・医学部学術研究院医学系・教授    (13601)	