

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K19993

研究課題名(和文) くも膜下出血後早期脳損傷(EBI)における脳微小循環障害に対する治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a treatment for cerebral microcirculation disorder in early brain injury (EBI) after subarachnoid hemorrhage

研究代表者

奈良岡 征都 (Naraoka, Masato)

弘前大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10455751

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ラット内頸動脈穿通によるくも膜下出血モデルを使用した。作成したラットくも膜下出血モデルに対して、治療介入群としてシロスタゾール群およびベラプロストナトリウム群、オザグレルナトリウム群を作成した。シロスタゾール群では有意に脳血管攣縮およびeNOS減少抑制、神経アポトーシス抑制、脳浮腫軽減による微小循環障害改善効果が認められたものの、ベラプロストナトリウム群およびオザグレルナトリウム群では有意差が得られなかった。

この結果から、シロスタゾールとの重複治療群作成を断念し、酸化ストレス抑制が実証されているアップルポリフェノールを追加治療薬として用いて検討し、eNOS単独での改善効果が確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

くも膜下出血は未だに多くの有病率、高い死亡率を伴う出血性脳卒中であり、開頭脳動脈瘤頸部クリッピング術やコイル塞栓術にて脳動脈瘤の根治治療にて一命を取り留めたとしても、その後の脳血管攣縮、遅発性脳虚血などによって重大な後遺症を残す可能性がある。後遺症の克服のため、遅発性脳虚血の原因の一つである脳微小循環障害の治療を目的とした研究を行い、シロスタゾールおよびポリフェノールにて改善の兆しが認められた。

研究成果の概要(英文)：A subarachnoid hemorrhage model with rat internal carotid artery perforation was used; SD male rats (400-450 g) were used. Cerebral pressure is continuously monitored before the creation of the subarachnoid hemorrhage. For the rat subarachnoid hemorrhage model, cilostazol, veraprost sodium, and ozagrel sodium groups were created as treatment intervention groups. The cilostazol group showed significant inhibition of cerebral vasospasm and eNOS reduction, inhibition of neuronal apoptosis, and amelioration of microcirculatory disturbances by reducing cerebral edema, while the veraprost sodium and ozagrel sodium groups showed no significant difference.

In view of these results, we decided not to create a duplicate treatment group with cilostazol and investigated the use of apple polyphenol, which has been demonstrated to inhibit oxidative stress, as an additional therapeutic agent, and confirmed the improvement effect of eNOS.

研究分野：脳血管障害

キーワード：くも膜下出血 脳微小循環障害 脳血管攣縮 遅発性脳虚血

1. 研究開始当初の背景

くも膜下出血後には頭蓋内圧亢進による脳虚血に基づく脳損傷(necrosis と cytotoxic edema)が生じることは古くから指摘されてきた。最近ではくも膜下出血に由来する様々な反応や物質により、apoptosis による神経細胞死、内皮細胞 apoptosis や血液脳関門破綻による vasogenic edema が生じ、病態が進展することが示されている。くも膜下出血後には oxyhemoglobin の生成と引き続く hydroxyl radical などの活性酸素の産生により酸化ストレスが増大する。最近、こうした酸化ストレスが、apoptosis による神経細胞死、内皮細胞 apoptosis や血液脳関門破綻による脳浮腫を引き起こし得ることが指摘されている。

2. 研究の目的

脳動脈瘤性くも膜下出血の超急性期に生じる脳障害は、頭蓋内圧亢進とともにくも膜下血腫由来の様々な物質、反応により引き起こされることが示されている。こうした病態は、最近 Early Brain Injury と称され、超急性期の重症度を左右するとともに、遅発性の脳血管攣縮発生や予後に多大なる影響を与えることで注目されている。従って、Early Brain Injury を最小限に抑えることで、予後の向上が期待される。Early Brain Injury の改善策としては、脳微小循環障害の治療法を確立することが残された課題である。脳微小循環障害には、

- ・脳微小血栓
- ・脳微小血管の狭小化(収縮)

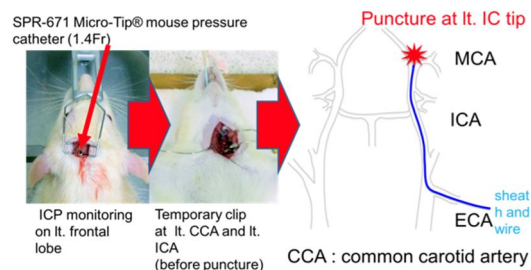
の2つが考えられている。

これら2つの要素をパラメータとして、以下の薬剤の有効性を検討する。

- (1) PDEIII 阻害薬(シロスタゾール)
- (2) TXA2 阻害薬(オザグレルナトリウム)
- (3) アップルポリフェノール

3. 研究の方法

ラット内頸動脈穿通によるくも膜下出血モデルを用いて各薬剤の投与を行い、Early Brain Injury・脳微小循環障害に対する効果について検討した。アポトーシスの検出として TUNEL 染色およびカスパーゼ 3、さらに抗ラジカル染色を追加した。血管脳関門の破綻については MMP-9 を ELISA にて測定、脳底動脈血管面積測定にて脳血管攣縮評価を行った。



4. 研究成果

アポトーシスの検出として TUNEL 染色およびカスパーゼ 3 を ELISA にて測定し、さらに、抗ラジカル染色を追加した。脳圧亢進に比例してアポトーシスが増加し、Early brain injury の発生が確認できた。一方、いずれの項目においてもシロスタゾールでは治療群において改善傾向は認められたものの、オザグレルナトリウムでは有意差は得られなかった。脳血管攣縮とその治療効果につき脳底動脈血管面積測定にて評価を行ったところ、シロスタゾール治療群にて有意に攣縮治療効果が認められた。一方、ポリフェノールの脳血管攣縮に対する詳細な作用機序を明らかにするため、酸化ストレスに着目し、そのマーカーである d-ROM (Diacron 社 Reactive Oxygen Metabolites: 活性酸素代謝物テスト)、BAP (Biological Antioxidant Potential : 抗酸化力テスト)、MDA (Malondialdehyde) の測定を行った。

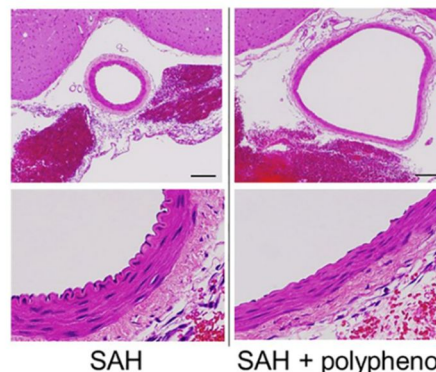
d-ROMs テストは、生体内の活性酸素やフリーラジカルを直接計測するのではなく、フリーラジカルにより生じた血中の、主にヒドロペルオキシド(ROOH、酸化ストレスのマーカー)濃度を呈色反応で計測し、生体内の酸化ストレス度の状態を総合的に評価する。d-ROM 値が高いほど酸化ストレスが多いと言える。一方、BAP テストとは三価鉄 Fe³⁺イオンを指標とし、検体の抗酸化物質の作用で二価鉄 Fe²⁺イオンに還元され赤色が脱色される際の色の変化を光度計で計測し、その還元力を抗酸化力として評価する。BAP によりビタミン C・E、ポリフェノールなどの外因性抗酸化物質等の還元力が測定可能であり、BAP 値が高いほど抗酸化力が強いといえる。

Day4 に安楽死させた後に、両群とも還流固定群と生体標本群に分け、それぞれ標本を摘出した。還流固定群では、脳底動脈を取り出し血管組織の HE 染色、eNOS の免疫染色を行った。生体標本群では脳底動脈を取り出し、血管組織を破砕した後、ELISA で eNOS、MDA の測定を行った。MDA は脂質過酸化分解生成物の一つであり、脂質過酸化の主要なマーカーとして広く用いられている。多価不飽和脂肪酸(PUFA)が活性酸素種/フリーラジカルによる酸化作用を受けることで最終産物として MDA が形成されるため、MDA の増加によって酸化ストレスが大きいと類推できる。

(1) 血管経と脳血管攣縮の評価

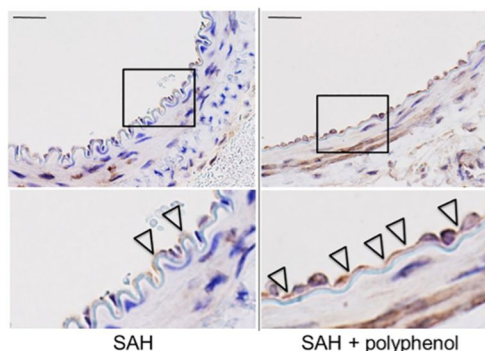
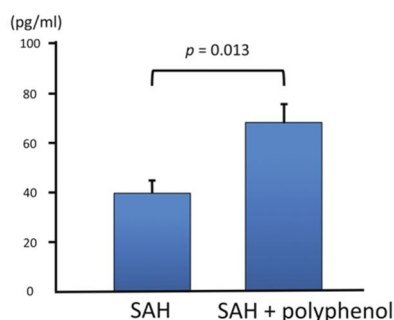
両群とも還流固定を行い、HE 染色にて比較した。

血管径の平均は SAH 群が $0.53 \pm 0.13\text{mm}$ 、アップルポリフェノール群が $1.55 \pm 0.27\text{mm}$ となり、 $P < 0.01$ で有意にアップルポリフェノール群の血管径に治療効果を認めた。



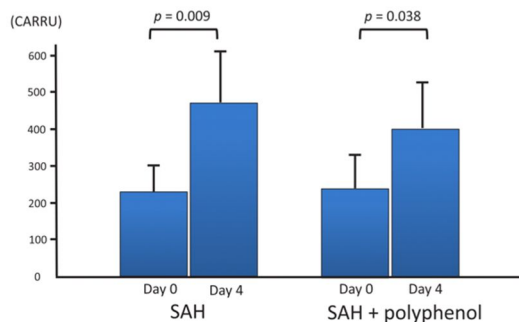
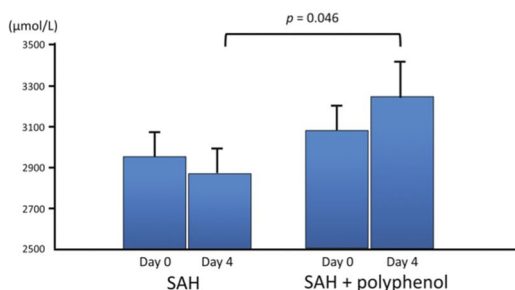
(2) 脳底動脈の免疫染色 eNOS および ELISA による定量的評価

両群の脳底動脈の組織標本に eNOS の免疫染色を行った結果を以下に示す。アップルポリフェノール群の方が多くの eNOS が発現していることが確認できた。さらに、ELISA にて定量的にも有意差が確認された。

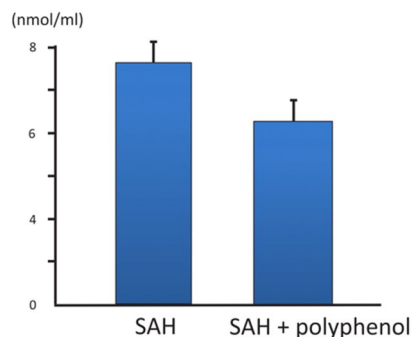


(3) d-ROM、BAP、MDA の測定結果

BAP の結果を示す。Day4 において、SAH 群 ($2845 \pm 193.6 \mu\text{mol/L}$) に比べ、治療群 ($3138 \pm 172.3 \mu\text{mol/L}$) に有意差な増加を認めた。なお、各群内での Day0 と Day4 間では有意差は認められなかった。



一方、d-ROM は、SAH 処置後の両方のグループで大幅に増加した。ただし、SAH 群 ($492 \pm 82.3 \text{ CARRU}$) に比べ、治療群は d-ROM が低下していたものの ($412 \pm 102.6 \text{ CARRU}$)、有意差を示すに至らなかった。脂質酸化ストレスを示す MDA の結果は右図のようになった。MDA は SAH 群に比べ治療群で低下していたものの、有意差は認められなかった。



以上の結果から、くも膜下出血後の Early brain injury は脳微小循環障害に相関すること、シロスタゾール、ポリフェノールの治療効果は、とくに微小循環障害改善によって治療効果が得られたことが示唆された。また、くも膜下出血直後からのシロスタゾール、ポリフェノール投与の有効性が示唆された。本研究ではシロスタゾールとポリフェノールの併用療法の検証には至らなかった。また、ポリフェノールがどのような機序でこれらの治療効果を発揮しているかが今後の課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Naraoka Masato, Matsuda Naoya, Shimamura Norihito, Asano Kenichiro, Akasaka Kenichi, Takemura Atsuhito, Hasegawa Seiko, Ohkuma Hiroki | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Long-acting statin for aneurysmal subarachnoid hemorrhage: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism | 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) 10.1177/0271678X17724682 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Naraoka Masato, Li Yuchen, Katagai Takeshi, Ohkuma Hiroki | 4. 巻 1 |
| 2. 論文標題 Effects of apple polyphenols on oxidative stress and cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in a rabbit double hemorrhage model | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Brain Hemorrhages | 6. 最初と最後の頁 54 ~ 58 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.hest.2019.12.006 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Naraoka Masato, Fumoto Toshio, Li Yuchen, Katagai Takeshi, Ohkuma Hiroki | 4. 巻 129 |
| 2. 論文標題 The Role of Intracranial Pressure and Subarachnoid Blood Clots in Early Brain Injury After Experimental Subarachnoid Hemorrhage in Rats | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 World Neurosurgery | 6. 最初と最後の頁 e63 ~ e72 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.wneu.2019.05.009 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Fumoto Toshio, Naraoka Masato, Katagai Takeshi, Li Yuchen, Shimamura Norihito, Ohkuma Hiroki | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 The Role of Oxidative Stress in Microvascular Disturbances after Experimental Subarachnoid Hemorrhage | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Translational Stroke Research | 6. 最初と最後の頁 684 ~ 694 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12975-018-0685-0 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

| |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名 奈良岡征都 |
| 2. 発表標題 脳血管攣縮予防と予後改善への当施設での取り組み |
| 3. 学会等名 第35回スパズムシンポジウム（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 奈良岡征都、松田尚也、片貝武、嶋村則人、大熊洋揮 |
| 2. 発表標題 くも膜下出血後の遅発性脳虚血と予後に対する脳微小循環時間の影響 |
| 3. 学会等名 第34回スパズム・シンポジウム |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 奈良岡征都、麓敏雄、松田尚也、片貝武、嶋村則人、大熊洋揮 |
| 2. 発表標題 くも膜下出血後Early Brain Injuryに対する酸化ストレス抑制の効果 |
| 3. 学会等名 第34回スパズム・シンポジウム |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 奈良岡征都、松田尚也、片貝武、嶋村則人、大熊洋揮 |
| 2. 発表標題 くも膜形成による血腫クリアランスの促進とスパズム予防 |
| 3. 学会等名 第33回スパズム・シンポジウム |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Masato Naraoka, Naoya Matsuda, Norihito Shimamura, Hiroki Ohkuma. |
| 2. 発表標題 Evaluation of the microcirculatory dysfunction by Arterial Spin Labeling (ASL) after subarachnoid hemorrhage. |
| 3. 学会等名 ISAH2019 15th International Conference on Subarachnoid Hemorrhage (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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
| | | | |