

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2021

課題番号：17K10853

研究課題名（和文）慢性硬膜下血腫被膜への好酸球誘導因子の解明と新たな治療法の確立

研究課題名（英文）Clarification of eosinophilic chemoattractants in chronic subdural hematoma outer membrane

研究代表者

大須賀 浩二 (Osuka, Koji)

愛知医科大学・看護学部・教授

研究者番号：40378013

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：今回の研究成果からは、慢性硬膜下血腫被膜における好酸球の発現においては ecalectin よりも eotaxin-3 がより深く関与していることが判明した。また、慢性硬膜下血腫の発育段階においては、lamina type において好酸球が深く関与していることも解明された。また、interleukin-5 は好酸球を成熟させ脱顆粒作用も強く持ち合わせているが、今回の結果からも慢性硬膜下血腫被膜の好酸球の発現ならびに被膜増大においても interleukin-5 の役割は大きいことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性硬膜下血腫は、高齢者において軽微な頭部外傷後に発生し認知症状や脳卒中様症状を伴うなど高齢化社会において避けられない疾患である。慢性硬膜下血腫の被膜は、新生血管ならびに好酸球、肥満細胞などの炎症性細胞などからなりたっており、これら炎症性細胞が血腫被膜の増大に果たす役割は大きいと考えられる。今回の研究成果から、eotaxin-3 は好酸球を誘導し、interleukin-5 が好酸球を成熟させ、好酸球から EDN の放出に関与していることが判明した。これらの因子を対象とした新たな慢性硬膜下血腫に対する治療法が大いに期待するところである。

研究成果の概要（英文）：Eosinophils induce inflammation by releasing cytokines and cytotoxic granule proteins. Infiltration of eosinophilic granulocytes occurs in the outer membrane of chronic subdural hematomas (CSDHs). Eosinophils play an important role in the growth of CSDHs. In the current study, we assessed the expression of eosinophil chemoattractants in CSDH fluids according to the growth stage of the CSDHs. CSDH fluids were obtained from 38 patients during trepanation surgery. The concentrations of ecalectin, eotaxin-3, interleukin-5 (IL-5) and eosinophil-derived neurotoxin (EDN) were high in the CSDH fluids. The levels of eotaxin-3, IL-5, EDN and %eosinophil were significantly higher in the lamina type of CSDH. The correlations between eotaxin-3 and IL-5, IL-5 and EDN, and EDN and %eosinophil were statistically significant ($p < 0.01$). Our data suggest that eotaxin-3 is a chemoattractant of eosinophils. IL-5 induces the activation of eosinophils following the degranulation of EDN into CSDH fluids.

研究分野：脳神経外科

キーワード：慢性硬膜下血腫 好酸球 eotaxin-3

1. 研究開始当初の背景

慢性硬膜下血腫の被膜は、fibroblast や新生血管ならびに好酸球、肥満細胞などの炎症性細胞などからなりたっている。好酸球を含む炎症性細胞が血腫被膜の増大に果たす役割は大きいと考えられる。我々は今までに穿頭手術時に採取した慢性硬膜下血腫内に interleukin-6 (IL-6)、VEGF ならびに TGF-β が高濃度発現しており、慢性硬膜下血腫被膜におけるシグナル伝達系について検討し、以下の結果(右下図参照)を報告した。

・IL-6

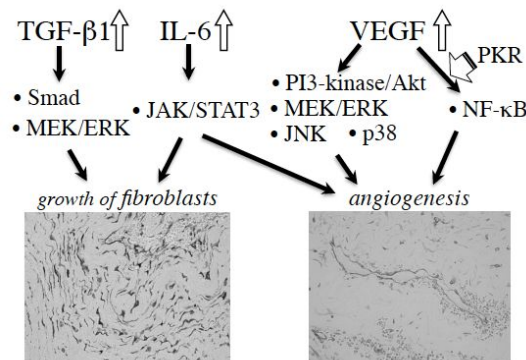
炎症性サイトカインである IL-6 から JAK-STAT シグナル伝達系が fibroblast ならびに血管内皮において活性化し、それぞれ fibroblast 増大ならびに血管新生すなわち血腫被膜の増大に深く関与していることを報告した(World Neurosurg 2016, Neurosci Lett 2013)。

・VEGF

また、血腫内には VEGF も多く存在し、PKR を介する NF-κB シグナル伝達系、PI3-kinase /Akt/eNOS のシグナル伝達系、MAPK シグナル伝達系ならびに Ras/MEK/ERK シグナル伝達系が血管内皮において活性化し、血腫被膜内の血管新生にも深く関与していることを報告した(Neurosurgery 2017, J.Neurotrauma 2015, Brain Res 2012, Funai M, Osuka K, et al. Activation of PI3 kinase/Akt signaling in chronic subdural hematoma outer membranes. J.Neurotrauma 2011)。

・TGF-β

好酸球の顆粒に多く含まれる TGF-β から Smad シグナル伝達系を活性化し fibroblast の増大に関して報告した(J.Neurotrauma 2014)。



1980年代から既に、慢性硬膜下血腫の被膜における好酸球の浸潤に関して下記の報告がされている。

・慢性硬膜下血腫の被膜に関しての考察 好酸球浸潤について Neurol Med Chir 1988 28, 236-240

・慢性硬膜下血腫被膜形成にみる好酸球浸潤の意義 Neurol Med Chir 1983 23, 145-151

これらの論文において好酸球の周辺には常に fibroblast の増殖が見られておりと報告されている。しかし、一体全体、何が好酸球の浸潤を促進するかに関しては、いまだに報告はされていない。

気管支喘息において、好酸球による TGF-β mRNA の発現ならびに気道の線維化を引き起こすと報告されているなど、気管支喘息においても好酸球が深く関わっているとされる。(Eosinophil-associated TGF-β1 mRNA expression and airways fibrosis in bronchial asthma. Am. J Respir. Cell Mol. Biol. 1997 17:326-333)

一方では、ケモカインの eotaxin が気管支喘息の肺において好酸球を誘導してくると報告されている (Eotaxin and the attraction of eosinophils to the asthmatic lung. Respir. Res. 2001 2:150-156)。アレルギー性鼻炎においても鼻粘膜における好酸球ならびに eotaxin の発現が報告されている。

以上のことから、慢性硬膜下血腫中に浸潤してくる好酸球は、気管支喘息やアレルギー性鼻炎などにおける好酸球の発現機序ならびに役割とよく似ている可能性が高いのではないかと発想に至り、好酸球誘導因子の解明ならびにそれに基づく新たな治療方の開発を目的に今回の研究を計画した。

2. 研究の目的

慢性硬膜下血腫は、高齢者において軽微な頭部外傷後に発生し認知症状や脳卒中様症状を伴うなど高齢化社会において避けられない疾患である。私たちは、血腫中の好酸球による TGF-β を介する fibroblast での Smad シグナリング系の活性化による血腫被膜の増大を解明した。好酸球は、気管支喘息における fibroblast の増大にも深く関与している。これらの結果から、慢性硬膜下血腫の被膜増大に好酸球の果たす役割は大きいと考えるが、慢性硬膜下血腫における好酸球の誘導発現因子についてはいまだ完全には解明されていない。これら一連の研究成果を踏まえ、慢性硬膜下血腫における好酸球の誘導発現因子を解明し、好酸球のケモカイン受容体へのリガンドに着目した治療法と再発予防法の開発への糸口を作ることを目的とする。

3. 研究の方法

2015年1月から2016年12月までの、38症例の慢性硬膜下血腫の患者さんを対象とした。穿頭血腫除去手術後に採取した血腫は遠心後に上清を採取した。コントロールとしては、未破裂脳動脈瘤患者からの髄液5症例と健常成人の血清5症例を用いた。

頭部CT所見から、homogeneous type, laminar type, separated type から trabecular type へと4段階に成長することにより画像分類した。ELISAキットを用いて、eotaxin (R&D Systems, Inc), eotaxin-3 (R&D Systems, Inc), interleukin-5 (Affymetrix Inc.), eosinophil-derived neurotoxin (EDN,

MBL CO., LTD)の血腫内容液における濃度を測定した。

また、20 症例の慢性硬膜下血腫内における好酸球の%割合についてギムザ染色を用いて肉眼的に計測した。

統計処理については、ANOVA を用い検討し、Bonferroni/Dunn を用いて多群間の差を検討した。また、Pearson の相関係数についても検討をおこなった。

4 . 研究成果

男性 27 症例と女性 11 症例を対象とし、平均年齢は 74.2 歳であった。両側の慢性硬膜下血腫の患者 2 症例を含め、検体数としては 40 症例となった。

また、下記の表の様に血清ならびに髄液と比較すると、慢性硬膜下血腫内において明らかに高濃度発現し、eaelectin と EDN においては、有意差を認めた。

表 1 eaelectin, eotaxin-3, IL-5 ならびに EDN の平均値 (範囲)、† p<0.01 vs serum and CSF

	症例数	eaelectin (pg/ml)	eotaxin-3 (pg/ml)	IL-5 (pg/ml)	EDN (pg/ml)
CSDH	40	187 † (42-524)	13,995 (45-114,099)	235 (0-2,341)	2,490 † (156-6,110)
serum	5	4.9 (1.8-7.5)	16.8 (14-21)	3.5 (0.7-6.0)	94.0 (73-124)
CSF	5	1 (0.6-1.2)	11 (2-16)	5 (3.3-6.4)	2 (1-5)

eaelectin, eotaxin-3, interleukin-5, EDN ならびに好酸球%発現率と血腫の発育段階との結果については Figure 1 (1, homogeneous type; 2, laminar type; 3, separated type; 4, trabecular type; E における括弧内は好酸球%発現率を測定できた症例数)に示す。

この結果から、ともに好酸球の誘導因子とされている eaelectin 並びに eotaxin-3 において、慢性硬膜下血腫の増大においては eotaxin-3 が深く関与していることが示唆された。また、慢性硬膜下血腫の発育段階において laminar type において好酸球が深く関与していることが解明された。

また、Fiugre 2 に示すように、eotaxin-3, interleukin-5, EDN ならびに好酸球%発現率において、お互いに相関関係が存在した。

好酸球の細胞質には eosinophil major protein や eosinophil peroxidase や eosinophil cationic protein や EDN などの様々な顆粒を含んでいる。血清 EDN はアトピー性皮膚炎における biomarker として、また再発の予測因子として用いられている。今回の結果では EDN が好酸球%発現率と一番強い相関関係を持っていたことから EDN は慢性硬膜下血腫における炎症性反応や発育段階のマーカーとなりうるということが判明した。interleukin-5 は好酸球の誘導因子であるが、それとともに好酸球の脱顆粒作用も強く持ち合わせている。今回の我々の結果からも慢性硬膜下血腫被膜の増大における intereleukin-5 の役割は大きく、interleukin-5 に対する抗体や receptor に対する抗体を用いた新たな治療法が待たれるところである。

以上のことから、慢性硬膜下血腫の増大には eotaxin-3, interleukin-5 が laminar stage において深く関与し、好酸球からの EDN の放出に関与していることが判明した。これらの因子に着目し、更なる病態解明が大いに期待するところである。

参考文献

Kawaguchi R, Osuka K, Aoyama M, Miyachi S, Takayasu M. Expressions of eotaxin-3, interleukin-5, and eosinophil-derived neurotoxin in chronic subdural hematoma fluids. J Neurotrauma 35:2242-2249 2018

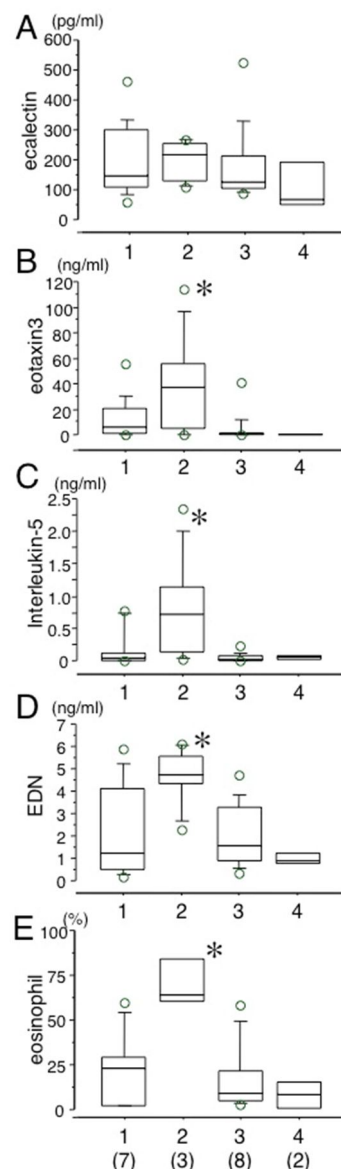


Figure 1

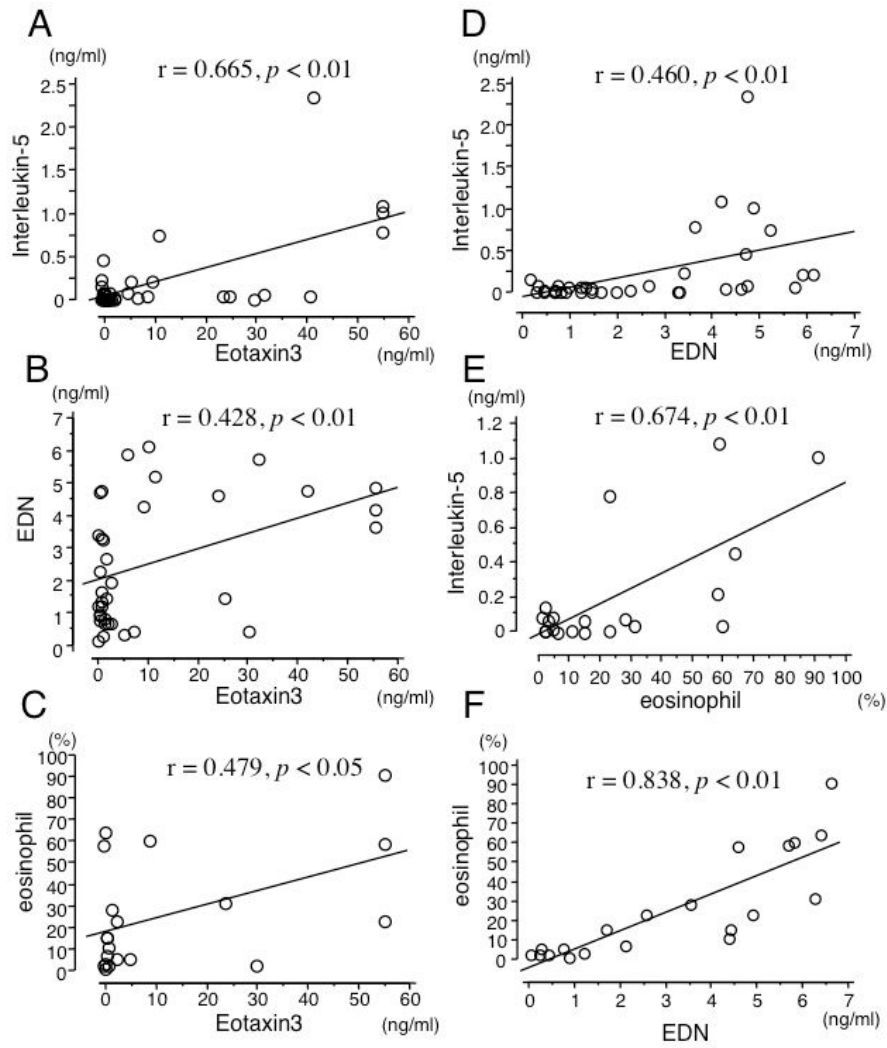


Figure 2

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計21件（うち査読付論文 21件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Osuka Koji, Watanabe Yasuo, Usuda Nobuteru, Iwami Kenichiro, Miyachi Shigeru, Takayasu Masakazu	4. 巻 15
2. 論文標題 Expression of high mobility group B1 and toll-like receptor-nuclear factor B signaling pathway in chronic subdural hematomas	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0233643
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0233643	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 Isaji Taiki, Osuka Koji, Ohmichi Yusuke, Ohmichi Mika, Naito Munekazu, Nakano Takashi, Iwami Kenichiro, Miyachi Shigeru	4. 巻 37
2. 論文標題 Expression of Angiopoietins and Angiogenic Signaling Pathway Molecules in Chronic Subdural Hematomas	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neurotrauma	6. 最初と最後の頁 2493 ~ 2498
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/neu.2020.7042	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 大須賀浩二、宮地茂	4. 巻 36
2. 論文標題 くも膜下出血後の髄液中における好中球誘発因子の経時的発現について	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 脳血管攣縮	6. 最初と最後の頁 129-131
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Osuka Koji, Watanabe Yasuo, Usuda Nobuteru, Aoyama Masahiro, Takeuchi Mikinobu, Takayasu Masakazu	4. 巻 36
2. 論文標題 Expression of Autophagy Signaling Molecules in the Outer Membranes of Chronic Subdural Hematomas	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Neurotrauma	6. 最初と最後の頁 403-407
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/neu.2018.5626.	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 大須賀 浩二、川口 礼雄、寺島 嗣明、宮地 茂	4. 巻 42
2. 論文標題 慢性硬膜下血腫被膜におけるToll-like receptorシグナル伝達系の発現について	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 神経外傷	6. 最初と最後の頁 68-70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 K Wada, K Osuka, Y Watanabe, N Usuda, M Fukasawa, Y Araki, S Okamoto, T Wakabayashi	4. 巻 81
2. 論文標題 Subarachnoid hemorrhage induces neuronal nitric oxide synthase phosphorylation at Ser1412 in the dentate gyrus of the rat brain.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nitric Oxide	6. 最初と最後の頁 67-74
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.niox.2017	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 Kawaguchi Reo, Osuka Koji, Aoyama Masahiro, Miyachi Shigeru, Takayasu Masakazu	4. 巻 35
2. 論文標題 Expressions of Eotaxin-3, Interleukin-5, and Eosinophil-Derived Neurotoxin in Chronic Subdural Hematoma Fluids	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Neurotrauma	6. 最初と最後の頁 2242 ~ 2249
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/neu.2018.5646	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 Osuka Koji, Watanabe Yasuo, Usuda Nobuteru, Aoyama Masahiro, Takeuchi Mikinobu, Takayasu Masakazu	4. 巻 36
2. 論文標題 Expression of Autophagy Signaling Molecules in the Outer Membranes of Chronic Subdural Hematomas	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Neurotrauma	6. 最初と最後の頁 403 ~ 407
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/neu.2018.5626	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 Osuka Koji, Watanabe Yasuo, Usuda Nobuteru, Aoyama Masahiro, Iwami Kenichiro, Takeuchi Mikiobu, Watabe Takeya, Takayasu Masakazu	4. 巻 34
2. 論文標題 Inhibitory Mechanism of the Outer Membrane Growth of Chronic Subdural Hematomas	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Neurotrauma	6. 最初と最後の頁 1996 ~ 2000
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/neu.2016.4623	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 Osuka K, Watanabe Y, Usuda N, Aoyama M, Kawaguchi R, Takeuchi M, Takayasu M.	4. 巻 80
2. 論文標題 Activation of Nuclear Factor-kappa B in Endothelial Cells of Chronic Subdural Hematoma Outer Membranes.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 571-578
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/neuros/nyw100.	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 Osuka Koji, Watanabe Yasuo, Usuda Nobuteru, Aoyama Masahiro, Iwami Kenichiro, Takeuchi Mikiobu, Watabe Takeya, Takayasu Masakazu	4. 巻 34
2. 論文標題 Expression of Caspase Signaling Components in the Outer Membranes of Chronic Subdural Hematomas	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Neurotrauma	6. 最初と最後の頁 3192 ~ 3197
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/neu.2017.5051	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16件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 大須賀浩二、川口礼雄、宮地茂
2. 発表標題 術後慢性硬膜下血腫におけるchemokineの経時的な発現について
3. 学会等名 第43回日本脳神経外傷学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大須賀浩二、宮地茂
2. 発表標題 くも膜下出血後の髄液中における好中球誘発因子の経時的発現について
3. 学会等名 第36回スバズムシンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大須賀 浩二、宮地 茂
2. 発表標題 くも膜下出血後の髄液中における好中球誘発因子の経時的発現について
3. 学会等名 第79回日本脳神経外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Osuka K, Usuda N, Takayasu M
2. 発表標題 HMBG1 produces Interleukin-6 through the Toll-like receptor and NF- B Signaling Pathway in Endothelial Cells of Chronic Subdural Hematoma
3. 学会等名 87th American Association of Neurological Surgeons Annual Scientific Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大須賀浩二、高安正和、白田信光
2. 発表標題 慢性硬膜下血腫被膜増大におけるHMGB 1ならびにToll-like receptorシグナル伝達系の関与
3. 学会等名 第42回日本脳神経外傷学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大須賀浩二、高安正和、和田健太郎
2. 発表標題 くも膜下出血後のラット海馬におけるSTAT3の活性化について
3. 学会等名 第35回スバズムシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大須賀 浩二、岩味 健一郎、川口 礼雄、宮地 茂
2. 発表標題 術後慢性硬膜下血腫におけるchemokineの経時的な発現について
3. 学会等名 第78回日本脳神経外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koji Osuka, Nobuteru Usuda, Masakazu Takayasu
2. 発表標題 Expression of Autophagy Signaling Molecules in Chronic Subdural Hematoma Outer Membranes
3. 学会等名 86th American Association of Neurological Surgeons Annual Scientific Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大須賀浩二、川口礼雄、高安正和
2. 発表標題 慢性硬膜下血腫被膜におけるAutophagyシグナル伝達系の発現
3. 学会等名 第41回日本脳神経外傷学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大須賀浩二、高安正和、和田健太郎
2. 発表標題 くも膜下出血後のラット海馬におけるAkt/mTORシグナル伝達系の活性化について
3. 学会等名 第34回スバズムシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大須賀浩二、高安正和、臼田信光
2. 発表標題 慢性硬膜下血腫被膜におけるToll-like receptorシグナル伝達系の発現
3. 学会等名 第77回日本脳神経外科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Koji Osuka, Nobuteru Usuda, Mikinobu Takeuchi, Masakazu Takayasu
2. 発表標題 Expression of Caspase Signaling Pathway in Chronic Subdural Hematoma Outer Membranes.
3. 学会等名 85th American Association of Neurological Surgeons Annual Scientific Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大須賀浩二、青山正寛、川口礼雄、高安正和、臼田信光
2. 発表標題 慢性硬膜下血腫被膜におけるCaspaseシグナル伝達系の発現
3. 学会等名 第40回日本脳神経外傷学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大須賀浩二、名倉崇弘、松尾直樹、渡部剛也、高安正和、丹羽愛知
2. 発表標題 くも膜下出血後の髄液中におけるケモカインの経時的発現について
3. 学会等名 第33回スバズムシンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大須賀浩二、川口礼雄、渡部剛也、高安正和、白田信光
2. 発表標題 慢性硬膜下血腫被膜におけるAutophagyシグナル伝達系の発現
3. 学会等名 第76回日本脳神経外科学会総会
4. 発表年 2017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
研究分担者	渡辺 泰男 (Watanabe Yasuo) (10273228)	昭和薬科大学・薬学部・教授 (32624)	
研究分担者	高安 正和 (Takayasu Masakazu) (60216794)	愛知医科大学・公私立大学の部局等・名誉教授 (33920)	

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
---------	---------