

令和 3 年 6 月 6 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16554

研究課題名(和文) くも膜下出血後 EBI と小胞体ストレス応答 UPR の関連についての検討

研究課題名(英文) Examination of the relationship between early brain injury of post-subarachnoid hemorrhage and unfolded protein response of endoplasmic reticulum stress

研究代表者

吉川 陽文 (Yoshikawa, Akifumi)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：30646691

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：くも膜下出血モデルを野生型マウスとATF6ノックアウトマウスにて作成し、比較検討を行うと、モデル作成24時間後の時点で神経学的所見の明らかな差は見いだせなかった。また、脳をとりだし、算出される水分含有割合で脳浮腫の程度の比較を行ったが、こちらも明らかな差を認めなかった。くも膜下出血群としたものと、sham群にて小胞体ストレス応答がどのように生じているか比較すると、くも膜下出血群では、小胞体ストレス応答の主幹転写因子であるATF6の発現がsham群より有意に多くみられ、下流の分子シャペロンのGRP78やCHOPも多く発現しており、小胞体ストレス応答が誘導されていることが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マウスをくも膜下出血群としたものでは小胞体ストレス応答の主幹転写因子であるATF6の発現がsham群より有意に多くみられ、下流の分子シャペロンのGRP78やCHOPも多く発現しており、小胞体ストレス応答が誘導されていることが確認された。小胞体ストレス応答の制御はくも膜下出血後の病態解明のターゲットとなりうる。

しかし、くも膜下出血モデルを野生型マウスとATF6ノックアウトマウスにて作成し、比較すると、24時間後の時点で神経学的所見や脳浮腫の程度に差異はなく、小胞体ストレス応答が及ぼす影響については検討の余地が残っている。

研究成果の概要(英文)：Subarachnoid hemorrhage model was created in wild-type mice and ATF6 knockout mice and compared, no clear difference in neurological findings was found 24 hours after model creation. In addition, the brain was taken out and the degree of cerebral edema calculated water content ratio was compared, however no clear difference was observed here either. Comparing how the endoplasmic reticulum stress response occurs in the subarachnoid hemorrhage group and the sham group, the expression of ATF6, which is the main transcription factor of the endoplasmic reticulum stress response, is higher in the subarachnoid hemorrhage group than in the sham group. It was significantly abundant, and the downstream molecular chaperones GRP78 and CHOP were also highly expressed, confirming that the endoplasmic reticulum stress response was induced.

研究分野：脳神経外科

キーワード：early brain injury subarachnoid hemorrhage endoplasmic reticulum

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

くも膜下出血患者の予後決定因子として、出血後 72 時間以内に生じる早期脳損傷 (early brain injury: EBI) という概念が注目されている。EBI は脳圧上昇に起因する脳浮腫が主体となった病態とされ、脳虚血がその一因となっていると考えられている。これまでに本研究者は、細胞内小器官のひとつである小胞体の障害 (小胞体ストレス) と脳虚血の関連に着目し、小胞体におけるストレス応答 Unfolded protein response (UPR) の主幹転写因子である Activated transcription factor6 (ATF6) の解析により、脳梗塞モデルにおける亜急性期のアストロサイト活性化能に UPR が大きく関与していることを報告しており (Yoshikawa et al, J Neurochem 2015) EBI においても UPR が関与していると仮定した。本研究ではマウスくも膜下出血モデルを用いて EBI と UPR との関連を明らかにし、UPR の役割を検証する。

### 2. 研究の目的

現在、実臨床においては、くも膜下出血の予後改善のため、亜急性期に様々な治療が行われている。そのほとんどが脳血管攣縮に対する治療であり、EBI をターゲットとした有用なまとまった治療報告はない。これは EBI のメカニズムがまだ詳細に解明されていないためであり、本研究で EBI における UPR の関与を解明することは、将来的な EBI をターゲットとした新規治療法への発展が期待できる。

UPR はこれまでに糖尿病や神経変性疾患等様々な疾患での関連性が示唆されてきているが、未だくも膜下出血後における UPR の詳細なメカニズムは報告されていない。UPR は同じシグナル経路が応答の強弱により細胞の生と死どちらにも影響を及ぼすことがあると言われており、生体内での詳細な役割については今なお未解明な部分がある。新たな疾患概念での UPR の役割を解明することは、UPR そのものについての理解をより深めることになりうる。

### 3. 研究の方法

マウスくも膜下出血には、大槽/視交叉前槽血液注入モデルと血管穿通モデルがある。血管穿通モデルでは、外頸動脈から挿入したナイロン糸を内頸動脈先端部まで誘導し穿刺することで、くも膜下出血を起こし、頭蓋内圧を上昇させる。頭蓋内圧がそれほど上昇しない血液注入モデルと比べて、血管穿通モデルでは実臨床に近い EBI の病態を再現できると考えられている (Lee et al, Neurosurgery 2009)。本研究期間内に、マウスくも膜下出血の血管穿通モデルを用いて、EBI と UPR の関連を明らかにし、UPR が EBI に寄与する分子メカニズムを解明する。

マウスくも膜下出血モデルについて

本プロジェクトをでは三重大学脳神経外科学教室 (Suzuki et al, Stroke 2009) のマウスくも膜下出血の血管穿通モデルを使用する。

マウスくも膜下出血モデルにおける EBI と ATF6 の関連についての検討

くも膜下出血後 EBI と ATF6 との関連に関して、sham 群との比較において脳水分含量計測による脳浮腫、Evans blue extravasation を用いた血液脳関門崩壊、神経細胞死の割合、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  による炎症反応の評価を行い、くも膜下出血群における EBI を確認する。また、蛍光免疫染色、RT-PCR、Western blot 法で神経膠細胞の活性化を評価する。

マウスくも膜下出血モデル ATF6 KO 群を用いた EBI と ATF6 の関連についての検討

マウスくも膜下出血 ATF6 KO 群と WT 群の比較において、同様の実験にて、EBI と ATF6 の関連の再現性を確認する。また同時に、くも膜下出血作成 12 時間後、24 時間後における神経学的評価を行い、EBI 後の予後と ATF6 の関連について検討する。神経学的評価に関しては、一般的な評価方法である 18-point composite test 及び beam balance test に加え、実臨床では慢性期に認知機能低下、抑うつ症状、運動機能障害が問題となるため、長期記憶 (水迷路試験や受動回避学習試験)、作業記憶 (Y または T 迷路試験)、抑うつ (テールサスペンション試験や強制水泳試験)、行動試験 (ロータロッド) を行い評価する (Sherchan et al, J Neurotrauma 2011)。

### 4. 研究成果

初年度はまず、マウスくも膜下出血モデルの作成の安定化を目指した。しかし、勤務異動により動物実験のためのまとまった時間があまりとれなかったこと、それにより作成手技がなかなか成熟しなかったことにより、モデルの安定化に時間を要した。また、所属講座にはモデル作成可能な研究者がおり、適宜モデル作成援助を受ける予定であったが、施設変更や別実験への着手もあり十分な援助を受けるのが困難であった。

2 年目はくも膜下出血モデルを野生型マウスと ATF6 ノックアウトマウスにて作成し、比較検討を行った。神経学的評価ではモデル作成 24 時間後の時点での比較検討を行っている。両群間では神経所見に明らかな差を認めなかった。また、神経学的評価を行った直後に脳をとりだし、72 時間でのオートクレーブでの乾燥を行った前後での重量を測定し、算出される水分含有割合で脳浮腫の程度の比較を行ったが、こちらも明らかな差を認めなかった。

研究機関を延長した 3 年目は、野生型マウスに対して血管穿通を行いくも膜下出血群とした

ものと、血管穿通を行わない sham 群にて小胞体ストレス応答がどのように生じているか比較した。

海馬と線条体、皮質に部位をわけた検討において、くも膜下出血群では海馬において、小胞体ストレス応答の主幹転写因子である ATF6 の発現が sham 群より有意に多くみられた。また、小胞体ストレス応答の下流の分子シャペロンの GRP78 や CHOP も海馬と線条体で有意にくも膜下出血群で多く発現しており、くも膜下出血で小胞体ストレス応答が誘導されていることが確認された。皮質ではいずれの検討においても有意な差はみられず、小胞体ストレス応答があまり生じていないものと思われた。また、くも膜下出血群では海馬において MMP9 の上昇も見られたが、小胞体ストレス応答とどのように関連しているかまでは解明できなかった。

3 年目は昨今の社会的事情もあり、研究に十分な時間がえられなかった。そのため、蛍光免疫染色、血液脳関門評価、神経細胞死の割合、炎症反応の評価を進めているが、評価に十分な数に至らなかった。

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

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