

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09300

研究課題名(和文) 蘇生後脳症におけるRhoキナーゼ阻害薬の役割

研究課題名(英文) The effect of Rho inhibitors in post cardiac arrest syndrome using a mouse model of cardiac arrest

研究代表者

中山 慎(Nakayama, Shin)

筑波大学・医学医療系・客員研究員

研究者番号：60596443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マウス心停止モデルを用いて、Rhoキナーゼ阻害薬であるファスジルが蘇生後の脳組織障害や脳・肺浮腫を軽減できるかどうか検証した。ファスジル投与は用量依存的に蘇生後の生存率を下げた。ファスジル20mg/kgは蘇生24時間後の脳浮腫を軽減したが、48時間後には効果がなくなった。肺の水分量を減らすことはなかった。脳の組織障害を軽減する作用もなかった。RNAシーケンサーを用いた遺伝子解析ではファスジル投与は血管内皮障害、細胞の遊走促進、炎症性サイトカインの活性化、腫瘍壊死因子TNFの促進など総じて炎症を惹起する遺伝子発現を増加させていた。ファスジル投与は蘇生後症候群を軽減する作用が認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心肺停止・蘇生後に生じる低酸素脳症や脳浮腫の薬物治療は確立されていない。申請者の先行研究(動物実験)ではHMG-CoA還元酵素阻害剤であるスタチンのうち脂溶性のタイプが脳障害を軽減した。その機序のひとつとしてスタチンがコレステロール生合成過程の中間代謝産物であるRhoキナーゼ(ROCK)を抑制したことが考えられた。今回このRhoキナーゼ阻害薬のファスジルが蘇生後に脳保護に働くかを検証したが、ファスジルは用量依存的に生存率を下げ、RNA解析ではかえって炎症反応を誘導していたため蘇生後のファスジル投与は有効ではないと判断した。

研究成果の概要(英文)：Using a mouse model of cardiac arrest and resuscitation (CPR), we tested whether the Rho kinase inhibitor fasudil could reduce brain tissue damage and brain and lung edema after CPR. Fasudil administration reduced post-CPR survival in a dose-dependent manner. Fasudil 20 mg/kg after CPR reduced cerebral edema 24 hours after resuscitation. However the effect was no longer seen in 48 hours. Each dose did not reduce lung water content. Genetic analysis using RNA sequencing showed that fasudil treatment caused vascular endothelial damage, promoted cell migration, disrupted the extracellular matrix, produced hydrogen peroxide, activated the inflammatory cytokine IL-17, promoted tumor necrosis factor TNF, inhibited activin suppression of activin, and generally increased the expression of genes that induce inflammation. Fasudil administration was not found to reduce post-resuscitation syndrome.

研究分野：麻酔・蘇生学

キーワード：蘇生後症候群 脳浮腫 肺浮腫 心肺蘇生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心肺停止・蘇生後に生じる低酸素脳症や脳浮腫の薬物治療は確立されていない。申請者の先行研究(動物実験)では HMG-CoA 還元酵素阻害剤であるスタチンのうち脂溶性のタイプが脳障害を軽減した。その機序のひとつとしてスタチンがコレステロール生成過程の中間代謝産物である Rho キナーゼ (ROCK) を抑制したことが考えられた。ROCK は、脳と骨格筋に強く発現し血管攣縮、細胞増殖・遊走、アポトーシス誘導を制御する酵素である。本研究の目的は心肺停止・蘇生後の Rho キナーゼ阻害薬のファスジルが脳保護に働くかを検証した。

2. 研究の目的

マウス心肺停止モデルを用い7分間の心停止の後、蘇生処置を行った。これを全身臓器の虚血再灌流障害モデルとして利用した。蘇生後にファスジルを静脈内投与し脳の組織障害や、脳と肺の水分量をそれぞれ計測し浮腫軽減効果を調べた。

3. 研究の方法

マウス心停止・蘇生モデル

マウス(オス、10 - 16 週、体重 25 - 35 g、C57bl/6) にイソフルレン 2% で全身麻酔後に気管挿管し人工換気を開始。右内頸静脈から PE-10 カテーテルを挿入した。左側頭筋内に温度測定のプロベを挿入、心電図、直腸温計を装着。酸素、空気、イソフルレンで人工換気し、10 分間の安定状態を保った後、中心静脈から塩化カリウム (0.05ml 0.5M) を注入し心停止を誘発した(心電図、動脈圧の低下で確認)。心停止時間は7分とした。7分後、純酸素で人工呼吸を再開、エピネフリン 0.5ml (16 µg/ml) を30秒間で中心静脈から投与、1分間に約300回の心臓マッサージを開始した。通常は蘇生開始後180秒以内に自己心拍が再開する。蘇生後30分間観察し、1分間に30回以上の自発呼吸を確認したところでケージに戻した。処置中は側頭筋温、直腸温を連続的にモニターした。蘇生30分後にファスジルを各濃度で内頸静脈から投与。脳と肺の水分量は蘇生24時間、48時間後に wet-to-dry 法で測定しコントロール群と比較した。脳の組織障害の程度は HE 染色を用いて評価し、海馬と線条体において蘇生4日後、7日後に測定しコントロール群と比較した。次世代シーケンサーを用いた RNA 解析では蘇生24時間後の脳の海馬組織を採取し 80 °C で冷凍保存した検体を用いた。

4. 研究成果

ファスジルの至適投与量を探るために生理食塩水のコントロール群とファスジル各投与量(10mg、20mg、40mg)を蘇生30分後に静脈内投与し、生存率を調べた。

【結果】

各群で心肺蘇生に関するパラメーター(蘇生時間、アドレナリン投与量、蘇生後から自発呼吸が出現するまでの時間)には有意差がなかった(表1)。

コントロール群、ファスジル投与群ともに蘇生に成功したマウスは24時間後、全例生存していた。蘇生48時間後ではコントロール群とファスジル10mg/kg投与群では90%の生存率であったがファスジル20mg/kg投与群で70%、ファスジル40mg/kg投与群で33%の生存率と有意に低下した(図1)。特にファスジル20、40mg/kg群では蘇生48時間以降に活気が悪くなり飲水、食事が摂取できず死亡する例が散見されたため、観察期間を48時間までと設定して投与量40mg/kg群は生存率が低いため観察対象から除外した。

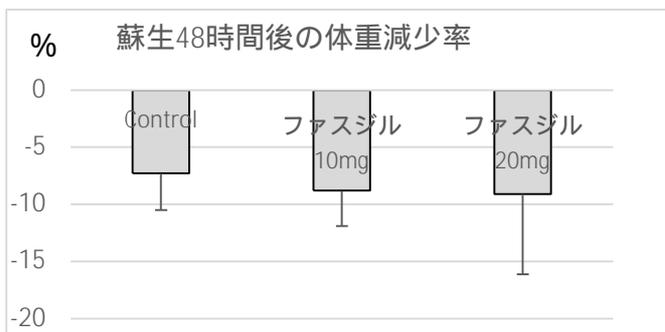
表1. Summary of physiologic variables (Mean ± SD)

	Control	Fasudil 10mg	Fasudil 20mg	Fasudil 40mg
心肺蘇生時間 (秒)	85 ± 21	76 ± 17	83 ± 26	79 ± 21
アドレナリン投与量 (µg)	8.3 ± 0.8	7.7 ± 0.6	8.3 ± 0.5	8.2 ± 0.5
自発呼吸出現時間 (分)	14.6 ± 1.7	16.1 ± 4.6	13.7 ± 2.8	14.9 ± 3.2

生存率：蘇生48時間後の生存率はコントロール群で90%、ファスジル10mg/kg群で90%、ファスジル20mg/kg群で70%、ファスジル40mg/kg群で50%と低下した。

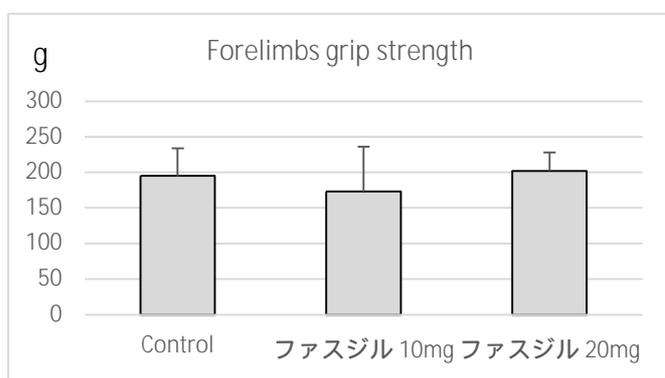
体重減少率： 蘇生 48 時間後の体重減少率はコントロール群で $-7.3 \pm 3.2\%$ 、ファスジル 10mg/kg 群で $-8.8 \pm 3.1\%$ 、ファスジル 20mg/kg 群で $-9.1 \pm 7.0\%$ と各群において有意差はなかった（図 1）。

図 1 体重減少率



握力測定： 活動量の指標であるマウス前肢の握力測定（GPM-100B, MELQUEST）ではコントロール群で $195 \pm 39\text{ g}$ 、ファスジル 10mg/kg 群で $173 \pm 63\text{ g}$ 、ファスジル 20mg/kg 群で $202 \pm 26\text{ g}$ と各群において有意差はなかった。

図 2 マウス前肢握力測定



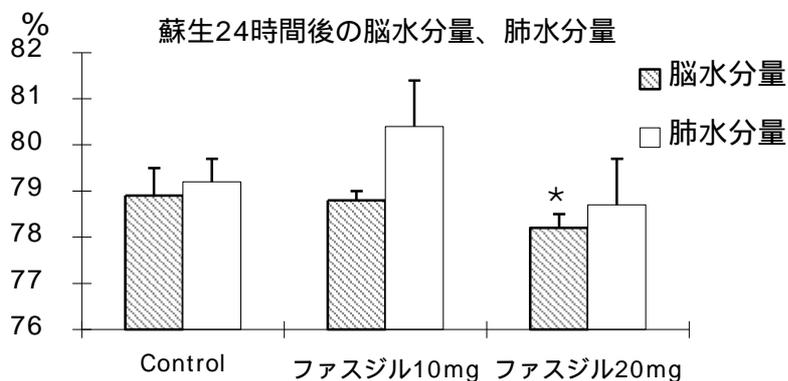
【脳浮腫、肺浮腫の結果】

ファスジル投与によって蘇生後の脳浮腫、肺の浮腫が軽減できるか調べた。我々のマウス心停止モデルでは脳浮腫のピークは蘇生 24 時間後に見られたため、各臓器の水分量の測定を 24 時間と 48 時間後に行った。

【結果】

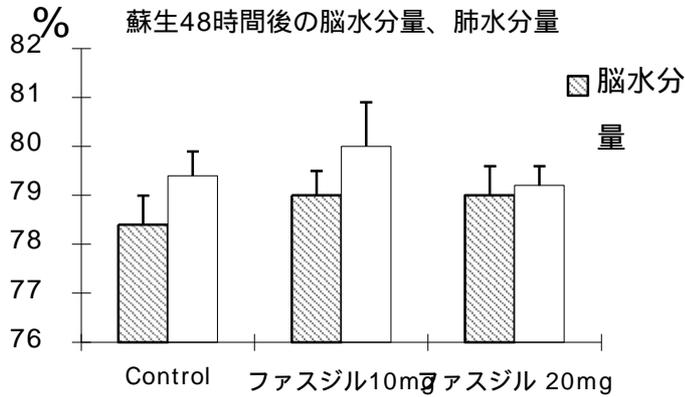
蘇生 24 時間後の脳と肺の水分量： ファスジル 10mg/kg 投与群では脳と肺の水分量はコントロール群と有意差がなかった。ファスジル 20mg/kg 投与群では脳の水分量はコントロール群より有意に減少した（図 3）。

図 3



蘇生 48 時間後の脳と肺の水分量： コントロール群と比較して、ファスジル 10mg/kg 投与群、ファスジル 20mg/kg 投与群ともに脳と肺の水分量を減少させることはなかった（図 4）。

図 4



ファスジル 20mg/kg 投与群では蘇生 24 時間後の脳浮腫は軽減されたが、48 時間後では差がなくなっていた。さらに 20mg/kg 投与群のマウスは蘇生 48 時間以降は活気がなくなっていく生存率も下がってくるため、投与量を 10mg/kg に設定して、中長期の脳の組織障害の程度を調べた。蘇生 4 日後と 7 日後の脳組織、海馬 CA1 領域と線条体をホルマリンで灌流固定後に HE 染色を用いて細胞障害の程度を評価した。

【脳の組織障害の結果】

蘇生 4 日後の脳組織障害は海馬 CA1 領域でコントロール群 $10 \pm 18\%$ 、ファスジル群 $17 \pm 8\%$ と有意差なく、同様に線条体でもコントロール群 $18 \pm 21\%$ 、ファスジル群 $19 \pm 6\%$ で有意差がなかった (図 5)。蘇生 7 日後の脳組織障害は海馬でコントロール群 $15 \pm 10\%$ 、ファスジル群 $18 \pm 12\%$ と有意差なく、同様に線条体でもコントロール群 $22 \pm 16\%$ 、ファスジル群 $24 \pm 10\%$ で有意差がなかった (図 5)。マウス心停止モデルにおいて蘇生後のファスジル投与は短期、長期ともに脳の組織障害を改善することはなかった。

図 5

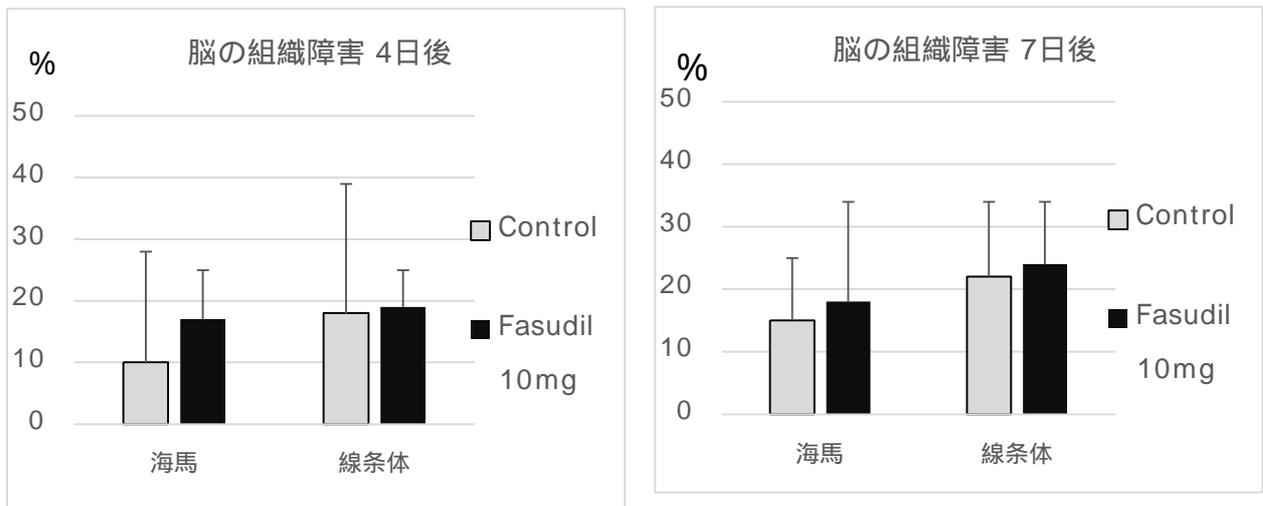
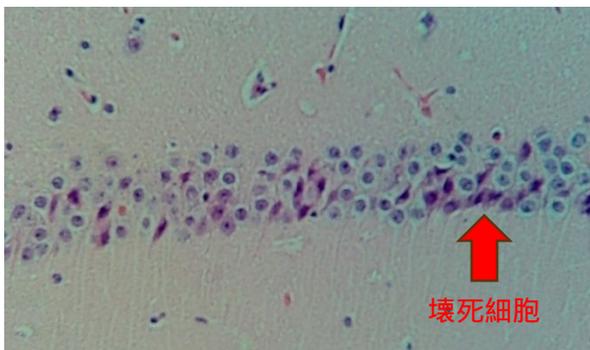
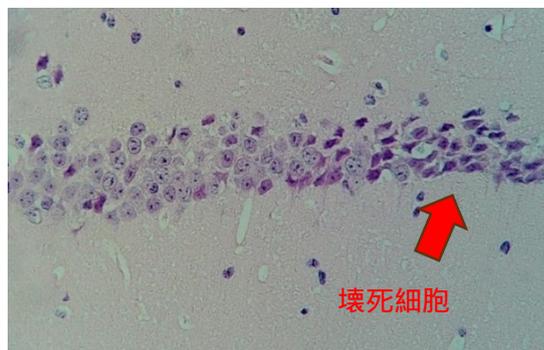


図 6 代表的な組織画像

蘇生 4 日後 海馬 CA1 コントロール群



蘇生 4 日後 海馬 CA1 ファスジル群



今までの結果からマウス蘇生後のファスジル投与が 20mg/kg 以上では 48 時間以降に生存率が低くなる事、ファスジル投与が 10mg/kg では蘇生後に脳組織障害、脳浮腫や肺浮腫の軽減が観察されなかった。

ファスジルの有効性が確認できなかったため、次にファスジル投与が蘇生後の脳でどのような RNA の発現を促進するか調べた。蘇生後にファスジル 10mg/kg 投与して 24 時間後の脳の海馬組織を抽出し、次世代シーケンサーを用いて網羅的に RNA を解析した (図 7)。

図 7 発現が増加した遺伝子

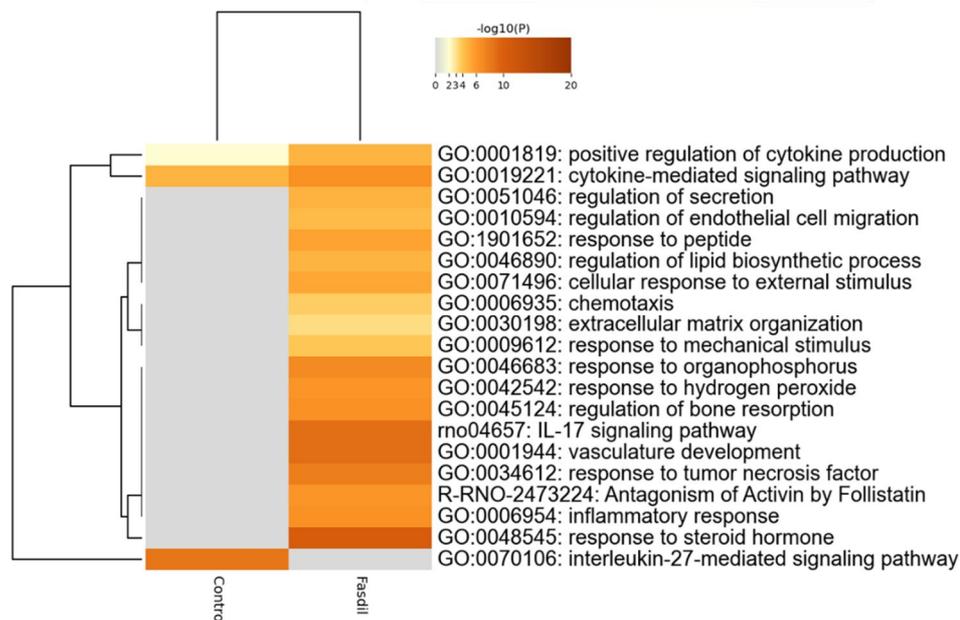
Control 1&2: 生理食塩水
Drug 1&2: ファスジル 10mg/kg

RNA の発現が対照群より 2 倍以上増加した遺伝子をヒートマップで示した図である。

この遺伝子群から関連のある経路を遺伝子オントロジー (データベース) で調べた。

図 8 増加した遺伝子に関連する因子

図 8 から蘇生後は両群ともにサイトカイン産生に関連する遺伝子の発現が増えた。ファスジル投与群ではコントロール群より炎症に関与する遺伝子の発現が増えた。具体的には血管内皮障害、細胞の遊走を促進、細胞外マトリックスの障害、過酸化水素の生成、炎症性サイトカインの IL-17 の活性化、腫瘍壊死因子 TNF の促進、アクチピンの抑制など総じて炎症を惹起する遺伝子発現が増加していた。細胞保護に関連する遺伝子で目立ったものを検出することが出来なかった。一方コントロール群では免疫抑制作用のある IL27 がファスジル群より増加していた。

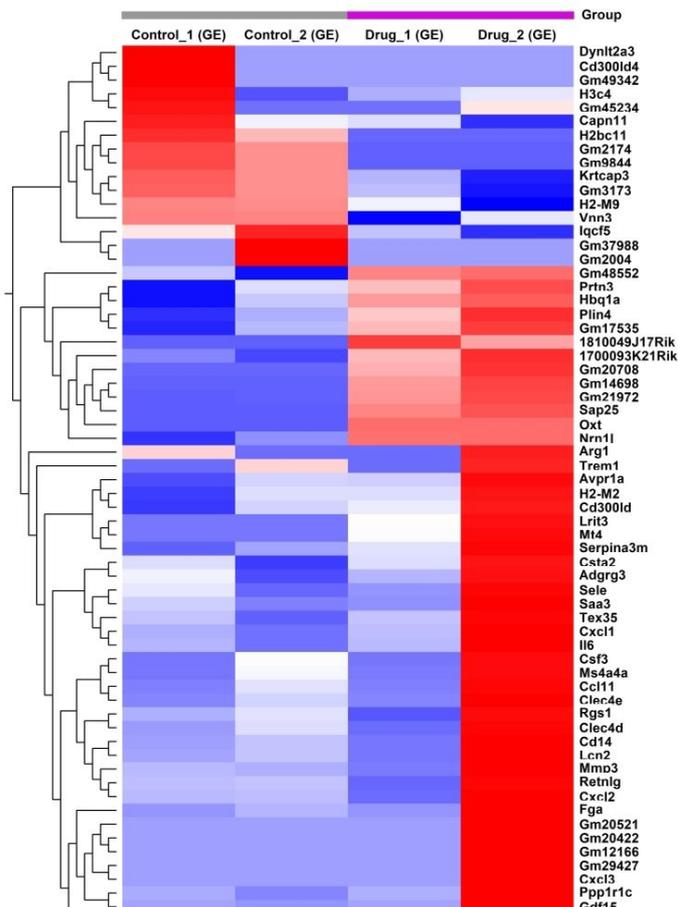


この解析はあくまでコントロール群とファスジル投与群での比較であり、我々の過去の RNA シーケンスの結果から蘇生後のマウスは心停止・蘇生なしのシャム手術群より IL17、NF、MAPK シグナル、TNF の発現が増加し炎症反応、アポトーシス誘導因子が活性化されていた。

これらの結果から蘇生後のファスジル投与は量が多くなるほど炎症反応が増えてしまい、生存率が低下したと考えられた。

【結論】

マウス心停止モデルにおいて、蘇生後の Rho キナーゼ阻害薬は虚血再灌流障害や脳浮腫などの蘇生後症候群を軽減する作用は認められなかった。



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