

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09345

研究課題名（和文）新規治療法開発を目指したクモ膜下出血後白質神経傷害の解明

研究課題名（英文）Elucidation of white matter nerve injury after subarachnoid hemorrhage for the development of novel treatment methods

研究代表者

岩間 亨（Iwama, Toru）

岐阜大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20303498

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）：クモ膜下出血（SAH）臨床例において、慢性期の白質傷害は臨床的に軽度の後遺症を呈する群で顕著であり、SAH後の高次機能低下、認知機能低下との関連性が示唆された。マウスSAHモデルを用いた基礎実験では、SAH後超急性期の微小血管障害が白質傷害の端緒になっていると仮定し、電子顕微鏡での微小血管の微細構造観察を行い、SAH発症後超早期の微小血管構造変化の確認を進めている。In vitroでの実験系としては、脳白質微小血管の構成因子である内皮細胞、周皮細胞に注目し、SAHを模したストレス環境下細胞間・細胞内シグナル伝達を確認し、薬剤による抑制の可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳白質神経組織は、SAHが引き起こす一次脳損傷の原因とされる様々な病的ストレスに対し脆弱であり、一次脳損傷の最も起こりやすい組織と考えられている。このことから、白質神経傷害は、SAHによる一次脳損傷についての研究および治療ターゲットとして極めて有望である。本研究結果からは、SAHにおいて、超早期の微小血管障害と、微小血管における構成細胞間の連関が、急性期から慢性期にかけての脳白質傷害の発生および進展の主要な因子であることが示唆された。この成果は、現在有効な治療法のない、SAH後の一次神経傷害に対する新たな治療法の開発に寄与するものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：We investigated the mechanisms of white matter injury (WMI) after subarachnoid hemorrhage (SAH) in clinical and basic research settings. In clinical cases of SAH, WMI in the chronic phase is observed and is more prominent in the group with mild sequelae, suggesting a relationship between the WMI and cognitive decline after the SAH. In the experiments using a SAH mouse model demonstrated that microvascular injury in the hyperacute phase after SAH may initiate, and exacerbate the WMI. In addition, microstructural changes in the white matter microvasculature in hyperacute phase after SAH has been confirmed by electron microscopy. In vitro experiments have focused on endothelial cells and pericytes, which are components of cerebral white matter microvasculature, and confirmed intercellular cross-talk and intracellular signaling between these cells under the stress conditions mimicking SAH. These results suggested the potential novel drug therapy for the prevention of WMI after SAH.

研究分野：脳神経外科学分野

キーワード：クモ膜下出血（SAH） 白質傷害 マウスSAHモデル

1. 研究開始当初の背景

虚血性脳卒中(脳梗塞)と比較し、出血性脳卒中(クモ膜下出血: SAH、および脳内出血)の治療の進歩はやや停滞している感がある。特に脳神経外科における代表疾患である SAH においては、死亡率が極めて高いにも関わらず、原因となった破裂脳動脈瘤の再出血予防措置を除き、SAH そのものによる一次脳損傷に対する臨床的に有効な治療法は皆無である。SAH 後の一次脳損傷と生命、機能予後には密接な関係があることは明らかであるが、基礎研究の領域においても、虚血性脳卒中と比較し一次脳損傷の発生、進展機序の解明は遅れている。虚血性脳卒中においては、近年ヒト大脳組織の約 50%を占める白質に対する傷害機序が特に注目を集めており、特に白質神経傷害が卒中後の認知機能低下を引き起こす主たる原因として提唱されている。出血性脳卒中においても白質傷害に対する基礎研究が重要かつ優先すべき課題であるということは研究者間における共通の認識となっているが(National Institute of Neurological Disorders and Stroke Workshop on ICH: 2005) SAH をはじめ出血性脳卒中での白質における早期脳損傷に対する研究は国際的にもほとんど進んでいないのが現状である。一方、神経組織の中でも白質組織(オリゴデンドロサイト、軸索、髄鞘)は、SAH が引き起こす一次脳損傷の原因とされる様々な病的ストレスに対し脆弱であり、他の脳卒中病型においても一次脳損傷の最も起こりやすい組織と考えられている。このことから、白質神経傷害は、SAH による一次脳損傷についての研究および治療ターゲットとして極めて有望と推定される。

2. 研究の目的

本研究は、実臨床における後白質傷害の可視化は可能か、また臨床症状(特に高次脳機能障害、認知機能障害と関連して)と比較しどのような特徴があるのか。臨床例において、白質傷害のバイオマーカーは見出せるのか、また、バイオマーカー蛋白自体の白質傷害への関与はどのようなものか。バイオマーカー蛋白の制御により、あるいは薬剤により白質傷害の軽減は可能か。以上の3点に対して、臨床例および動物実験モデル、細胞実験を含む基礎実験系を用いて検討することを目的とした。

3. 研究の方法

実臨床例における SAH 後脳白質傷害の可視化: 当施設で治療を行った SAH 症例のうち、原因となった破裂脳動脈瘤患者に対しコイル塞栓術での治療が行われた連続症例を対象とし、発症後亜急性期(3週間後)および慢性期(6ヶ月後)で MRI を行い、脳梁部の厚みを測定することで白質萎縮の程度を評価した。また、臨床症候との相関を検討した。

マウス血管内穿孔による SAH モデルを用い、SAH 後超急性期の脳白質微小血管内皮における構造変化が白質傷害の端緒になっていると仮定し、SAH 後急性期(2, 6, 24 時間後)の脳白質サンプルを採取し、電子顕微鏡を用いた観察を行い、SAH 後超早期の微小血管内皮構造変化を示す世界初の報告になることが期待される。

*In vitro*での実験系としては、血管平滑筋を欠く脳白質微小血管において、収縮・拡張の主たる機能を担っていると考えられる周皮細胞に着目した。脳周皮細胞株に SAH を模したストレス(低酸素・低グルコース負荷、トロンピン負荷)を加えることで、早期脳損傷や微小血管攣縮を引き起こすと考えられる収縮の発生と細胞内シグナル、薬剤による抑制の可能性について検討した。

4. 研究成果

2014 年より当科で治療を行った SAH 症例のうち、コイル塞栓術で破裂脳動脈瘤の根治を行い、かつ日常生活に復帰し得た連続 15 症例が対象となった。慢性期の白質傷害の指標として、脳梁膝部の厚みを測定した。SAH 発症後慢性期の脳梁膝部の厚みは亜急性期と比較し有意に減少しており、白質神経組織の萎縮と考えられた(8.2vs. 8.9mm; $p < 0.05$)。SAH 軽症例(World Federation of Neurological Surgeons: WFNS 分類 1, 2) 後方循環脳動脈瘤症例ではこの期間で有意な白質神経組織萎縮が見られなかったのに対して、重症例(WFNS 分類 4, 5) および前方循環脳動脈瘤症例において有意な白質神経組織の萎縮が見られた(それぞれ 8.00 vs. 8.80mm; $p < 0.05$, 7.46 vs. 8.89mm; $p < 0.01$)。また、軽度後遺症例(発症 3ヶ月後の modified Rankin Scale 1 または 2: 日常生活は自立可能であるが、軽度の後遺症がある状態)において白質神経組織萎縮は顕著であった(7.3 vs. 9.2mm; $p < 0.01$)。臨床例において、SAH 後慢性期の白質神経萎縮が確認され、重症例、前方循環脳動脈瘤症例でより有意な萎縮が見られることが示された。また、日常生活復帰例に残存する軽度後遺症に白質神経傷害が関与している可能性が示唆された。

マウス SAH モデルにおいては、SAH 後超急性期(発症 2 時間後)より白質微小血管の病的変化が確認された。これは神経傷害の惹起に先行して起こる変化と考えられ、現在微細構造変化の定量的解析と評価を進めている途上である。微細構造の解析に成功すれば、SAH 後超早期の微小血管構造変化が神経傷害に先行して発生し、また神経傷害を増悪させる因子であるという仮説を実証する、新たな知見を発表できるものと考えられる。

In vitro の実験系として、ヒト血管周皮細胞を通常条件で培養後、2時間の低酸素条件下での培養（SAH 早期の主要病態の一つと考えられる低酸素状態モデル）を行った。細胞死アッセイでは通常条件下での培養と比較し、有意な細胞死が見られないことを確認した。この条件下で、周皮細胞の収縮、弛緩を担うメカニズムの起点であると考えられる X 受容体の発現の亢進がウエスタンブロット法にて確認された。また、ヒト脳微小血管内皮細胞にも同様の負荷を加えると、タンパク X の発現が亢進することを同じくウエスタンブロット法により確認した。これらの結果は、SAH による脳白質微小血管における内皮細胞-血管周皮細胞のインタラクションが X-X 受容体を介して行われること、X-X 受容体を介する下流信号の阻害による周皮細胞収縮抑制の可能性があることを示唆しており、候補薬 A を用いて更なる検討を進めている。

以上より、実験系の解析、論文執筆と公表準備を現在進めている途中である。これらの成果は今後随時国内、国際学会および国際誌にて公表予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Matsubara Hirofumi, Imai Takahiko, Tsuji Shohei, Oka Natsumi, Ohba Takuya, Yamada Tetsuya, Egashira Yusuke, Nakamura Shinsuke, Shimazawa Masamitsu, Iwama Toru, Hara Hideaki	4. 巻 30
2. 論文標題 Involvement of Cerebral Blood Flow on Neurological and Behavioral Functions after Subarachnoid Hemorrhage in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases	6. 最初と最後の頁 105952 ~ 105952
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2021.105952	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 Matsubara Hirofumi, Imai Takahiko, Tsuji Shohei, Oka Natsumi, Egashira Yusuke, Enomoto Yukiko, Nakayama Noriyuki, Nakamura Shinsuke, Shimazawa Masamitsu, Iwama Toru, Hara Hideaki	4. 巻 148
2. 論文標題 Nafamostat protects against early brain injury after subarachnoid hemorrhage in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 65 ~ 72
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2021.10.007	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 江頭裕介, 岩間 亨	4. 発行年 2024年
2. 出版社 株式会社南江堂	5. 総ページ数 -
3. 書名 脳神経疾患 最新の治療 2024-2026	

〔産業財産権〕

〔その他〕

岐阜大学医学部脳神経外科
<https://www.med.gifu-u.ac.jp/neurosurgery/index.html>

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	江頭 裕介 (EGASHIRA Yusuke) (50547677)	岐阜大学・医学部附属病院・講師 (13701)	
研究分担者	中山 則之 (NAKAYAMA Noriyuki) (30444277)	岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授 (13701)	
研究分担者	榎本 由貴子 (ENOMOTO Yukiko) (20377659)	岐阜大学・医学部附属病院・講師 (13701)	
研究分担者	松原 博文 (MATSUBARA Hirofumi) (00800244)	岐阜大学・医学部附属病院・助教 (13701)	
研究分担者	庄田 健二 (SHODA Kenji) (00866981)	岐阜大学・医学部附属病院・助教 (13701)	

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