

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09352

研究課題名(和文) 線維芽細胞に着目したくも膜炎の分子機構の解明と新たな脳保護薬の開発

研究課題名(英文) The molecular mechanism of arachnoid membrane focusing on inflammation and fibrosis

研究代表者

三上 毅 (Takeshi, Mikami)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30372816

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：慢性脳虚血性疾患と非虚血性疾患で得られた前頭葉皮質上のくも膜を解析した。くも膜の厚さは年齢が影響しており、厚いくも膜では内層に線維芽細胞やマクロファージが増勢し、VEGF やTGFなどの炎症マーカーが増加していた。また、くも膜内の血管新生の存在を確認した。虚血性疾患において、強い炎症反応が認められており、疾患による影響もみられることがわかった。また、実験動物において、両側総頸動脈閉塞を作成し、てんかん波やパワースペクトラム解析を行った。痙攣発生には、虚血が影響を及ぼしていることを見出した。再灌流障害における痙攣発作には、microbleedsが強く影響していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、脳小血管病の発現に脳内の老廃物を排出するglymphatic systemが関係しているという報告も散見されており、認知症との関連が示唆されている。本研究は、脳虚血に対してくも膜の炎症や線維化制御に着目したはじめての研究であり、微弱な頭蓋内慢性炎症がもたらすくも膜の炎症や線維化が脳小血管病や頭蓋内血管病変を通して脳機能に及ぼす影響を解明することにより貢献した。このメカニズムを通じた治療が実現することにより、拡大増加する医療費や介護負担の縮小をめざすことができ、今後の超高齢社会への対応策となると考えている。

研究成果の概要(英文)：The arachnoid membrane on the frontal cortex obtained from patients with chronic cerebral ischemic disease and non-ischemic disease were analyzed. The thickness of the arachnoid membrane was influenced by age. In thicker membranes, fibroblasts and macrophages were increased in the inner layer, along with an increase in inflammatory markers such as VEGF and TGF. Additionally, the presence of neovascularization within the arachnoid membrane was confirmed. In ischemic diseases, a strong inflammatory response was observed, indicating the impact of the disease. Furthermore, in experimental animals, bilateral occlusion of the common carotid arteries was performed, and seizure waves and power spectrum analysis were conducted. It was discovered that ischemia has an impact on the occurrence of seizures. In seizures associated with reperfusion injury, it was found that microbleeds have a significant influence.

研究分野：neurosurgery

キーワード：arachnoid membrane ischemia inflammation seizure reperfusion

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血管の慢性炎症は動脈硬化の主要要因の一つであり、血栓形成や血管閉塞を促進し脳梗塞をきたすのみならず、慢性的には認知機能に強く影響を及ぼしている。従って、慢性炎症をコントロールしていくことにより、脳血管障害治療や認知症治療に繋がる可能性を持っている。私たちは、加齢変化や虚血変化において、脳を覆うくも膜にも微弱な炎症性変化と線維化が起きていることを確認してきた。しかしながら、このくも膜の炎症性変化や線維化が、どのように疾患や脳機能に関与しているか未だ明らかになっていない。本研究では、脳虚血におけるくも膜内の線維芽細胞や間葉系幹細胞に着目し、細胞の分化制御の観点から認知機能への影響を解明することを目的としている。脳虚血の神経活動を捉えると併に、くも膜の線維化に寄与する病態を解明することにより、炎症や線維化のコントロールを介した新規治療法への可能性を開発することを目的とした。

2. 研究の目的

平成 30 年の「人口動態統計の概要」によると、日本人の脳血管障害による死亡数は、全体の 7.9% を占め、全死因の中でも 4 番目である。また、脳血管障害にかかる医療費は約 1.8 兆円であり、介護費も 2.5 兆円といわれ、大きな問題である。虚血性脳血管障害は、脳梗塞発症に伴う神経学的局所症状のみならず、慢性的な低灌流による認知症を引き起こす。この脳血管性認知症はアルツハイマー病の次に多く、認知症全体の約 20% を占める。近年のアルツハイマー型認知症に対する薬物療法の進歩は著しいが、脳血管性認知症に対する治療薬の開発は進んでいない。脳血管性認知症の発症を抑制するためには、危険因子となる高血圧、糖尿病、心疾患などの全身合併症をコントロールしていくことが重要であるが、これらの病態をコントロールしても脳血管性認知症に対する効果は限定的である。病態生理学的にみても脳血管障害は多種多様であり、別の視点からのアプローチによる脳機能改善が求められている。我々は、開頭術の際に、虚血性脳血管障害のくも膜の色調が他と異なることに気がついた。色調の異なるくも膜では慢性炎症が起こっていることを確認している。そのため、我々は、脳を取り巻く「くも膜の炎症や線維化」が脳血管障害や認知機能、その他の神経兆候に及ぼす影響を研究目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒトくも膜の炎症マーカーの検索

慢性脳虚血性疾患に対する開頭血行再建術で得られたくも膜を使用した。対象群として開頭による非虚血性疾患で得られた前頭葉皮質血管 (M4) 直上のくも膜を使用した。くも膜の厚さ、年齢、性別、疾患、喫煙、血圧、コレステロール値、糖代謝異常、動脈硬化指数などの臨床的要因と線維芽細胞増勢、CD68⁺細胞、CD86⁺細胞、CD206⁺細胞を免疫染色によって測定し、さらに TGF、TNF、VEGF の mRNA expression をリアルタイム PCR 法で測定した。

(2) 両側総頸動脈閉塞による認知症モデルにおける痙攣発作と組織変化

8 週の Wistar rat において、両側総頸動脈閉塞モデルを作成する。これは従来、慢性脳虚血をきたすモデルである。この脳虚血モデルにおいて、頸動脈閉塞後に実験用 7.0T MRI で脳小血管病性変化や炎症変化を計測する目的であったが、閉塞急性期に痙攣発作を頻発することを見出したため、この影響が炎症や脳機能障害にどの程度あるかを捉えるため両側頸動脈閉塞後間目に実験用 7.0T MRI で脳虚血性変化や脳小血管病性変化を計測した。また、電気生理学的な影響を測定するため、Pinnacle Technology 社の大脳皮質脳波測定システムで、てんかん波や高次脳機能を反映する波や波などの高周波帯域のパワースペクトラム解析を行った。

(3) 再灌流モデルにおける痙攣発作と画像変化

8 週の Wistar rat において、両側総頸動脈閉塞後に閉塞を解除し、再灌流モデルを作成する。この脳虚血再灌流モデルにおいて、頸動脈閉塞後に実験用 7.0T MRI で脳小血管病性変化や炎症変化と神経学的兆候の 1 つである痙攣発作との関係を解析した。

4. 研究成果

(1) ヒトくも膜の炎症マーカーの検索

くも膜の厚さは年齢や疾患が影響しており、厚いくも膜では内層に線維芽細胞やマクロファージが増勢し、VEGF や TGF などの炎症マーカーが増加していた。また、くも膜内の線維化や慢性炎症が確認されていることを基に、免疫組織学的に線維化に関わる炎症マーカーや間葉系幹細胞の存在、血管新生の有無を確認した。虚血性疾患において、強い炎症反応が認められており、疾患による影響もみられることがわかった。

(Suzuki H, Mikami T et al. BCM neurology, 2021)

(2) 両側総頸動脈閉塞による認知症モデルにおける痙攣発作と組織変化

Wistar rat は、SD rat と比較して、有意に死亡率、痙攣発作の出現率、非てんかん性痙攣発作

出現率、モニタリング上でのてんかん性放電出現率が高かった。MRI 所見からは、両側頸動脈結紮後はSD rat よりも Wistar rat において ADC 値が低く、グルタミン、グルタミン酸レベルが低く、乳酸値が高かった。Power spectral 解析からは、Wistar rat において、より低周波帯域（デルタ、シータ帯域）の相対値が高かった。

(Hirano T, Mikami T et al. Neurol Med Chir (Tokyo),2021)

(3) 再灌流モデルにおける痙攣発作と画像変化

再灌流障害後には、脳虚血後と異なり微小な脳出血が生じることを見出した（下図上段）。この微小脳出血が痙攣発作に及ぼす影響について多変量解析を行った。24 時間以内の死亡に関わる因子(Odds ratio (95%CI), P-value)は、痙攣発作出現(106.572(9.302-1220.935), <0.001)、線条体の ADC 値(0.396(0.209-0.750), 0.004)、閉塞か再灌流(0.056(0.005-0.579), 0.017)であった。また、痙攣発作出現に関わる因子は、MRI 上検出された微小脳出血数(2.072(1.398-3.073), <0.001)と閉塞か再灌流(0.007(0.001-0.085), <0.001)であった。

(Saito T, Mikami T et al. Neurol Med Chir (Tokyo),2023)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 0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 Suzuki Hime, Mikami Takeshi, Iwahara Naotoshi, Akiyama Yukinori, Wanibuchi Masahiko, Komatsu Katsuya, Yokoyama Rintaro, Hirano Tsukasa, Hosoda Ryusuke, Horio Yoshiyuki, Kuno Atsushi, Mikuni Nobuhiro	4. 巻 21
2. 論文標題 Aging-associated inflammation and fibrosis in arachnoid membrane	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Neurology	6. 最初と最後の頁 2-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12883-021-02202-y	査読の有無 無
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 HIRANO Tsukasa, MIKAMI Takeshi, YAMADA Shoto, NAGAHAMA Hiroshi, ENATSU Rei, OKAWA Satoshi, AKIYAMA Yukinori, MIKUNI Nobuhiro	4. 巻 61
2. 論文標題 Pitfalls of Commonly Used Ischemic and Dementia Models Due to Early Seizure by Carotid Ligation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurologia medico-chirurgica	6. 最初と最後の頁 312 ~ 320
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2176/nmc.oa.2020-0365	査読の有無 無
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 SAITO Takuro, MIKAMI Takeshi, HIRANO Tsukasa, NAGAHAMA Hiroshi, ENATSU Rei, KOMATSU Katsuya, OKAWA Satoshi, AKIYAMA Yukinori, MIKUNI Nobuhiro	4. 巻 63
2. 論文標題 Microbleeds Due to Reperfusion Enhance Early Seizures after Carotid Ligation in a Rat Ischemic Model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neurologia medico-chirurgica	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2176/jns-nmc.2022-0372	査読の有無 無
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
研究分担者	鈴木 比女 (Suzuki Hime) (30815452)	札幌医科大学・医学部・研究員 (20101)	
研究分担者	秋山 幸功 (Akiyama Yukinori) (50404653)	札幌医科大学・医学部・講師 (20101)	
研究分担者	三國 信啓 (Mikuni Nobuhiro) (60314217)	札幌医科大学・医学部・教授 (20101)	
研究分担者	小松 克也 (Komatsu Katsuya) (60749498)	札幌医科大学・医学部・助教 (20101)	
研究分担者	平野 司 (Hirano Tsukasa) (90867483)	札幌医科大学・医学部・研究員 (20101)	

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