

令和 5 年 4 月 21 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17963

研究課題名（和文）てんかんに着目したくも膜下出血後早期脳損傷の病態解明

研究課題名（英文）Elucidation of the pathology of early brain injury after subarachnoid hemorrhage focusing on epilepsy

研究代表者

川北 文博（Kawakita, Fumihito）

三重大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：90608952

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）：最近、非痙攣性発作がくも膜下出血(SAH)の予後不良因子として知られるようになってきた。基礎研究では早期脳損傷と呼ばれるSAH特有の脳障害が予後不良因子として重要視されている。我々は最近、マトリセルラー蛋白の1つであるテネイシンC (TNC)がSAH後の脳において高発現し、神経細胞アポトーシスの原因になることを報告した。神経細胞アポトーシスはSAH後の早期脳損傷においても、てんかん原性獲得過程においても重要と考えられている。そこで本研究では、SAHモデルマウスを用いて、神経細胞アポトーシス、TNCと非痙攣性発作の関係性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はマトリセルラー蛋白の1つであるテネイシンCがてんかん原性獲得において重要な役割を果たす可能性を初めて示した。テネイシンCは病的状態でその発現は誘導され、受容体やサイトカイン、他の細胞外マトリックス蛋白などと反応し、細胞間や、細胞と細胞外マトリックス間の様々な機能を調整することから近年、注目されてきた。テネイシンCを介する新しいてんかん誘発性細胞死のシグナル経路を解明した本研究の成果は、薬剤抵抗性の側頭葉てんかんなど、他原因のてんかん研究にも応用できる可能性があり、てんかん原性獲得やてんかん誘発性細胞死を未然に防ぐ新しい治療法の開発へと発展していく可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Recently, nonconvulsive seizures have become known as a poor prognostic factor for subarachnoid hemorrhage (SAH) after cerebral aneurysmal rupture. In basic research, brain damage peculiar to SAH, called early brain injury, is considered important as a poor prognostic factor. We recently reported that one of the matricellular proteins, tenascin-C (TNC), was highly expressed in the brain after SAH and caused neuronal apoptosis. Neuronal apoptosis is thought to be important both in early brain injury after SAH and in the acquisition of epileptogenicity. In this study, thus we clarified the relationships among neuronal apoptosis, TNC upregulation, and non-convulsive seizures using SAH model mice.

研究分野：脳血管障害

キーワード：くも膜下出血 てんかん 早期脳損傷 神経細胞アポトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

脳動脈瘤破裂によるくも膜下出血(SAH)は現在においても極めて予後不良である。最近の研究では、SAH患者を持続的に脳波(EEG)モニターすると、non-convulsive seizures (NCSz)が7-18%に、non-convulsive status epilepticus (NCSE)が3-13%に生じ、機能的予後不良と関連することが明らかになった(Kondziella, et al. *Neurocrit Care* 22:450-461, 2015)。一方、最新の知見では早期脳損傷と呼ばれる SAH 特有の脳障害の克服こそが予後改善に重要と考えられるようになってきた(Suzuki. *Transl Stroke Res* 6:1-3, 2015)。我々は最近、マトリセルラー蛋白の1つであるテネイシンC (TNC)がSAH後の脳において高発現し、神経細胞のアポトーシスを誘導する可能性を報告した(Shiba, et al. *Transl Stroke Res* 5:238-247, 2014; Liu, et al. *Mol Neurobiol* 55:8346-8354, 2018)。TNCは細胞外マトリックス蛋白の1つであるが、細胞支持組織としての役割はなく、正常状態ではほとんど発現していない。しかし、病的状態では機械的ストレスや酸化ストレス、炎症などにより誘導され、受容体やサイトカイン、他の細胞外マトリックス蛋白などと反応し、細胞間や、細胞と細胞外マトリックス間の様々な機能を調整することから近年、注目されている。神経細胞のアポトーシスはSAH後の早期脳損傷において重要な役割を担っていると考えられているが(Hasegawa, et al. *Stroke* 42:477-483, 2010)、一方でてんかん原性獲得過程においても重要と考えられている(Mercado-Gómez, et al. *Epilepsy Res* 108:1694-704, 2014)。そこで我々はSAH後にTNCが誘導され、早期脳損傷が生じ、その結果、てんかん原性獲得に至りNCSzやNCSEが生じるという仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

SAH後の早期脳損傷の病態を解明し新たな治療法を開発することは、SAH患者の予後を改善する上で極めて重要であることは近年、繰り返し強調されている(Suzuki. *Transl Stroke Res* 6:1-3, 2015)。しかし、早期脳損傷に関する研究は始まったばかりで、その病態は未だ殆ど明らかになっていない。最近では、SAH患者にNCSzやNCSEが稀ならず生じ、予後不良の原因になることが明らかになったが(Kondziella, et al. *Neurocrit Care* 22:450-461, 2015)、これらのSAH後てんかんと早期脳損傷の関係はこれまで全く検討されてこなかった。

最近、我々は多面的な作用をもつTNCがSAH後に誘導され、早期脳損傷、特に神経細胞のアポトーシス発生に重要な役割を果たす可能性を報告してきた(Suzuki, et al. *Neural Regen Res* 11:230-231, 2016; Liu, et al. *Mol Neurobiol* 55:8346-8354, 2018)。しかし、SAH後てんかんとTNCの関係は我々が知る限り検討されたことは無い。TNCはラットのてんかん原性神経細胞障害部位にも発現することから(Mercado-Gómez, et al. *Epilepsy Res* 108:1694-1704, 2014)、TNCがSAH後のてんかん原性獲得あるいはてんかん誘発性神経細胞死に関与している可能性は十分にある。そこで応募者は、SAH後にTNCが誘導され、早期脳損傷、特に神経細胞アポトーシスの原因となり、その結果、てんかん原性獲得に至りNCSzやNCSEが生じると考えた。また、NCSzやNCSEが原因となり、TNCがさらに誘導されることで早期脳損傷が増悪する可能性を考えた。本研究ではこれらの仮説を証明することを目的とし、仮説通りの結果が得られた場合は、さらにTNCが神経細胞アポトーシス、NCSzやNCSEを引き起こすシグナル経路を解明する。本研究ではSAH後の早期脳損傷とてんかんを結びつける画期的な研究成果が得られる可能性があり、今後のSAHの予後改善を目指した新たな治療法の開発への発展が期待できる。また難治性てんかんの病態解明にも大いに貢献できると考える。

## 3. 研究の方法

TNCノックアウトマウスと野生型マウス(メス:20-25g)をそれぞれsham群とSAH群の2群ずつの計4群にランダムに分け、Stroke Therapy Academic Industry Roundtable (STAIR)が提唱する動物実験指針に準じ、評価項目は全て盲検的に検討した(図1:実験1)。TNCノックアウトマウスは既報の方法で作成した(Nishioka, et al. *Am J Physiol* 298:H1072-1078, 2010)。SAHモデルはSAHの急性期モデルとして確立している血管内穿通法により作成し、経頭蓋電極により持続的に脳波をモニターし、TNCノックアウトによりSAH後てんかんの重症度や頻度がどのような影響を受けるか検討した。さらにSAH後24時間後および1週間後に致死率、体重変化率、SAHの重症度、神経症状、血液脳関門(BBB)障害、アポトーシスの程度を2重盲検的に評価し、TNC発現抑制によりどのような影響を受けるか評価した。また、野生型マウスに抗てんかん薬を投与し、SAH後てんかんを抑制することで、TNC誘導および神経細胞のアポトーシス発生が抑制されるか検討した。

次にTNCが神経細胞アポトーシス、NCSzやNCSEを引き起こす分子病態や細胞内情報伝達機構を明らかにするため、関与することが予想される各分子、即ち、Toll様受容体4、インテグリン、上皮成長因子受容体、alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA)型グルタミン酸受容体サブユニット(GluA1、GluA2)、代表的なmitogen-activated protein kinase (MAPキナーゼ)であるextracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2、c-Jun N-terminal kinase (JNK)およびp38、matrix metalloproteinase (MMP)-9、cleaved caspase-3、サイトカイン

ンなどの発現変化を Western blot 法にて評価した。また、各分子の発現細胞を同定するため、神経細胞のマーカーである NeuN、astrocyte のマーカーである glial fibrillary acidic protein、内皮細胞のマーカーである CD34 との多重免疫染色を実施した。

また、TNC が神経細胞アポトーシス、NCSz や NCSE を誘導する分子機構を解明するため、野生型マウス SAH モデルに、発現増加が予想される Toll 様受容体 4 拮抗薬、ERK1/2・JNK・p38 阻害薬などを投与し、神経細胞のアポトーシスが抑制できるか、さらには NCSz や NCSE の発生を抑制できるか検討した。

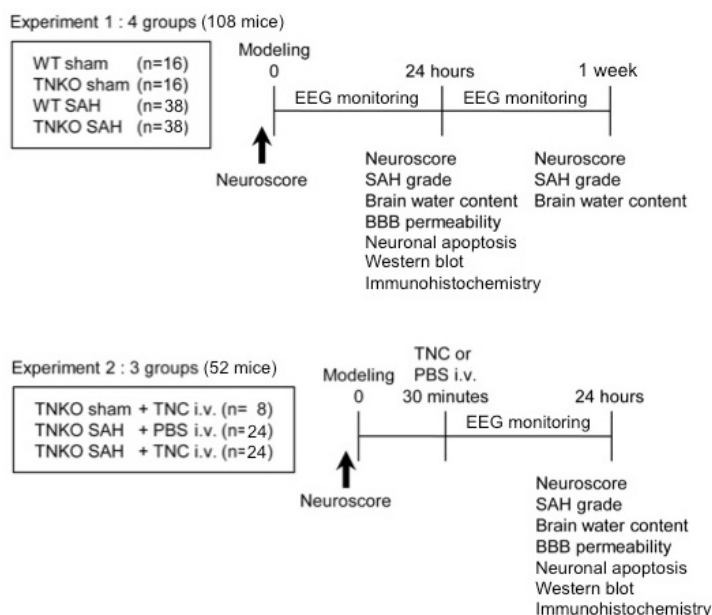


図 1. 実験計画  
WT: 野生型マウス、  
TNKO: TNC ノックアウトマウス、  
PBS: 生理食塩水、  
i. v. : 脳室内投与

TNC ノックアウトマウスでは、野生型マウスに比べ、SAH 後の神経細胞アポトーシス、NCSz や NCSE 発生が抑制されたので、TNC が神経細胞アポトーシス、NCSz や NCSE を誘導するか再確認するため、ヒトグリオーマ細胞から TNC を精製し、マウスの脳室内に定量的に注入することにより神経細胞アポトーシス、NCSz や NCSE を誘発できるか検討した(図 1 : 実験 2)。

#### 4. 研究成果

SAH マウスでは sham 手術マウスに比較して神経所見は有意に悪化した。また SAH マウスではてんかん性放電がみられ、このてんかん性放電は必ずしも痙攣を伴わなかった。

TNC ノックアウトマウスによる検討では、SAH の程度そのものは TNC 発現抑制による影響を受けないことが明らかになった。TNC ノックアウト SAH マウスでは野生型 SAH マウスと比較して有意に神経所見、脳浮腫および神経細胞アポトーシスの程度が軽減した。また Western blot にて SAH 後の大脳では代表的 MAP キナーゼ、MMP-9 や caspase-3 が活性化されるが、TNC のノックアウトによりこれらの活性化が抑制されることが明らかになった。

野生型 SAH マウスに抗てんかん薬である特異的 AMPA 受容体拮抗薬ペランパネル(PER)を投与すると、vehicle 群と比較して SAH の程度には差を認めなかったが、脳波上の棘波の出現頻度は有意に減少した。また sham 手術群と比較して SAH マウスでは有意に神経所見が悪化し、脳浮腫は増悪したが、PER の投与により神経所見、脳浮腫共に有意に改善した。Sham 群に死亡例はなく、SAH+溶媒群、SAH+PER 群のモデル作成後 24 時間以内の死亡率はそれぞれ 21.6%、20.8%であった。生理学的パラメータに群間差はみられず、SAH の重症度は各々の SAH 群で同様であった。24 時間後の神経症状、両側大脳半球及び小脳の脳浮腫、BBB 障害は SAH 後に悪化し、高用量の PER により有意に改善した(図 2A)。24 時間後から 48 時間後までの 24 時間の間の死亡率は SAH+溶媒群、SAH+PER 群共に 44.4%であった。48 時間後も同様に、

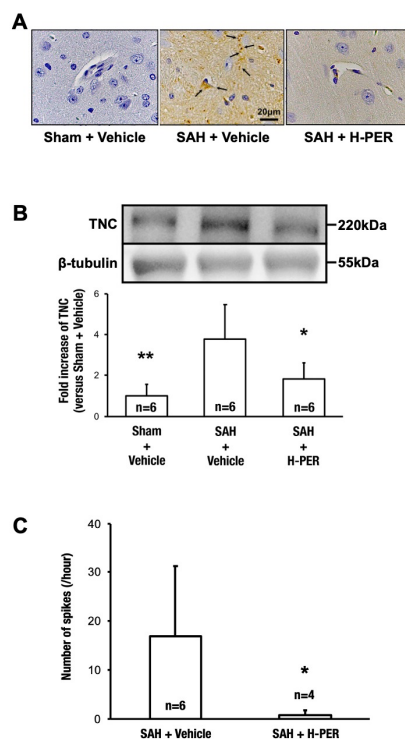


図 2. 高用量ペランパネル(H-PER)によるくも膜下出血(SAH)後血液脳関門障害(IgG 染色:A)、テネイシン C(TNC)の発現増強(B)、てんかん性放電(C)の抑制効果。  
\*p<0.05, \*\*p<0.01 vs. SAH+Vehicle 群; ANOVA.

高用量 PER 群で神経症状及び脳浮腫の軽減を認めた。Western blot による解析では SAH 後に AMPA 受容体サブユニット GluA1 及び GluA2 の活性化、TNC の発現増強、それに伴う代表的 MAP キナーゼ (ERK1/2、JNK、p38) の活性化、MMP-9 の発現増強、その基質である密着結合蛋白の分解がみられ、PER により抑制された (図 2B)。免疫染色では GluA1 や GluA2 の活性化及び TNC の発現増強は脳微小血管内皮細胞や神経細胞にみられた。てんかん性放電は SAH 後に頻発したが、明らかな痙攣は伴わず、PER により抑制された (図 2C)。また PER により神経細胞アポトーシスも有意に抑制された。

特異的 AMPA 受容体作動薬である CI-HIBO 投与により生理学的パラメータや SAH の重症度、死亡率に影響はなかったが、SAH 後の GluA1 や GluA2 の活性化及び TNC の発現はさらに増強し (図 3)、神経症状、脳浮腫、BBB 障害、神経細胞アポトーシスはさらに悪化した。また CI-HIBO 投与はてんかん性放電を増強したが、明らかな痙攣は認めなかった。

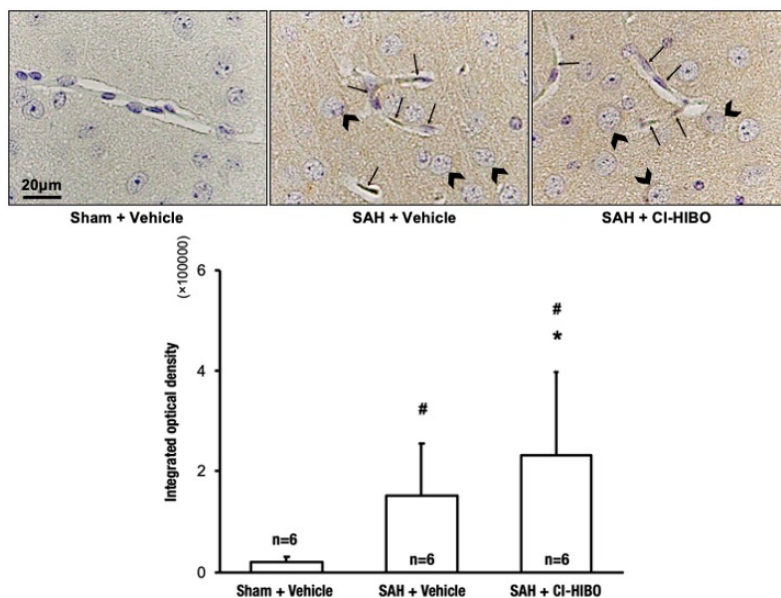


図 3. CI-HIBO によるくも膜下出血 (SAH) 後の脳微小血管内皮細胞 (→) 及び神経細胞 (矢頭) におけるテネイシン C の発現増強効果。

#p < 0.01 vs. Sham+Vehicle 群、\*p < 0.05 vs. SAH+Vehicle 群; ANOVA。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kawakita Fumihito, Kanamaru Hideki, Asada Reona, Imanaka-Yoshida Kyoko, Yoshida Toshimichi, Suzuki Hidenori	4. 巻 13
2. 論文標題 Inhibition of AMPA ( $\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isloxazole Propionate) Receptor Reduces Acute Blood?Brain Barrier Disruption After Subarachnoid Hemorrhage in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Translational Stroke Research	6. 最初と最後の頁 326 ~ 337
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12975-021-00934-0	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 該当する
1. 著者名 Kanamaru Hideki, Kawakita Fumihito, Asada Reona, Miura Yoichi, Shiba Masato, Toma Naoki, Suzuki Hidenori	4. 巻 76
2. 論文標題 Prognostic factors varying with age in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 118 ~ 125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jocn.2020.04.022	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 該当する
1. 著者名 Kawakita Fumihito, Suzuki Hidenori	4. 巻 15
2. 論文標題 Periostin in cerebrovascular disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neural Regeneration Research	6. 最初と最後の頁 63 ~ 63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4103/1673-5374.264456	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 該当する
1. 著者名 鈴木秀謙、川北文博、金丸英樹、浅田玲緒尚、藤本昌志、三浦洋一、芝 真人、当麻直樹	4. 巻 29
2. 論文標題 重症くも膜下出血に対する治療	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 脳外誌	6. 最初と最後の頁 109 ~ 115
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 金丸英樹、川北文博、西川拓文、中野英美、浅田玲緒尚、鈴木秀謙	4. 巻 36
2. 論文標題 マウスくも膜下出血モデルにおけるクラリスロマイシン投与による脳保護効果とペリオスチンの発現変化	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 脳血管攣縮	6. 最初と最後の頁 123 ~ 125
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 川北文博、金丸英樹、浅田玲緒尚、中塚慶徳、三浦洋一、芝 真人、安田竜太、毛利元信、畑崎聖二、当麻直樹、鈴木秀謙	4. 巻 36
2. 論文標題 マウスくも膜下出血モデルにおけるペランパネルの脳保護効果	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 脳血管攣縮	6. 最初と最後の頁 126 ~ 128
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 中野英美、西川拓文、中塚慶徳、川北文博、金丸英樹、岡田 健、芝 真人、鈴木秀謙	4. 巻 36
2. 論文標題 くも膜下出血後に発現するマトリセラー蛋白間の関係と早期脳損傷	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 脳血管攣縮	6. 最初と最後の頁 15 ~ 19
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 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 川北文博
2. 発表標題 マウスくも膜下出血後早期脳損傷におけるAMPA型グルタミン酸受容体の役割
3. 学会等名 Stroke 2021 (第37回スバズム・シンポジウム)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masato Shiba, Masashi Fujimoto, Naoki Toma, Yoichi Miura, Fumihito Kawakita, Yume Suzuki, Yusuke Kuroda, Munenari Ikezawa, Reona Asada, Hideki Kanamaru, Hidenori Suzuki
2. 発表標題 Tenascin-C: A Novel Therapeutic Target in Subarachnoid Hemorrhage
3. 学会等名 International Stroke Conference (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川北文博、金丸英樹、浅田玲緒尚、中塚慶徳、三浦洋一、芝 真人、安田竜太、毛利元信、畑崎聖二、当麻直樹、鈴木秀謙
2. 発表標題 マウスくも膜下出血モデルにおけるperampanelの脳保護効果
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 鈴木秀謙、川北文博
2. 発表標題 脳血管攣縮Update (基礎研究領域)
3. 学会等名 一般社団法人 日本脳神経外科学会第79回学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川北文博、鈴木秀謙
2. 発表標題 くも膜下出血の年代別予後因子についての検討
3. 学会等名 第25回日本脳神経外科救急学会
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----

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