

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23592104

研究課題名(和文) くも膜下出血急性期における脳浮腫の解明：脳損傷に対するスタチンの脳保護作用

研究課題名(英文) The protective effect of Statin for early brain injury after subarachnoid hemorrhage

研究代表者

草鹿 元 (Kusaka, Gen)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00265258

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：くも膜下出血モデルラットを用いて、くも膜下出血急性期における脳浮腫や脳損傷の程度を検証し、脳浮腫の原因の一つと考えられるVEGFについて、その発現をウエスタンブロット法で評価した。また、くも膜下出血急性期の脳浮腫や脳損傷に対する、スタチン(HMG-CoA還元酵素阻害剤)の抑制効果(脳保護作用)についても検証した。くも膜下出血急性期では、VEGFが過剰に発現し、脳組織中の水分含有量(脳浮腫)が増加したが、スタチン投与群のモデルラットではVEGFの発現と脳浮腫の抑制が認められ、神経学的スコアも良好に保たれた。

研究成果の概要(英文)：Vascular endothelial growth factor (VEGF) is known as one of the protein which may induce the brain edema. Few studies have examined the relationship between VEGF and early brain injury after subarachnoid hemorrhage (SAH). Using a rat SAH model, we explored the protective effect of Statin (HMG-CoA reductase inhibitors) for early brain injury after SAH related by VEGF-expression. Male Sprague-Dawley rats weighting 300 to 350g were used for the experimental SAH model. The brain edema, neurological score and VEGF-expression in the cerebral cortex were evaluated at 24 hours after SAH. Experimental SAH induced brain edema, neurological deterioration and over expression of VEGF in the cerebral cortex, while in model rats treated by Statin, the brain edema, neurological score and over expression of VEGF were improved. The author conclude that Statin might offer new treatment strategies for SAH.

研究分野：脳神経外科

キーワード：くも膜下出血 脳浮腫 脳血液関門 スタチン

## 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急性期の脳損傷の程度は、くも膜下出血患者の死亡率や後遺症の程度と強く相関する(Adams et al., 1981; Kirsch et al., 1989; Ogunbo et al., 2001; Weir 1979)ことが知られている。しかしながら、くも膜下出血急性期の頭蓋内病態については、基礎的な研究があまり行われていないのが現状である(Kassel and Drake, 1983)。実際の臨床現場や剖検例の調査でも、脳動脈瘤破裂によるくも膜下出血患者で、36時間以内の急性期死亡率は50%にも達するが、亜急性期以降の経過が原因で後遺症を残すか死亡に至る例は全体の15%程度に過ぎない。しかし、これまでの脳神経外科領域の関心は、主に破裂脳動脈瘤に対する外科手技や、くも膜下出血後の遅発性脳血管攣縮に対する薬物療法など、くも膜下出血急性期以降の治療に向けられてきた。この理由としては、くも膜下出血発症直後の急性脳圧亢進による物理的損傷や全脳虚血が急性期脳損傷の主体という考え方が既定概念になっており、結果としてくも膜下出血急性期脳損傷は治療不能な病態とも認識されてきたためと思われる。しかし最近の我々の研究などで、くも膜下出血急性期の脳損傷の原因は、くも膜下出血発生直後の脳圧上昇という単純なメカニズムではなく、発症後1時間程度から発生する再還流損傷などによる二次的脳損傷が重要な要素であることが示されるようになってきた。くも膜下出血による急激な頭蓋内環境の変化による脳血液関門の破綻は脳浮腫を発生させ(Doczi et al., 1995; Johshita et al., 1990)、頭蓋内圧の持続的な上昇を来たし(Fukuhara et al., 1998; Hayashi et al., 1977)、脳内微小循環を障害(Doczi 2001)、結果として二次的な急性期脳損傷を引き起こす(Germano et al., 2000; Imperatore et al., 2000)と考えられるのである。くも膜下出血の急性期では、脳実質内や主幹動脈組織内で mitogen-activated protein

kinase (MAPK)を主とするストレス蛋白が活性化され(Kusaka et al., 2003)、これにより vascular endothelial growth factor (VEGF)などの脳血液関門透過性亢進蛋白が発現し脳浮腫が増悪することが我々の研究により示唆されるようになってきた(Kusaka et al., 2004)。MAPK を含む細胞内シグナルの上流にあり、かつシグナル活性の鍵となるG蛋白結合受容体により刺激される、細胞膜付近に存在する小さなタイロシンカインースである Src に注目し(Kusaka et al., 2003)、我々はラットのくも膜下出血急性期モデルにおいて選択的な Src 拮抗薬が脳保護作用を有することも証明した(Kusaka et al., 2004)。一方、高脂血症治療薬として既に広く市販されている HMG-CoA 還元酵素阻害剤であるスタチンはやはりG蛋白結合型受容体拮抗剤であることより(Laufs et al., 1998)、Src の拮抗薬同様に Src 以下のストレス蛋白シグナルの活性を阻害し、VEGF の発現を抑制することが予測され、また血管内皮細胞についても安定化作用を有することより(Liao et al., 2002)、脳血液関門の破綻に対し強力な拮抗作用を持つ可能性が示唆される。このような研究は、まだ研究の方向性が見出された段階であり、くも膜下出血急性期の病態に焦点を絞った報告は国内外にほとんどみられない。

## 2. 研究の目的

本研究では、くも膜下出血後の急性期脳損傷に着目して、出血に引き続いておこる急性期障害の発生機序を解明する。このためラットのくも膜下出血モデルを作製して、VEGF 発現を検証し、VEGF の発現と急性期脳損傷の関係を明らかにし、くも膜下出血急性期におけるスタチンの脳保護作用について検証する。使用するスタチンは脳血液関門透過性のあるアトルバスタチンを使用した(Yamashita et al., 2004)。

## 3. 研究の方法

くも膜下出血モデルラットの作成： 雄性SDラット(体重300 - 350g)を全身麻酔下に呼吸管理を行いながら、左頸部内頸動脈よりナイロン糸を挿入し、頭蓋内内頸動脈を穿孔させて、くも膜下出血を起こす(Kusaka et al., 2004)。この手術直後の死亡率は過去の経験より15%程度で、術後生存したラットのみ実験に供する。

くも膜下出血モデルラットは、くも膜下出血直後にアトルバスタチン4mg/kg/を腹腔内に投与した治療群とリン酸バッファのみ投与したコントロール群に分ける(これらとは別にsham群も作成するが、これはナイロン糸挿入し内頸動脈を穿孔させず、またアトルバスタチン治療もおこなわない群である)。

両群ともに、くも膜下出血24時間後に神経学的スコアをチェックし、その後4時間の燐酸バッファにて心臓還流後断頭して、脳実質組織と脳底動脈の2検体に分離し、-80℃で冷凍保存する。

各検体組織中のVEGFをウエスタンブロット法で解析し、各群間の差異を検証する。

脳浮腫についても同様に比較する。脳浮腫の測定については、オープンを用いて脳を乾燥させ、乾燥前後の質量の差より水分量を算出し、脳全体における水分の割合として算定する。

#### 4. 研究成果

<結果>

「くも膜下出血」を以後「SAH」と略す。

##### モデルラット詳細

使用ラット総数：51

イ) SAHコントロール群：9

ロ) SAH治療群：22

ハ) Sham群：3

ニ) 実験中の死亡：6

ホ) 手術手技練習用：11

各群詳細(上記イ)ロ)ハ)について)

イ)・平均体重：334g

・平均血圧：125mmHg (SAH前)

・平均体温：37.0 (SAH前)

・動脈血ガス分析 (SAH前平均)

PO<sub>2</sub>:74.0 PCO<sub>2</sub>:40.6 Ph:7.413

ロ)・平均体重：327g

・平均血圧：128mmHg (SAH前)

・平均体温：37.1 (SAH前)

・動脈血ガス分析 (SAH前平均)

PO<sub>2</sub>:75.0 PCO<sub>2</sub>:42.2 Ph:7.379

ハ)・平均体重：340g

・平均血圧：116mmHg (SAH前)

・平均体温：36.5 (SAH前)

・動脈血ガス分析 (SAH前平均)

PO<sub>2</sub>: - PCO<sub>2</sub>: - Ph: - (測定せず)

##### 神経学的スコア

以下の6項目についての得点を測定

飼育ケージ中のラットの活動性(5分間)

0点：動き無し

1点：わずかに動く

2点：移動するがケージ内の3壁に至らず

3点：移動しケージ内の3壁に至る

上下肢の動き

0点：全く動かず

1点：わずかに動く

2点：ゆっくり明らかに動く

3点：術前と同様に動く

尾尻を持って挙上した時の上肢の伸展度

0点：伸展無し

1点：わずかな伸展

2点：伸展するが完全ではない

3点：術前同様の伸展

ケージの蓋(金属格子)の登攀力(垂直)

1点：全く登らない

2点：半分まで登る

3点：術前同様に登る

体幹に触れたときの反応

1点：反応無し

2点：弱い反応

3点：術前同様の逃避

髭に触れたときの反応

1点：反応なし

2点：弱い反応

3点：術前同様の逃避

得点結果(平均点)

イ) SAHコントロール群

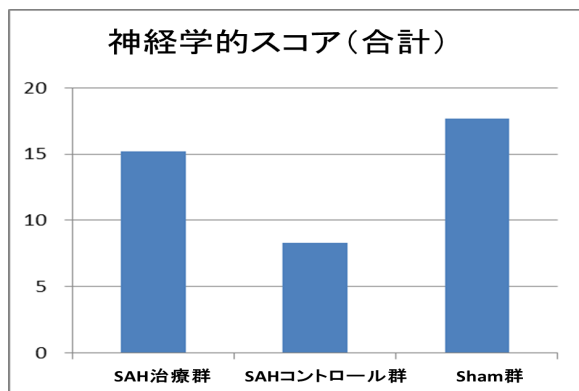
1.4 1.6 1 1 1 2 合計 8

ロ) SAH治療群

3 3 2 2 3 3 合計 15

ハ) Sham群

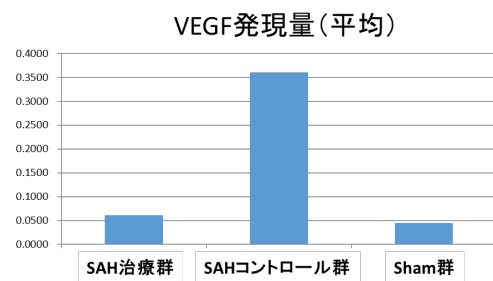
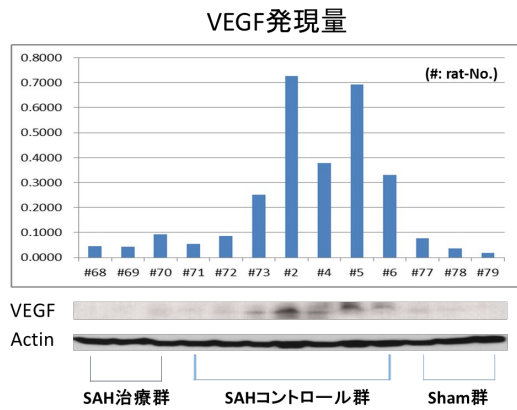
2.7 3 3 3 3 3 合計 17.7



脳浮腫：脳水分含有率（平均%）  
イ）SAHコントロール群：77.98%

ロ）SAH治療群：77.83%

脳組織内 VEGF 発現（ウエスタンブロット）  
以下のグラフに示す通り、SAH治療群ではSAHコントロール群に比較し、VEGFの発現が抑制された（SAH治療群：3、SAHコントロール群：7、Sham群：3）。  
注）SAHコントロール群には、過去のシリーズの検体も含まれている。



#### < 考察と結論 >

現時点までの実験結果では、検体数も十分ではなく統計学的有意差には至らないが、くも膜下出血急性期におけるラットの状態を分析することにより、以下の傾向について肯定的結果となった。

スタチン治療群では、コントロール群に比較し、神経学的に良好な状態を保つことができた。

スタチン治療群では、コントロール群に比較し、脳浮腫が軽減した。

スタチン治療群では、コントロール群に比較し、脳皮質（側頭葉下面）での VEGF 発現が抑制された。

以上より、臨床的に高脂血症治療薬として広く用いられているスタチンには、くも膜下出血後の急性期脳浮腫を抑制し、二次的脳損

傷に対する脳保護作用が期待される。今後更なる裏付けを獲得するため実験を継続したい。

#### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

草鹿 元、くも膜下出血後の急性期脳損傷に対するスタチンの脳保護作用、一般社団法人日本脳神経外科学会第 74 回学術総会、2015 年 10 月 14 日、札幌市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

無し

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

草鹿 元 ( Gen Kusaka )

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00265258

(2)研究分担者

石川 三衛 ( Sane Ishikawa )

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：70112620

(3)連携研究者

( )

研究者番号：