

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592135

研究課題名(和文)クモ膜下出血後早期脳損傷の改善を目的とした治療薬の開発

研究課題名(英文)The Development of a drug for the treatment of early brain injury after subarachnoid hemorrhage

研究代表者

長谷川 雄 (Hasegawa, Yu)

熊本大学・生命科学研究部・講師

研究者番号：40599114

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：くも膜下出血(SAH)の主要な予後決定因子であるSAH後早期脳損傷の病態と治療において、我々は以下の研究結果を得た。1)適切なラットSAHモデルとして、人工呼吸器管理下のタンゲステンワイヤーによる血管穿刺法を確立した。2)SAH後超急性期において、視索のグリア細胞傷害に関連する血液脳関門の破綻、中大脳動脈における血管攣縮や血管内皮細胞の傷害、脳動脈から静脈にかけての血管反応性の障害を認めた。3)スフィンゴシン1リン酸受容体(S1PR)作動薬であるFTY720は、SAH後早期脳損傷を軽減した。従って、同薬はSAHの予後改善に有効な治療薬となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the pathophysiology and treatment of early brain injury after subarachnoid hemorrhage (SAH), which is one of the determinant factors for the prognosis. We identified the following results through this studies; 1) Endovascular perforation model with tungsten wire under mechanical ventilation was suitable procedure to do the experimental studies in SAH. 2) In the hyperacute phase after SAH, there were glial injury-induced blood-brain barrier disruption in optic tract, endothelial cell injury and arterial narrowing in middle cerebral artery, and abnormal vasoreactivity in cerebral vessels including artery and vein. 3) FTY720, sphingosine-1 phosphate receptor agonist, reduced early brain injury, speculating that the drug can improve SAH prognosis.

研究分野：脳卒中の基礎

キーワード：クモ膜下出血 早期脳損傷 脳血管傷害 FTY720

1. 研究開始当初の背景

脳動脈瘤破裂を主な原因とするクモ膜下出血(SAH)は、未だ死亡率、後遺症率の高い疾患である。長年 SAH 後 4 日～14 日の間に起こる合併症である脳血管攣縮が重要な予後決定因子として研究されてきたが、基礎研究で有効であった薬でも、臨床試験の結果は芳しくなく、未だ明らかな SAH 患者の予後改善は得られていない。

SAH 後早期脳損傷は SAH 後 3 日以内(脳血管攣縮が生じる前)に生じる新たな予後決定因子として 10 年ほど前より注目され始めた。その病態は SAH 直後の頭蓋内圧上昇とそれに伴う脳血流低下による全脳虚血に加え、クモ膜下腔血塊による酸化ストレス等の細胞障害性変化が相加的に作用すると考えられ、引き続き脳浮腫、血液脳関門の破綻、神経細胞死等が起こり、最終的にそれらの反応は神経学的脱落症状や生命の危険を惹起する。近年基礎研究分野でその病態が解明されはじめたが、その詳細については分かっていない。

現在 SAH と診断がついた後外科的治療に移行するまでに投薬できる治療薬は無い。そこで SAH 後早期脳損傷をターゲットとした予後改善を目的とする治療薬が開発、または現存する薬の適応を拡大できれば、SAH 患者の予後改善が得られると期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は以下の 3 点である。

A) 予備実験

SAH のモデル動物で最も臨床を反映していると考えられている血管穿刺法は、高い死亡率と表現型に大きさ差が出るのが難点である。そこで他施設の論文を参考にして、より安定的な血管穿刺モデルの確立を試みた。

B) 研究 1

SAH 後早期脳損傷の病態において、特に超急性期の脳血管に認められる現象を明らかにするため、脳動脈、細動脈、脳毛細血管、静脈にどのような傷害や反応が生じるかにつ

いて検討を行った。

C) 研究 2

SAH 後早期脳損傷における FTY720 の治療効果について検討した。FTY720 はスフィンゴ脂質の代謝産物であるスフィンゴシン 1 リン酸の受容体 (S1PR) 作動薬であり、現在多発性硬化症の治療薬として臨床的に使われている。近年その多面的効果を利用して様々な臓器保護効果が検討されており、特に脳卒中の分野では、中枢性の S1PR の活性化を介した抗アポトーシスによる直接的な脳保護作用や、循環するリンパ球を減少させ、傷害脳へのリンパ球の浸潤を抑制する間接的な脳保護作用等が報告されている。

3. 研究の方法

A) 予備実験

オス SD ラットにおいて、従来行っていた 4-0 ナイロン糸による血管穿刺法から、ポリエチレンチューブ + タングステンワイヤーを用いた血管穿刺法に変更した上で SAH モデルを作成、死亡率や血圧、脈拍、神経所見、脳血流、脳重量、脳水分含量、その他 SAH の予後に関連すると考えられる臓器の重量(心臓、脾臓、肺)について比較検討した。

B) 研究 1

1) face mask 下に上述した SAH モデルを作成し、SAH 前後の脳血流と尾動脈における血圧を測定した後、深麻酔下に断頭(SAH 作成 5 分後)、脳と心臓を摘出しその重量を計測した。その後ブレグマにて脳を切離し、吻側は脳浮腫の評価のため脳水分含量を測定、尾側は凍結切片を作製し、血液脳関門の破綻を検討すべくイムノグロブリン G 染色を行った。加えて急性期細胞傷害性変化を検討すべく、リン酸化細胞外シグナル調節キナーゼ (Extracellular Signal-regulated Kinase ; ERK) を用いてリン酸化 ERK 陽性細胞を数えた。さらに、リン酸化 ERK 陽性細胞の局在を検討するため、グリア細胞のマーカーである GFAP

と血管内皮細胞のマーカーである PECAM-1 を用いてリン酸化 ERK と二重染色を行った。

2) 気道を確保し人工呼吸器下に麻酔を維持し、大腿動静脈にカテーテルを挿入、上記同様 SAH モデルを作成した。5 分後に動脈血ガス分析を測定し、経静脈的にアセタゾラミドを 30mg/kg 投与し、5 分毎に脳血流を測定し脳血管反応性を検討した。30 分間の測定後に経心的に生理食塩水にて灌流、液体ラテックスを投与した後脳を摘出し、血管攣縮の程度を評価すべく中大脳動脈の近位側、遠位側の径を計測した(ラテックス血管撮影法)。

C) 研究 2

1) FTY720 の治療効果を検討すべく、オス SD ラットを A) 偽手術群 B) SAH+FTY720 群 C) SAH+対照群に分け、人工呼吸器管理下に上記 SAH モデルを作成し SAH 導入 30 分後に 1mg/kg の FTY720 を腹腔内に投与した。24 時間後に神経所見を確認、脳血流測定後速やかに深麻酔下に脳を摘出し、脳浮腫の程度を検討すべく脳水分含量を計測した。

2) FTY720 の脳損傷軽減効果が脳内の S1PR を介する作用によるものか(直接作用)検討すべく、A) VPC23019+SAH+FTY720 群 B) その溶媒+SAH+FTY720 群に分けた。S1PR 拮抗薬である VPC23019 を SAH 作成前に定位的に脳室内に投与した後仰臥位にて体位を確保、人工呼吸器管理下に SAH モデルを作成した。SAH 導入 30 分後に 1mg/kg の FTY720 を腹腔内に投与し、24 時間後に神経所見を確認、脳血流測定後深麻酔下に脳を摘出し、脳浮腫の程度を検討すべく脳水分含量を計測した。

4. 研究成果

A) 予備実験

1) SAH ラットにおいて、死亡の転帰をたどるものは SAH 後 5 分以内に呼吸停止が生じることがわかった。Facemask 管理下にタングステンワイヤーを用いて SAH を作成した場合死亡率は 60%程度であったが、人工呼吸器管理下では 20%程度となった。また以前のモデル

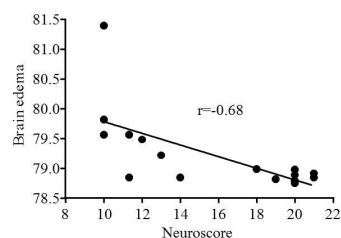
においては、手術が成功しても出血がほとんど認められない軽症例が存在し、その群を除外する必要があったが、今回のモデルでは穿刺を行ったラット脳に明らかな SAH が確認された。手術 24 時間後 SAH ラットでは、タングステンワイヤー法においても有意な神経学的所見の悪化と脳浮腫が認められた。さらに、神経所見と脳浮腫に有意な相関が認められた($r=-0.68$, 図 1)。以上よりこのモデルは適切であり、実験動物の必要数も十分に減らすことが可能となることがわかった。従ってこれ以降は人工呼吸器 + タングステンワイヤー法によるモデル作成にて以下の研究を行った。

2) 次に脳浮腫の指標として脳重量と脳水分含量のどちらが適しているかの検討を行った。脳重量は簡便な測定法であり必要動物数を減らすことができる長所があるものの、体重や脳体積によりその値が影響される。一方脳水分含量ではそのような影響がないことから、後者による測定法にて脳浮腫を検討する方が確実であると判断した。

3) 人工呼吸器管理下に SAH 導入後血圧や脈拍を 24 時間経時的に測定した。それらの値は SAH 後一過性に低下するが、生存する動物では 30 分程度で回復することが確認された。

4) 脳以外の臓器(心臓、脾臓、肺)について、明らかな臓器重量の変化または腫大等のサイズの変化は認めなかった。

図 1. クモ膜下出血モデルにおける神経症状スコアと脳浮腫との相関図



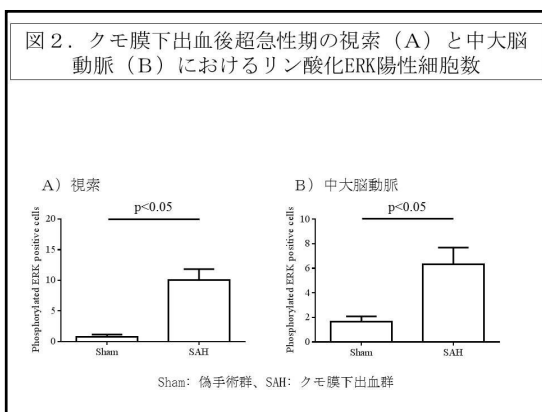
B) 研究 1

(予備実験による呼吸停止の時間、血圧、脈拍の結果から、1)は SAH5 分後、2)は SAH30

分後をエンドポイントとした。)

1) SAH 偽手術群と比し SAH 群では SAH5 分後 血圧、脈拍、脳血流とも有意に低下するも、 そのような早い段階では脳浮腫や心臓浮腫 は認めなかった。IgG 染色を用いた脳毛細血 管に存在する脳血液関門の破綻の検討では、 視索にてその染色性の増強を認めた。またリ ン酸化 ERK 陽性細胞は視索のグリア細胞や皮 質動脈の血管内皮細胞にてその発現は増加 した(図2)。

2) アセタゾラミド投与後偽手術群では血管 反応性が5%程度認められた。非致死性 SAH 群 では脳血管反応の消失が認められたが(血管 麻痺) 致死性 SAH 群では脳血流はかなり低 下するものの、血管反応性はむしろ上昇して いる所見が認められた。また静脈系において は、二相性の脳血流の増加を認めた。以上よ り SAH 後超急性期において、脳血管は攣縮や 脳動脈における内皮細胞傷害、動脈~静脈に わたる血管反応性の障害、虚血に弱い視索に おけるグリア細胞の傷害等、脳血管全般にわ たって傷害を受けることが示唆された。さら には、血管撮影上大脳動脈は近位部、遠位 部とも攣縮が生じていた。

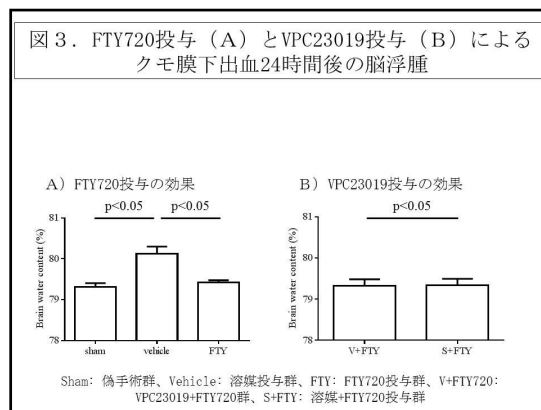


C) 研究2

1) FTY720 群では SAH 群と比べ、脳血流は変 化がないものの神経所見は改善し、脳浮腫も 軽減した(図3左)。

2) VPC23019 を前投与にて、両群間で神経所 見、脳血流、脳浮腫において差は認められな かった(図3右)。

以上の結果から、FTY720 は SAH 後早期脳損傷 に有効であり、今後さらなる検証を積み重ね ることにより、将来治療薬として有望なもの になると考えられた。また上述の FTY720 の 保護効果は、脳の S1PR を介した直接作用に よるものではないことが示唆され、リンパ球 の循環量減少による間接的な効果によるもの と推測された。



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 8 件)

1. Hasegawa, Y.; Suzuki, H.; Nakagawa, T.; Uekawa, K.; Koibuchi, N.; Kawano, T.; Kim-Mitsuyama, S., Assessment of the Correlations Between Brain Weight and Brain Edema in Experimental Subarachnoid Hemorrhage. (査読有) Acta neurochirurgica. Supplement 2016, 121, 89-92.
2. Hasegawa, Y.; Suzuki, H.; Uekawa, K.; Kawano, T.; Kim-Mitsuyama, S., Characteristics of Cerebrovascular Injury in the Hyperacute Phase After Induced Severe Subarachnoid Hemorrhage. Translational stroke research (査読有) 2015, 6 (6), 458-66.
3. Uekawa, K.; Hasegawa, Y.; Ma, M.; Nakagawa, T.; Katayama, T.; Sueta, D.; Toyama, K.; Kataoka, K.; Koibuchi, N.; Kawano, T.; Kuratsu, J.; Kim-Mitsuyama, S., Rosuvastatin ameliorates early brain

injury after subarachnoid hemorrhage via suppression of superoxide formation and nuclear factor-kappa B activation in rats. Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association (査読有) 2014, 23 (6), 1429-39.

4. 長谷川雄、鈴木秀謙、植川顕、河野隆幸、倉津純一、光山勝慶 クモ膜下出血における早期脳損傷の役割～新しい治療ターゲット～ (査読無) 脳循環代謝 25: 123-128, 2014

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 長谷川雄、鈴木秀謙、植川顕、河野隆幸、光山勝慶、超急性期重症クモ膜下出血における脳血管の傷害に関する実験的検討、第 51 回高血圧関連疾患モデル学会学術総会、2015 年 10 月 30 日、大阪

2. 長谷川雄、文献レビュー基礎編(指定講演)、第 31 回スパズムシンポジウム、2015 年 3 月 26 日、広島

3. 長谷川雄、植川顕、中川隆志、日下裕章、林博文、鯉淵信孝、河野隆幸、倉津純一、光山勝慶、急性期における致死性クモ膜下出血の特徴とその意義、第 40 回日本脳卒中学会、2015 年 3 月 28 日、広島

4. Yu Hasegawa, Ken Uekawa, Takashi Nakagawa, Minjie Ma, Lin Bowen, Hiroaki Kusaka, Daisuke Sueta, Nobutaka Koibuchi, Takayuki Kawano, Jun-ichi Kuratsu, Shokei Kim-Mitsuyama. The response of cerebral blood flow and the pattern of brain edema in acute phase after subarachnoid hemorrhage. The 16th International Conference on Brain Edema and Cellular Injury, Huntington Beach, California, Sep.28.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

長谷川 雄 (YU HASEGAWA)
熊本大学大学院生命科学研究部 講師
研究者番号：40599114

(2)研究分担者

倉津 純一 (JUNICHI KURATSU)
熊本大学大学院生命科学研究部 教授
研究者番号：20145298

山田 和慶 (KAZUMICHI YAMADA)
熊本大学医学部付属病院 特任教授
研究者番号：00398215

甲斐 豊 (KAI YUTAKA)
熊本大学医学部付属病院 特任教授

研究者番号：30322308

浜崎 禎 (HAMASAKI TADASHI)
熊本大学医学部付属病院 助教
研究者番号：60433033