

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861272

研究課題名(和文)マトリックス細胞蛋白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)Clarifying the pathophysiology of early brain injury after subarachnoid hemorrhage focusing on matricellular proteins.

研究代表者

芝 真人 (SHIBA, Masato)

三重大学・医学部附属病院・診療等従事者

研究者番号：30595682

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ラット及びマウスの血管内穿通モデルを作成し、くも膜下出血後早期脳損傷の病態におけるマトリセルラー蛋白テネイシンCの役割について調べた。まずくも膜下出血後の脳においてテネイシンCの発現に伴い神経細胞のアポトーシスが誘導されていることを示した。続いてイマチニブがテネイシンCの発現を抑制することによりアポトーシスを軽減していることを確認するため精製テネイシンCの髄腔内投与を行い、アポトーシスが誘導されることを示した。最後に各種阻害薬を用いて、テネイシンCの発現抑制がMAPキナーゼを介したMMP-9の誘導を抑制することによって、早期脳損傷を軽減させることを示した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of tenascin-C(TNC), a matricellular protein, on pathophysiology of early brain injury after experimental subarachnoid hemorrhage(SAH) by using rats and mice endovascular perforation models. Firstly, we showed that SAH caused neuronal apoptosis in the brain with TNC upregulation. Next, we showed that intracisternally injected recombinant TNC reversed the anti-apoptotic effects in brain by imatinib. Lastly, using various inhibitors, we showed that early brain injury was improved with inhibition of TNC upregulation by suppression of MAP kinase-dependent MMP-9 induction.

研究分野：脳血管障害

キーワード：くも膜下出血 早期脳損傷 マトリセル蛋白 テネイシンC MAPキナーゼ

#### 1. 研究開始当初の背景

マトリックス細胞蛋白は脳では成長発達期に高発現し、成人ではほとんど発現していない。しかし、脳損傷時に遅発性に高発現することから、組織損傷の修復や恒常性維持に寄与する可能性がある。我々はマトリックス細胞蛋白に着目し、その機能を明らかにして発現を制御することにより、新たな脳保護治療戦略を構築できると考えている。

#### 2. 研究の目的

本研究では、代表的なマトリックス細胞蛋白の1つであるテネイシンCに焦点を絞り、くも膜下出血(SAH)後の早期脳損傷におけるテネイシンCの発現機構やその機能的役割を解明し、治療に応用するための可能性につき探求した。

#### 3. 研究の方法

(1)オスのSDラット(270-320g)の左内頸動脈先端部をナイロン糸にて血管内より穿通させることによりくも膜下出血(SAH)モデルを作成し、30分後にvehicle(リン酸緩衝生理食塩水)または血小板由来増殖因子(PDGF)受容体阻害薬イマチニブ(高容量、低容量の2dose)を腹腔内投与した。Sham群では同様の手技を行うが、内頸動脈に挿入したナイロン糸を穿通させずに回収した。SAH後24時間及び72時間の時点で盲検的に神経学的所見、Western blot法による各種蛋白(MAPキナーゼ[ERK1/2、JNK及びp38]、PDGF受容体[、及びリン酸化受容体]、テネイシンC、cleaved caspase-3)の発現変化、免疫組織学的評価、TUNEL染色を施行した。  
(2)イマチニブの早期脳損傷抑制効果が真にテネイシンCの抑制によるものかを確認するために、テネイシンC蛋白を精製し、イマチニブにより早期脳損傷が抑制された状態のくも膜下出血ラットの髄腔内に投与した。  
(3)各種阻害薬を用いて検討を行い、MAPキナーゼを介したMMP-9の誘導が早期脳損傷を引き起こしているか調べた。

#### 4. 研究成果

(1)SAH後の大脳では広範にPDGF受容体が活性化され、neuropilにテネイシンCが発現することや、カスパーゼ依存性の神経細胞アポトーシスが生じることが明らかになった。イマチニブによるPDGF受容体の活性化抑制は大脳におけるテネイシンCの発現を抑制し、神経細胞、血管内皮細胞、グリア細胞におけるMAPキナーゼの活性化を抑制し、結果的に神経細胞のアポトーシスを抑制した。また、神経細胞アポトーシスの発生抑制により、くも膜下出血後の神経学的所見は有意に改善した。これらの成果は、マトリセルラー蛋白テネイシンCがSAH後の早期脳損傷において重要な役割を果たすという我々の仮説を支持するものである。  
(2)イマチニブによる早期脳損傷の抑制効果

は阻害された。さらに免疫組織学的検討により、MAPキナーゼが細胞種類別に異なる発現をしていることが明らかとなった。

(3)テネイシンCの発現抑制によりMAPキナーゼを介したMMP-9の誘導が抑制され、早期脳損傷が軽減することが分かった。

以上からテネイシンCはくも膜下出血後早期脳損傷の発現において極めて重要な役割を果たしていることが示され、今後新薬開発の新たなターゲットとなりうると考えられた。

#### 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 13件、全て査読有り)

1. Fujimoto M, Shiba M, Kawakita F, Liu L, Shimojo N, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Suzuki H. Deficiency of tenascin-C and attenuation of blood-brain barrier disruption following experimental subarachnoid hemorrhage in mice. *J Neurosurg* 2016; 124:1693-702.

2. Suzuki H, Fujimoto M, Shiba M, Kawakita F, Liu L, Ichikawa N, Kanamaru K, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T. The Role of Matricellular Proteins in Brain Edema after Subarachnoid Hemorrhage. *Acta Neurochir Suppl* 2016; 121:151-156.

3. 鈴木秀謙、川北文博、刘 磊、市川尚己、藤本昌志、芝 真人。くも膜下出血後の遅発性虚血性脳障害をめぐる新展開。脳外誌 2015; 24:232-238.

4. 谷岡 悟、川北文博、佐藤 裕、津田和彦、丹羽恵彦、藤本昌志、芝 真人、鈴木秀謙、pSEEDグループ。くも膜下出血患者における血漿中ガレクチン-3濃度の検討。脳血管攣縮 2015; 31:45-48.

5. 西川拓文、川北文博、北野詳太郎、宮 史卓、清水重利、毛利元信、佐野貴則、藤本昌志、芝 真人、鈴木秀謙、pSEEDグループ。血漿中ペリオスチン濃度はくも膜下出血後DCI発症例で高値を示す。脳血管攣縮: 2015; 31:41-44.

6. Shiba M, Fujimoto M, Kawakita F, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Kanamaru K, Taki W, Suzuki H. Effects of tenascin-C on early brain injury after subarachnoid hemorrhage in rats. *Acta Neurochir Suppl* 2015; 120:69-73.

7. Fujimoto M, Shiba M, Kawakita F, Shimojo N, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Kanamaru K, Taki W, Suzuki H. Vasoconstrictive effect of tenascin-C on cerebral arteries in rats. *Acta Neurochir Suppl* 2015; 120:99-103.

8. Suzuki H, Kanamaru K, Shiba M, Fujimoto M, Kawakita F, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Taki W. Tenascin-C is a possible mediator between initial brain injury and

vasospasm-related and -unrelated delayed cerebral ischemia after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Acta Neurochir Suppl 2015; 120:117-121.

9. Shiba M, Fujimoto M, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Taki W, Suzuki H. Tenascin-C causes neuronal apoptosis after subarachnoid hemorrhage in rats. Transl Stroke Res 2014; 5:238-247.

10. 藤本昌志、芝 真人、川北文博、今中吉田恭子、吉田利通、金丸憲司、鈴木秀謙. くも膜下出血後の血液脳関門障害におけるテネイシン C の役割. 脳血管攣縮 2014; 30:12-14.

11. Suzuki H, Shiba M, Fujimoto M, Kawamura K, Nanpei M, Takeuchi E, Matsushima S, Kanamaru K, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Taki W. Matricellular protein: a new player in cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage: Acta Neurochir Suppl 2013;115:213-218

12. Shiba M, Suzuki H, Fujimoto M, Shimojo N, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Kanamaru K, Matsushima S, Taki W. Role of platelet-derived growth factor in cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in rats. Acta Neurochir Suppl 2013;115:219-223

13. Fujimoto M, Suzuki H, Shiba M, Shimojo N, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Kanamaru K, Matsushima S, Taki W. Tenascin-C Induces Prolonged Constriction of Cerebral Arteries in Rats. Neurobiol Dis. 2013;55:104-9.

〔学会発表〕(計 8 件)

1. Masashi Fujimoto, Masato Shiba, Fumihiro Kawakita, Lei Liu, Naoshi Shimojo, Kyoko Imanaka-Yoshida, Toshimichi Yoshida, Hidenori Suzuki. Role of tenascin-C in early brain injury : Evaluation using tenascin-C knockout mice. The 13th International Conference on Neurovascular Events after Subarachnoid Hemorrhage. Karuizawa Prince Hotel West, Karuizawa, Japan, September 17, 2015

2. テネイシン C ノックアウトマウスは実験的くも膜下出血後の脳血管攣縮を軽減させる. 藤本昌志、芝 真人、川北文博、劉 磊、金丸憲司、鈴木秀謙. 第 31 回スパズムシンポジウム. メルパルク広島(広島県、広島市)2015 年 3 月 26 日

3. Hidenori Suzuki, Masashi Fujimoto, Masato Shiba, Fumihiro Kawakita, Liu Lei, Naoki Ichikawa, Kenji Kanamaru, Kyoko Imanaka-Yoshida, Toshimichi Yoshida. The role of matricellular proteins in brain edema after experimental subarachnoid hemorrhage. The 16th International Conference on Brain Edema and Cellular

Injury. Huntington Beach, CA, USA (Hyatt Regency Huntington Beach Resort and Spa, September 29, 2014)

4. 鈴木秀謙、川北文博、劉 磊、市川尚己、藤本昌志、芝 真人. くも膜下出血後の遅発性脳血管攣縮の病態と治療. 第 34 回日本脳神経外科コンgres総会(招待講演). 大阪国際会議場(大阪府大阪市) 2014 年 5 月 18 日

5. Masato Shiba, Masashi Fujimoto, Fumihiro Kawakita, Kyoko Imanaka-Yoshida, Toshimichi Yoshida, Kenji Kanamaru, Waro Taki, Hidenori Suzuki. Effects of tenascin-C on early brain injury after subarachnoid hemorrhage in rats. The 12th International Conference on Neurovascular Events after Subarachnoid Hemorrhage, Lucerne, Switzerland, July 10, 2013.

6. Hidenori Suzuki, Kenji Kanamaru, Masato Shiba, Masashi Fujimoto, Fumihiro Kawakita, Kyoko Imanaka-Yoshida, Toshimichi Yoshida, Waro Taki. Tenascin-C is a possible mediator between initial brain injury and vasospasm-related and -unrelated delayed cerebral ischemia after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. The 12th International Conference on Neurovascular Events after Subarachnoid Hemorrhage, Lucerne, Switzerland, July 10, 2013.

7. Masashi Fujimoto, Masato Shiba, Fumihiro Kawakita, Kenji Kanamaru, Waro Taki, Hidenori Suzuki. Vasoconstrictive effect of tenascin-C on cerebral arteries in rats. The 12th International Conference on Neurovascular Events after Subarachnoid Hemorrhage, Lucerne, Switzerland, July 10, 2013.

8. 鈴木秀謙、芝 真人、藤本昌志、川北文博、今中恭子、吉田利通. Matricellular protein によるくも膜下出血後脳血管攣縮の制御. 第 45 回日本結合組織学会学術集会・第 60 回マトリックスメン研究会大会合同学術大会(招待講演) 和歌山県立医科大学講堂(和歌山県和歌山市) 2013 年 6 月 28 日

〔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：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.medic.mie-u.ac.jp/neurosurgery/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

芝 真人 (SHIBA, Masato)

三重大学・医学部附属病院・診療等従事者

研究者番号：30595682

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

鈴木 秀謙 (SUZUKI, Hidenori)

藤本 昌志 (FUJIMOTO, Masashi)

川北 文博 (KAWAKITA, Fumihiro)