

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19997

研究課題名(和文) くも膜下出血後 EBI と転写因子 Nrf2 の関連についての検討

研究課題名(英文) The effect of transcription factor Nrf2 on EBI after subarachnoid hemorrhage

研究代表者

会田 泰裕 (Aida, Yasuhiro)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：50735438

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)：くも膜下出血の予後を規定する因子として、脳血管攣縮などに代わり、出血後72時間以内に生じる脳浮腫や細胞障害性変化などを主体とする早期脳損傷 (EBI : early brain injury) が注目されてきている。今回 EBI に対して、酸化ストレスおよび酸化ストレス反応制御転写因子である Nrf2 が関与していることを明らかにするため、ラットやマウスでの血管穿通モデルを用いた動物実験を行い、両者の関連が示唆される結果を得た。今後 Nrf2 をターゲットとしたくも膜下出血後の予後予測や、EBI に対する治療および治療効果判定の確立につなげていきたい。

研究成果の概要(英文)：Early brain injury (EBI) mainly focusing on cerebral edema and cytotoxicity changes occurred within 72 hours after bleeding, instead of cerebral vasospasm, has been noted as a factor that regulates the prognosis of subarachnoid hemorrhage. To clarify an oxidative stress and Nrf2, which is oxidative stress response regulatory transcription factor, is involved in EBI, we conducted animal experiments using a blood vessel penetration model in rats and mice, and we got the results that both were related. Targeting Nrf2, we would like to lead to the prognostic prediction after subarachnoid hemorrhage and the establishment of treatment and therapeutic effect judgment on EBI.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：くも膜下出血 早期脳損傷 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

くも膜下出血の予後は極めて不良で、発症後半年以内に約半数が死亡する。仮に救命しえたとしても、重度の後遺症が残存する場合も多く、社会的、医療経済的観点からも早急な治療成績の改善が求められている。実臨床においては、亜急性期に症状が悪化する多数の症例が存在するため、長年くも膜下出血後遅発性に生じる脳血管攣縮による血管狭窄の治療に重点が置かれてきたが、最近の大規模臨床試験において、血管狭窄のみを治療しても予後は改善されないことが明らかとなった (Macdonald et al, Lancet Neurol 2011)。そして、新たにくも膜下出血患者の予後を規定する因子として、出血後 72 時間以内に生じる早期脳損傷 (EBI : early brain injury) が注目されてきている (Cahill et al, Stroke 2009)。EBI は、脳圧上昇に起因する脳浮腫、細胞障害性変化等を主体とする病態であり、経過での症状悪化症例との関連が示唆され、脳血管攣縮に代わる新たな治療ターゲットとして注目されている。

EBI は酸化ストレスを介して病態を悪化させると考えられているため、くも膜下出血後の酸化ストレス反応を抑制することにより、EBI に対する治療効果が得られると予想される。そこで酸化ストレス反応制御転写因子 Nrf2 (nuclear factor erythroid-2-related factor 2) に着目した。現在、外傷性脳損傷、脳内出血、脳虚血における二次的脳損傷において、酸化ストレス反応を制御することで、Nrf2 が包括的な脳保護に寄与するとの報告が累積してきている (Peng et al, Brain Research 2013)。これらの報告は、くも膜下出血後 EBI においても Nrf2 の活性化が重大な役割を担っている可能性を示唆するものである。

2. 研究の目的

(1) くも膜下出血後 EBI における酸化ストレスおよび Nrf2 の関与を明らかにし、Nrf2 が EBI に寄与する分子メカニズムを解明する。

(2) Nrf2 活性化剤投与が EBI の治療となりうるか、検討する。

(3) 血中の酸化ストレス指標因子の測定が、くも膜下出血の予後予測および EBI に対する治療効果判定に有効か、検討する。

3. 研究の方法

(1) ラットくも膜下出血モデルにおける EBI と酸化ストレスの関連についての検討
ラットくも膜下出血血管穿通モデルの作

成を行い、くも膜下出血群と sham 群の比較において検討を行う。脳切片を用いた蛍光免疫組織染色およびウイルス動脈輪を用いた qRT-PCR を行い、酸化ストレスマーカーである HO-1 の発現をそれぞれ蛋白、RNA レベルで確認し EBI と酸化ストレスとの関連を検討する。

(2) マウスくも膜下出血モデルにおける EBI と Nrf2 の関連についての検討

マウスくも膜下出血血管穿通モデルの作成を行い、くも膜下出血群と sham 群の比較において検討を行う。まずは、Nrf2 発現とその局在を蛍光免疫染色、RT-PCR、Western blot 法を用いて経時的に評価し、くも膜下出血群における Nrf2 発現を確認する。次に、脳水分含量計測による脳浮腫、Evans blue extravasation を用いた血液脳関門崩壊、神経細胞死の割合、MDA と GSH/GSSG を用いた酸化ストレス、TNF- α ・IL-18 による炎症反応の評価を行い、くも膜下出血群における EBI を確認する。その際、マウスから採取した血液から、酸化ストレスの指標である血中グルタチオン量を経時的に測定し、EBI の程度と相関が得られるか解析する。以上の結果から、くも膜下出血後 EBI と Nrf2 の関連についての基礎的基盤を確認する。

(3) マウスくも膜下出血モデル Nrf2 KO 群を用いた EBI と Nrf2 の関連についての検討

マウスくも膜下出血 Nrf2 KO 群と WT 群の比較において、(2)と同様の実験にて、EBI と Nrf2 の関連の再現性を確認する。また同時に、急性期 (くも膜下出血作成 1 日後)・慢性期 (作成 28 日後)における神経学的評価を行い、EBI 後の予後と Nrf2 の関連について検討する。神経学的評価に関しては、一般的な評価方法である 18-point composite test 及び beam balance test に加え、実臨床では慢性期に認知機能低下、抑うつ症状、運動機能障害が問題となるため、長期記憶 (水迷路試験や受動回避学習試験)、作業記憶 (Y または T 迷路試験)、抑うつ (テールサスペンション試験や強制水泳試験)、行動試験 (ロータロッド) を行い評価する (Sherchan et al, J Neurotrauma 2011)。以上の結果から、くも膜下出血後 EBI と Nrf2 の関連についての再現性を得て、血中グルタチオン定量によるくも膜下出血後 EBI の予後予測の正当性・妥当性を立証する。

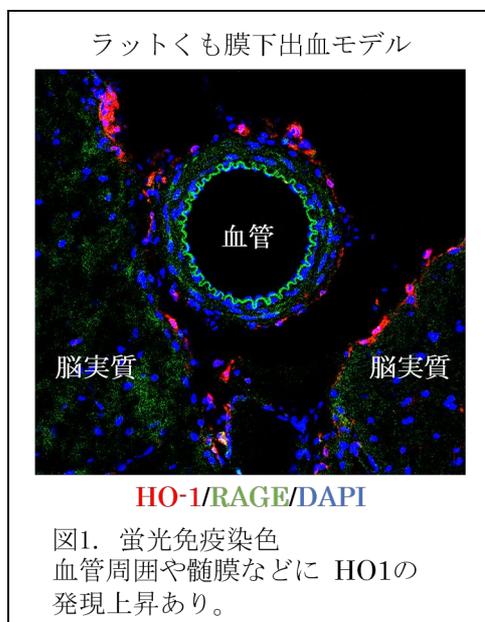
(4) マウスくも膜下出血モデルにおける N-acetylcystein 投与による EBI 治療実験

マウスくも膜下出血モデルに対して Nrf2 活性化剤である N-acetylcystein を投与した場合に、EBI および急性期/慢性期の神経学的所見が改善するかを検討する。実験は前述した方法で評価・検討を行う。N-acetylcystein の投与時期に関しては、く

も膜下出血作成 24 時間前、作成 1 時間後、作成 24 時間後の 3 群を設定する。また投与量に関しては、実験結果より 3 種類に振り、濃度依存性に EBI および急性期/慢性期の神経学的所見が改善するかを検討する。コントロールは N-acetylcystein の溶媒を投与するモデルとする。そして同時に、経時的な血中グルタチオン定量を行い、EBI の治療効果と相関が得られるか解析する。以上の結果から、N-acetylcystein 投与によるくも膜下出血後 EBI 治療の可能性を追求し、血中グルタチオン定量によるくも膜下出血後 EBI 治療効果の有効性・安全性も立証する。

4. 研究成果

マウスモデル作成に先立ち、作成が比較的容易なラットくも膜下出血血管穿通モデルの作成を行い、モデル作成の手技を安定化させた。

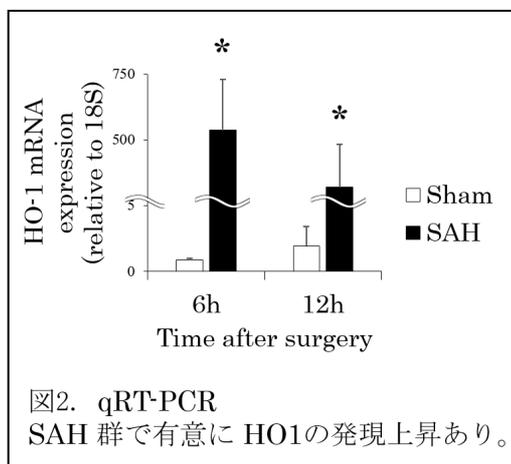


ラットくも膜下出血血管穿通モデルの脳切片を用いた蛍光免疫組織染色では、血管周囲および髄膜などに酸化ストレスマーカーである HO1 の蛋白レベルでの有意な発現上昇が見られ、くも膜下出血後 EBI と酸化ストレスとの関連が示唆された(図 1)。また、くも膜下出血後のラットから取り出したウィルス動脈輪を用いた qRT-PCR でも、同様に HO-1 の RNA レベルでの有意な発現上昇が見られ、血管においてもくも膜下出血後の病態と酸化ストレスとの関連が示唆された(図 2)。

その後、マウスを用いたくも膜下出血血管穿通モデル作成を安定化させた。このモデルを用いた実験で、Nrf2 の KO マウスと野生型との術 24 時間後の比較として、くも膜下出血後 EBI の主要な病態である脳浮腫を脳

水分含量計測によって評価し、また脳血管収縮の評価として India-Ink angiography を用いた血管の計測を行った。現段階では両群に有意な差は認めていないが、Nrf2 KO 群でより脳浮腫が重篤で、より血管収縮を認める傾向であった。有意な差が出ていない原因としては、Nrf2 KO 群で術 24 時間以内の死亡率が野生型群に比べて有意に高いことが挙げられ、前者が酸化ストレスに起因した EBI によって、より状態が悪化している可能性が推測された。これらの所見はくも膜下出血後 EBI に酸化ストレスおよび Nrf2 が関与していることを示唆する所見であると考えられた。

モデル作成の安定化に多大な時間を要したため、予定していた実験を遂行・検証できなかったことは残念であった。しかし本プロジェクトはくも膜下出血後 EBI の予後予測および新たな治療法確立、治療効果判定まで、多岐にわたる可能性を秘めており、従来にくも膜下出血治療を大きく変える画期的な研究となり得ると思われる。よって今後も継続して研究を続けていく予定である。



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 4 件)

Takarada-Iemata M, Yoshikawa A, Takahashi HM, Okitani N, Nishiuchi T, Aida Y, Kamide T, Hattori T, Ishii H, Tamatani T, Le TM, Roboon J, Kitao Y, Matsuyama T, Nakada M, Hori O.

N-myc downstream-regulated gene 2 protects blood-brain barrier integrity following cerebral ischemia.

Glia.

2018 Feb 24.

doi: 10.1002/glia.23315. 査読あり

Aida Y, Misaki K, Kamide T, Mohri M, Uchiyama N, Nakada M.

Physical Risk Factors of Hemorrhagic

Complications Associated with
Angio-Seal Closure Device Use in
Neurointerventional Procedures.
World Neurosurg.

2018 Mar;111:e850-e855.

doi: 10.1016/j.wneu.2017.12.179. 査読
あり

Hayashi Y, Aida Y, Sasagawa Y, Oishi
M, Kita D, Tachibana O, Ueda F,
Nakada M.

Delayed Occurrence of Diabetes
Insipidus After Transsphenoidal
Surgery with Radiologic Evaluation of
the Pituitary Stalk on Magnetic
Resonance Imaging.

World Neurosurg.

2018 Feb;110:e1072-e1077.

doi: 10.1016/j.wneu.2017.11.169. 査読
あり

Misaki K, Uchiyama N, Mohri M, Aida
Y, Uno T, Nakada M.

Unique Venous Drainage of a
Sphenoid Wing Dural Arteriovenous
Fistula with Ocular Symptoms.

World Neurosurg.

2017 Jan;97:753.e1-753.e5.

doi: 10.1016/j.wneu.2016.10.055. 査読
あり

〔学会発表〕(計5件)

会田泰裕、上出智也、石井宏史、北尾康
子、堀 修、中田光俊

くも膜下出血後脳血管攣縮における
RAGE の役割

第 76 回日本脳神経外科学会学術総会
2017 年 10 月 12 日～10 月 14 日、名古
屋

会田泰裕、上出智也、石井宏史、北尾康
子、堀 修、中田光俊

くも膜下出血後の病態における RAGE
の役割

第 18 回日本分子脳神経外科学会 2017
年 8 月 25 日、甲府

会田泰裕、上出智也、北尾康子、堀 修、
中田光俊

くも膜下出血後脳血管攣縮における
RAGE の役割

第 75 回日本脳神経外科学会学術総会
2016 年 9 月 29 日～10 月 1 日、福岡

会田泰裕、上出智也、北尾康子、堀 修、
中田光俊

くも膜下出血後の病態における RAGE
の役割

第 17 回日本分子脳神経外科学会 2016
年 8 月 26 日、東京

会田泰裕、上出智也、見崎孝一、毛利正
直、内山尚之、中田光俊

Angioseal™ 使用後に生じた穿刺部出
血性合併症の検討

第 41 回日本脳卒中学会総会 2016 年 4

月 14 日～16 日、札幌

〔その他〕

ホームページ等

<http://neurosurgery.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

会田 泰裕 (AIDA Yasuhiro)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号 : 50735438