

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19962

研究課題名(和文) くも膜下出血後早期脳損傷の病態解明

研究課題名(英文) Study of the pathogenesis of early brain injury after subarachnoid hemorrhage

研究代表者

藤本 昌志 (Fujimoto, Masashi)

三重大学・医学部附属病院・診療等従事者

研究者番号：00437104

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)：マウスに実験的くも膜下出血を導入することにより、大脳皮質に神経細胞のアポトーシスや炎症が生じ、その結果、神経症状が悪化することを明らかにした。さらに、同部にはマトリセルラー蛋白と呼ばれる特殊な細胞外マトリックス蛋白の1つであるテネイシンCが高発現していることを確認した。テネイシンCの発現をノックアウトすると、くも膜下出血後に生じるカスパーゼ-3依存性の神経細胞アポトーシスが抑制され、神経症状は改善した。また、テネイシンCのノックアウトによりToll様受容体4、nuclear factor- κ Bを介する炎症性サイトカインの発現が低下することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Tenascin-C (TNC), a matricellular protein, is upregulated in brain parenchyma after experimental subarachnoid hemorrhage (SAH). The aim of this study was to investigate effects of TNC knockout (TNKO) on neuronal apoptosis and neuroinflammation, both of which are important constituents of early brain injury (EBI) after SAH. C57BL/6 wild-type mice or TNKO mice underwent sham or filament perforation SAH modeling. Deficiency of TNC significantly alleviated post-SAH neurobehavioral impairments and neuronal apoptosis. The protective effects of TNKO on neurons were associated with the inhibition of a caspase-dependent apoptotic pathway, which was at least partly mediated by Toll-like receptor 4/nuclear factor- κ B/interleukins-1 and -6 signaling cascades. This study first provided the direct evidence that TNC causes post-SAH neuronal apoptosis and neuroinflammation, potentially leading to the development of a new molecular targeted therapy against EBI.

研究分野：脳血管障害

キーワード：くも膜下出血 脳損傷 アポトーシス 炎症 細胞外マトリックス

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は、毎年人口10万人あたり平均10.5人に発生し、近年においても約51%が死亡し、かつ生存者の30%以上に身体的障害を残す重篤な脳血管障害である (Suarez et al. N Engl J Med 354:387-396, 2006)。従来、くも膜下出血後に発生する病態の中で脳血管攣縮が最も予後に影響を与える因子と考えられており、多くの臨床ならびに基礎的研究が行われてきた。しかし、脳血管攣縮に対するランダム化二重盲検臨床試験では、治験薬であるクラゾセンタン (エンドセリン受容体拮抗薬) が脳血管攣縮を有意に抑制したにもかかわらず、くも膜下出血患者の予後は改善しなかった (Vajkoczy et al. J Neurosurg 103:9-17, 2005; Macdonald et al. Stroke 39:3015-3021, 2008)。これらの結果より、くも膜下出血患者の予後を改善するには、脳血管攣縮だけではなく、脳動脈瘤破裂によって生じる血液脳関門障害や脳浮腫、神経細胞のアポトーシス、炎症反応などの早期脳損傷と呼ばれるくも膜下出血特有の脳障害を抑制することが重要と考えられるようになってきた (Macdonald et al. Nat Clin Pract Neurol 3: 256-263, 2007)。特に近年では、このくも膜下出血後の早期脳損傷に対する研究が注目されており、くも膜下出血研究の対象は脳血管攣縮から早期脳損傷にシフトしてきてきた。

テネインCはマトリセルラー蛋白と総称される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、様々な疾患の病態生理との関係が注目されつつあった。

2. 研究の目的

本研究ではテネインC遺伝子改変マウスを用いて、くも膜下出血後の早期脳損傷の中でも神経細胞のアポトーシスに焦点を絞り、テネインCがくも膜下出血後の神経細胞のアポトーシス発生に関与するか、テネインCが関与する場合、どのようなメカニズムで神経細胞のアポトーシスを起こすか、について明らかにする。

本研究は3年計画で、1年目にテネインCノックアウトマウスを用いて、テネインCの発現抑制によりくも膜下出血後の神経細胞のアポトーシス発現が抑制できるか検討した。予備実験で既に、テネインC発現抑制により神経保護効果が得られることを示唆する所見を得ていたため、予想通り、神経細胞のアポトーシス発生は抑制されるものと考えていた。2年目にテネインCが神経

細胞のアポトーシスを誘導する機序を解明するため、各種受容体や細胞内情報伝達機構に関わる蛋白発現変化を調べた。また、発現が増加した蛋白が実際に機能的意義を有するか明らかにするため、各種阻害薬を用いて検討した。3年目は更にテネインCが神経細胞のアポトーシス誘導に寄与していることを確認するため、テネインCの発現を増強した際に神経細胞のアポトーシスが増悪することを確認した。即ち、合成テネインCを脳室内に注入することにより、くも膜下出血後に生じる神経細胞のアポトーシスが増悪するか検討した。

3. 研究の方法

(1)テネインCの発現抑制がくも膜下出血後の神経細胞のアポトーシスに及ぼす影響に関する検討

テネインC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群とくも膜下出血群の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。テネインCのノックアウトマウスはテネインC研究の権威で、テネインC遺伝子改変マウス作成に既に成功している吉田利通・三重大学大学院医学系研究科修復再生病理学教授より提供を受けた (Nishioka, et al. Am J Physiol 298:H1072-1078, 2010)。くも膜下出血モデルは、臨床例と同様に、くも膜下出血後の頭蓋内圧亢進や脳循環障害、脳血管攣縮に加え、神経細胞のアポトーシスを再現できるくも膜下出血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た。くも膜下出血後24時間、48時間、72時間後に致死率、体重変化率、くも膜下出血の重症度、神経症状、アポトーシスの程度を2重盲検的に評価し、テネインC発現抑制によりどのような影響を受けるか検討した。動物モデル作成 (Shiba, et al. Neurobiol Dis 46:172-179, 2012)、くも膜下出血の重症度や神経症状の評価 (Fujimoto, et al. Neurobiol Dis 55:104-109, 2013) およびアポトーシスの評価 (Hasegawa, et al. Stroke 42:477-483, 2010) に関しては我々のグループの方法に準じて行った。

(2)テネインCがくも膜下出血後に神経細胞のアポトーシスを引き起こす機序の解明

テネインCがくも膜下出血後の神経細胞のアポトーシス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た各分子、例えば、Toll様受容体4、インテグリン、上皮成長因子受容体、代表的なmitogen-activated protein kinaseであるextracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2、c-Jun N-terminal kinase (JNK) およびp38、cleaved caspase-3、サイトカイ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行った。テネイシンCの発現部位では、テネイシンCの各構造部位であるassembly domain、epidermal growth factor-like repeats、fibronectin type repeats、fibrinogen globelに特異的なモノクローナル抗体を用いて、テネイシンCのどの分画が発現しているか更に詳細な検討を行った。本研究に必要な抗テネイシンC抗体の作成は、吉田恭子・三重大学マトリックスバイオロジー研究センター長の指導下に行った (Kobayashi, et al. Anal Chem 83:9123-9130, 2011)。

また、テネイシンCが神経細胞のアポトーシスを誘導する分子機構を証明するため、野生型マウスくも膜下出血モデルに例えば、発現増加が予想された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検討した。

(3)テネイシンCがくも膜下出血後に神経細胞のアポトーシスを引き起こすことの再確認

テネイシンCがくも膜下出血後に生じる神経細胞のアポトーシスを誘導するか再確認するため、ヒトグリオーマ細胞からテネイシンCを精製し、くも膜下出血マウスの脳室内に定位的に注入することにより神経細胞のアポトーシスを誘発できるか検討した。ヒトグリオーマ細胞からの全長テネイシンCの精製は吉田利通教授が既に成功している (Yoshida, et al. Virchows Arch 435:496-500, 1999)、吉田教授の指導下、くも膜下出血後の神経細胞のアポトーシスへの関与が示唆されるリコンビナントテネイシンCフラグメントを作成・精製した。各フラグメントを産生する安定発現細胞株は既に作成されていた (Tsunoda, et al. Am J Pathol 162: 1857-1867, 2003)。マウスの脳室内注入などの定位的手技に関しては鈴木秀謙・三重大学大学院医学系研究科脳神経外科学教授が精通しており (Bihua, et al. Neurocrit Care 14:109-117, 2011)、同教授の指導下を実施した。

4. 研究成果

(1)マウスに実験的くも膜下出血を導入することにより、大脳皮質に神経細胞のアポトーシスや炎症が生じることを明らかにした。また、同部にはテネイシンCの発現が誘導されており、これらに伴い、神経症状が悪化することが明らかになった。

(2)テネイシンCをノックアウトすると、カスパーゼ-3依存性に生じる神経細胞のアポトーシスが抑制され、神経症状は改善した。また、テネイシンCのノックアウトによりToll様受容体4、nuclear factor- κ Bを介する炎症性サイトカインの発現が低下するこ

とが明らかになった。

(3)更にテネイシンCノックアウトにより、代表的なmitogen-activated protein kinaseであるERK1/2、JNKおよびp38の脳毛細血管内皮細胞におけるくも膜下出血後の活性化が抑制された。その結果、マトリックス・メタロプロテアーゼ-9が不活化され、くも膜下出血後の血液脳関門障害が有意に抑制された。

(4)これらの研究成果は、テネイシンCがくも膜下出血後の早期脳損傷の発生機序において、極めて重要な役割を果たすことを明らかにした世界初の直接的なエビデンスである。本研究成果は、くも膜下出血後の早期脳損傷に対する新たな治療薬の開発を目指していく上で、テネイシンCが重要な分子標的になりうることを示したものであり、今後の更なる研究の発展へと期待を持たせるものとする。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 15 件)

Lei Liu, Masashi Fujimoto, Fumi Nakano, Hirofumi Nishikawa, Takeshi Okada, Fumihiro Kawakita, Kyoko Imanaka-Yoshida, Toshimichi Yoshida, Hidenori Suzuki, Deficiency of tenascin-C alleviates neuronal apoptosis and neuroinflammation after experimental subarachnoid hemorrhage in mice, Mol Neurobiol, 査読有, 2018 Mar 15. DOI:10.1007/s12035-018-1006-z. [Epub ahead of print]

Masashi Fujimoto, Masato Shiba, Fumihiro Kawakita, Lei Liu, Naoshi Shimojo, Kyoko Imanaka-Yoshida, Toshimichi Yoshida, Hidenori Suzuki, Effects of tenascin-C knockout on cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage in mice, Mol Neurobiol, 査読有, 55 巻, 3 号, 2018, 1951-1958 DOI:10.1007/s12035-017-0466-x

Hirofumi Nishikawa, Yoshinari Nakatsuka, Masato Shiba, Fumihiro Kawakita, Masashi Fujimoto, Hidenori Suzuki, pSEED group, Increased plasma galectin-3 preceding the development of delayed cerebral infarction and eventual poor outcome in non-severe aneurysmal subarachnoid hemorrhage, Transl Stroke Res, 査読有, 9 巻, 2 号, 2018, 110-119 DOI:10.1007/s12975-017-0564-0

Yoshinari Nakatsuka, Mio Terashima, Hirofumi Nishikawa, Fumihiro Kawakita, Masashi Fujimoto, Masato Shiba, Ryuta Yasuda, Naoki Toma, Hiroshi Sakaida,

Hidenori Suzuki, pSEED group, Current status of ruptured cerebral aneurysm treatment in regional hospitals and results of coil embolization, JNET, 査読有, 12 巻, 2018, 109-116, <https://doi.org/10.5797/jnet.oa.2017-0060>

Lei Liu, Fumihiro Kawakita, Masashi Fujimoto, Fumi Nakano, Kyoko Imanaka-Yoshida, Toshimichi Yoshida, Hidenori Suzuki, Role of periostin in early brain injury after subarachnoid hemorrhage in mice, Stroke, 査読有, 48 巻, 2017, 1108-1111
DOI:10.1161/STROKEAHA.117.016629

Yoshinari Nakatsuka, Fumihiro Kawakita, Ryuta Yasuda, Yasuyuki Umeda, Naoki Toma, Hiroshi Sakaida, Hidenori Suzuki, on behalf of the pSEED group(Masashi Fujimoto), Preventive effects of cilostazol against the development of shunt-dependent hydrocephalus after subarachnoid hemorrhage, J Neurosurg, 査読有, 127 巻, 2017, 319-326
DOI:10.3171/2016.5.JNS152907

Fumihiro Kawakita, Masashi Fujimoto, Lei Liu, Fumi Nakano, Yoshinari Nakatsuka, Hidenori Suzuki, Effects of Toll-like receptor 4 antagonists against cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage in mice, Mol Neurobiol, 査読有, 54 巻, 2017, 6624-6633
DOI:10.1007/s12035-016-0178-7

西川拓文、中塚慶徳、川北文博、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急性期血漿中ガレクチン-3 濃度とその意義、脳血管攣縮、査読有、33 巻、2017、31-34

Yoichi Miura, Hiroshi Tanemura, Masashi Fujimoto, Kazuhide Hamada, Keiichi Miyamoto, Naoki Toma, Kyoko Imanaka-Yoshida, Satoshi Matsushima, Toshimichi Yoshida, Waro Taki, Hidenori Suzuki, Aneurysm organization effects of gellan sulfate core platinum coil with tenascin-C in a simulated clinical setting and the possible mechanism, J Stroke Cerebrovasc Dis, 査読有, 25 巻, 4 号, 2016, 771-780
DOI:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis

Masashi Fujimoto, Masato Shiba, Fumihiro Kawakita, Lei Liu, Naoshi Shimojo, Kyoko Imanaka-Yoshida, Toshimichi Yoshida, Hidenori Suzuki, Deficiency of tenascin-C

and attenuation of blood-brain barrier disruption following experimental subarachnoid hemorrhage in mice, J Neurosurg, 査読有, 124 巻, 6 号, 2016, 1693-1702
DOI:10.3171/2015.4.JNS15484

Masashi Fujimoto, Masato Shiba, Fumihiro Kawakita, Lei Liu, Asuka Nakasaki, Naoshi Shimojo, Kyoko Imanaka-Yoshida, Toshimichi Yoshida, Hidenori Suzuki, Epidermal growth factor-like repeats of tenascin-C-induced constriction of cerebral arteries via activation of epidermal growth factor receptors in rats, Brain Res, 査読有, 1642 巻, 2016, 436-444
DOI:10.1016/j.brainres.2016.04.034

Lei Liu, Masashi Fujimoto, Fumihiro Kawakita, Fumi Nakano, Kyoko Imanaka-Yoshida, Toshimichi Yoshida, Hidenori Suzuki, Anti-vascular endothelial growth factor treatment suppresses early brain injury after subarachnoid hemorrhage in mice, Mol Neurobiol, 査読有, 53 巻, 7 号, 2016, 4529-4538
DOI:10.1007/s12035-015-9386-9

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、査読有、24 巻、2015、232-238、https://www.jstage.jst.go.jp/article/jcns/24/4/24_232/_pdf

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、査読有、31 巻、2015、41-44

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、査読有、31 巻、2015、45-48

〔学会発表〕(計 6 件)

Hidenori Suzuki, Masashi Fujimoto, et al., Toll-like receptor 4 and tenascin-C signaling in cerebral vasospasm and brain injuries after subarachnoid hemorrhage, The 14th International Conference on Neurovascular Events after Subarachnoid Hemorrhage, Huntington Beach (USA), 2017, 9.30-10.3

Lei Liu, Masashi Fujimoto, Fumihiro

Kawakita, Fumi Nakano, Hidenori Suzuki, Anti-vascular endothelial growth factor treatment alleviates early brain injury by modulating tenascin-C expression after subarachnoid hemorrhage in mice, The 7th EMBO Meeting, Mannheim (German), 2016, 9.10-9.13

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, 軽井沢プリンスホテル (長野県・軽井沢市), 2015, 9.17-9.19

Fumi Nakano, Masashi Fujimoto, Fumihiro Kawakita, Asuka Nakazaki, Lei Liu, Yoshinori Nakatsuka, Kyoko Imanaka-Yoshida, Toshimichi Yoshida, Hidenori Suzuki, Tenascin-C contracts rat cerebral artery via epidermal growth factor receptor, The 13th International Conference on Neurovascular Events after Subarachnoid Hemorrhage, 軽井沢プリンスホテル (長野県・軽井沢市), 2015, 9.17-9.19

〔図書〕(計 8 件)

Lei Liu, Masashi Fujimoto, et al., Narunia, Anti-vascular endothelial growth factor treatment improves neurobehavioral impairments by modulating tenascin-C expression after subarachnoid hemorrhage in mice, 2017, 158 (43-48)

Masashi Fujimoto, et al., Narunia, Early brain injury and mitogen-activated protein kinase after subarachnoid hemorrhage: Evaluation using tenascin-C knockout mice, 2017, 158 (131-136)

Fumi Nakano, Masashi Fujimoto, et al., Narunia, Receptors that mediate tenascin-C-induced constriction of cerebral arteries in rats, 2017, 158 (151-156)

Lei Liu, Masashi Fujimoto, et al., Springer-Verlag, Vascular endothelial growth factor in brain edema formation after subarachnoid hemorrhage, 2016, 399 (173-177)

Hidenori Suzuki, Masashi Fujimoto, et al., Springer-Verlag, The role of matricellular proteins in brain edema after experimental subarachnoid

hemorrhage, 2016, 399 (151-156)

Hidenori Suzuki, Kenji Kanamaru, Masato Shiba, Masashi Fujimoto, et al., Springer-Verlag, Tenascin-C is a possible mediator between initial brain injury and vasospasm-related and -unrelated delayed cerebral ischemia after aneurysmal subarachnoid hemorrhage, 2015, 373 (117-121)

Masato Shiba, Masashi Fujimoto, et al., Springer-Verlag, Effects of Tenascin-C on Early Brain Injury after Subarachnoid Hemorrhage in Rats, 2015, 373 (69-73)

Masashi Fujimoto, et al., Springer-Verlag, Vasoconstrictive effect of tenascin-C on cerebral arteries in rats, 2015, 373 (99-103)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.medic.mie-u.ac.jp/neurosurge/ry/research/index/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤本 昌志 (FUJIMOTO, Masashi)
三重大学・医学部附属病院・診療等従事者
研究者番号: 00437104

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

鈴木 秀謙 (SUZUKI, Hidenori)
吉田 利通 (YOSHIDA, Toshimichi)
吉田 恭子 (YOSHIDA, Kyoko)
刘 磊 (LIU, Lei)
西川 拓文 (NISHIKAWA, Hirofumi)
中野 英美 (NAKANO, Fumi)
中塚 慶徳 (NAKATSUKA, Yoshinari)