

令和 5 年 4 月 21 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18423

研究課題名（和文）マトリセルラー蛋白を標的としたくも膜下出血後脳損傷の新規診断法の開発

研究課題名（英文）Development of a new diagnostic method for brain injury after subarachnoid hemorrhage targeting matricellular protein

研究代表者

西川 拓文（Nishikawa, Hirofumi）

三重大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10582116

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）： 脳動脈瘤破裂によるくも膜下出血(SAH)の予後を改善するには、従来より注目されていた脳血管攣縮に加え、早期脳損傷(EBI)と総称されるSAH特有の発症直後から潜在性に生じる脳損傷を的確に診断し、早期に治療介入する必要がある。EBIは遅発性脳障害の原因になると考えられているが、現状では診断法が全くない。そこで、特殊な細胞外基質蛋白であるマトリセルラー蛋白と総称される一群の蛋白の血中濃度を測定することで、病態生理を反映したバイオマーカーとして活用し、マトリセルラー蛋白を分子標的としたSAH後の遅発性脳損傷に対する新たな診断法を開発するための基礎データを得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果は、脳動脈瘤破裂によるくも膜下出血発症後3日以内の急性期に測定する複数の血中マトリセルラー蛋白濃度単独あるいは組み合わせにより、その後に生じる遅発性脳損傷の原因病態を特定するための重要な基礎データになる。これらのデータはマトリセルラー蛋白測定診断キットの開発につながる可能性を秘めており、従来、不可能であったくも膜下出血後の遅発性脳損傷の早期診断法の確立に発展可能と考える。また、将来的には遅発性脳損傷の病態に応じた個別化治療が初めて可能となり、くも膜下出血の予後改善に繋がることが期待できる。

研究成果の概要（英文）： In order to improve the prognosis of subarachnoid hemorrhage (SAH) due to cerebral aneurysm rupture, it is necessary to accurately and early diagnose microcirculatory disturbance following SAH-specific early brain injury (EBI), in addition to cerebral vasospasm which has been the focus of attention in the past. Early diagnosis allows us to treat them at an early stage. However, there are currently no diagnostic methods for EBI-related pathologies that may lead to delayed brain damage. Therefore, the relationships between a group of proteins collectively called matricellular protein, which is a special extracellular matrix protein, and EBI-related pathologies were clarified in SAH models. In addition, matricellular proteins were measured in the peripheral blood in SAH patients, and basic data were obtained to use the matricellular proteins as biomarkers reflecting EBI-related pathologies and cerebral vasospasm, and to develop a new diagnostic method for EBI-related pathologies.

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

### 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(SAH)は、最も重篤な脳損傷を引き起こす脳卒中である。働き盛りの年代の人々が突然、罹患し、その社会復帰率は極めて低い。また今後、人口の高齢化に伴いその発症率は更に高まることが予想されている。従って、予後改善を目指した SAH 後脳損傷に対する研究の社会的優先度は極めて高い。我々は前向き全国調査(Taki, et al. World Neurosurg 76:437-445, 2011)を実施し、介入可能な予後不良因子として、現在でも発症後 4～14 日に生じる遅発性脳損傷が最も重要であることを明らかにした。最近では遅発性脳損傷の原因として、従来、注目されていた脳血管攣縮よりも、早期脳損傷(EBI)と総称される SAH 特有の発症直後から潜在性に生じ始める脳損傷の方が重要という考えがある(Macdonald. Nat Rev Neurol 10:44-58, 2014)。SAH 後の遅発性脳損傷を効果的に治療するためには、発症する前に的確に診断し、原因に応じた早期治療を実施することに尽きる。しかし、現状では遅発性脳損傷の原因として想定される病態のうち、発症前に的確に臨床的に診断可能な病態は脳血管攣縮しかないのが問題である。この脳血管攣縮の制御だけでは SAH 患者の予後改善には結びつかないことは、近年の大規模臨床試験により繰り返し実証されてきた(Macdonald, et al. Lancet Neurol 10:618-25, 2011)。EBI の病態は殆ど明らかになっていないが、大脳皮質拡張性抑制(CSD)が SAH 後脳に生じると、他疾患とは異なり、脳虚血の原因になること、しかも脳血管攣縮を伴わずに脳梗塞の原因になり得ることが臨床的に報告され、注目されている(Woitzik, et al. J Cereb Blood Flow Metab 32:203-212, 2012)。CSD を臨床的に診断するためには、開頭術時に多極の脳表電極を挿入し、所謂、攣縮期を通じて 1～2 週間留置し続け、slow potential change が隣接チャンネルに広がるのを検出する必要があるが、現状では CSD の診断をしても治療法がないため、脳表電極を挿入することは単なる研究目的となり、一方で感染リスクが増加する等の倫理的問題が生じる。また近年、普及してきたコイル塞栓術後の患者や、CSD 以外の EBI 表現型(血液脳関門障害、非痙攣性てんかん、脳微小循環障害、炎症反応や神経細胞アポトーシスなど)に対する臨床的診断法は全くないのが現状である。従って、SAH 患者の予後改善には、低侵襲の SAH 後 EBI の早期診断法および遅発性脳損傷の的確な評価法の確立と、新たな脳保護治療法の開発が必須である。

### 2. 研究の目的

SAH 後遅発性に症状や脳梗塞が出現する場合、本邦ではその原因を脳血管攣縮に求める場合が多い。一方、米国の SAH 診療ガイドラインでは、症候性脳血管攣縮という用語は使用せず、delayed cerebral ischemia (DCI) を使用している。つまり、脳血管攣縮は DCI の原因の一部に過ぎないという考え方である。しかし、臨床上、脳血管攣縮以外の原因を診断するのは現状では極めて困難である。そこで、マトリセルラー蛋白と呼ばれる特殊な蛋白質を分子標的とした SAH 後の遅発性脳損傷に対する新たな診断法を開発することを本研究の目的とする。同定されたマトリセルラー蛋白は更に治療標的として発展する可能性がある。

マトリセルラー蛋白は臓器の恒常性維持、各種生理反応や病的反応に深く関与する特殊な分泌型の細胞外基質蛋白群であるが、マトリセルラー蛋白と神経機能、あるいは血管作動性との関係、特に複数のマトリセルラー蛋白の相互作用に着目した研究は前例がない。従って、細胞外基質から脳損傷、特に SAH 後 DCI の病態解明、早期診断、治療に迫る本研究は他に類をみない新規性、独創性を有する。加えて、生体内では、ある特定分子の作用は一面的ではなく、同一疾患であっても急性期と慢性期で、あるいは併発する病態毎に異なり、ある病態のみを再現した動物実験では有効だが、複数の病態が混在する臨床治験では無効となる一因になってきたが、マトリセルラー蛋白の特殊性はこのような生体内分子の多面性をも説明できる可能性があり、新薬開発に画期的な進歩をもたらす可能性がある。我々は以前よりマトリセルラー蛋白が SAH 後の遅発性脳損傷を制御する可能性を報告し、高く評価されてきた(Nishikawa & Suzuki. Brain Sci 8:30. doi:10.3390/brainsci8020030, 2018; Suzuki, Nishikawa & Kawakita. Neural Regen Res 13:1175-1178, 2018)。本研究ではマトリセルラー蛋白の特徴を利用し、世界初の細胞外基質を基盤とした診断法の開発を目指すなど、臨床に直結する意義は非常に大きい。さらに本研究により SAH 発症 3 日以内に測定する複数の血中マトリセルラー蛋白濃度単独あるいは組み合わせにより、その後に生じる DCI の原因病態が特定できれば、次のステップとしてマトリセルラー蛋白測定診断キットを開発するなど、従来、不可能であった SAH 後 DCI の早期診断法の確立に発展可能と考える。また、DCI の病態に応じた個別化治療が初めて可能となり、SAH の予後改善に繋がることが期待できる。SAH 後脳損傷は、出血性、虚血性、その他の脳損傷の要素を含むことから、本研究で同定されるマトリセルラー蛋白は、他疾患に起因する様々な脳損傷にも関与している可能性があり、病態解明のための突破口となり、今後の治療法開発のための新たな方向性を示すと考ええる。

### 3. 研究の方法

本研究は以下の 2 方面より実施した。

#### 1) 遅発性脳損傷におけるマトリセルラー蛋白の役割の解明

血管内穿通法によるマウス SAH モデルにて、遅発性脳損傷の原因病態として想定される脳血管攣縮(India ink angiography)、血液脳関門障害(Evans blue 法)、非痙攣性てんかん(脳表電極)、微小循環障害、炎症反応や神経細胞アポトーシスを分子生物学的手法、電気生理検査などを駆使して経時的に評価した。脳組織を経時的に採取し、マトリセルラー蛋白の発現変化を順次、ウェスタンブロット法や免疫染色にて確認、遅発性脳損傷の病態に関与するマトリセルラー蛋白の候補を同定すると共に、経時的発現変化を調べた。

次に、SAH 後の遅発性脳損傷の各原因病態への関与が示唆されるマトリセルラー蛋白や中和抗体を作製し、健常マウスや SAH マウスの脳室内に定量的に注入することで SAH 後の遅発性脳損傷を誘導あるいは抑制できるか検討した。さらに各候補マトリセルラー蛋白と遅発性脳損傷の病態との相互関係、その機能やシグナル伝達を解析した。またマトリセルラー蛋白は SAH 後に誘導される蛋白分解酵素による修飾により、その機能が大きく異なる可能性があるため、マトリセルラー蛋白フラグメント生成に関わる蛋白分解酵素の制御などを加えることにより、SAH 後病態におけるマトリセルラー蛋白の機能の解明を試みた。

#### 2) 急性期血中マトリセルラー蛋白濃度測定による遅発性脳損傷病態診断への応用

三重大大学を中心に実施中の SAH 患者の臨床データ・検体を経時的に集積する前向き多施設共同研究を利用した(倫理委員会承認番号 2544)。すなわち、既に 300 症例以上の SAH 患者の臨床情報及び経時的に集積され-80℃に保存された血漿を有するので、これらの検体を用いて、マウス脳で遅発性脳損傷の特定病態の原因物質であることが判明したマトリセルラー蛋白を ELISA 法で定量した (Nishikawa, et al. Transl Stroke Res 9:110-119, 2018; Nakatsuka, et al. JNET 12:109-116, 2018; Nakatsuka, et al. Mol Neurobiol 55:6841-6849, 2018)。SAH 急性期に誘導される複数のマトリセルラー蛋白濃度測定結果の単独あるいは組み合わせにより、その後に生じる遅発性脳損傷およびその原因病態を予知できるか、様々な臨床情報を加味して統計学的に検討した。更に、マトリセルラー蛋白の測定結果を利用し新たに作成した診断基準が既存の様々な臨床症状や画像上の grading よりも、より正確に遅発性脳損傷やその原因病態を診断あるいは予知することが可能か、検討した。

#### 4. 研究成果

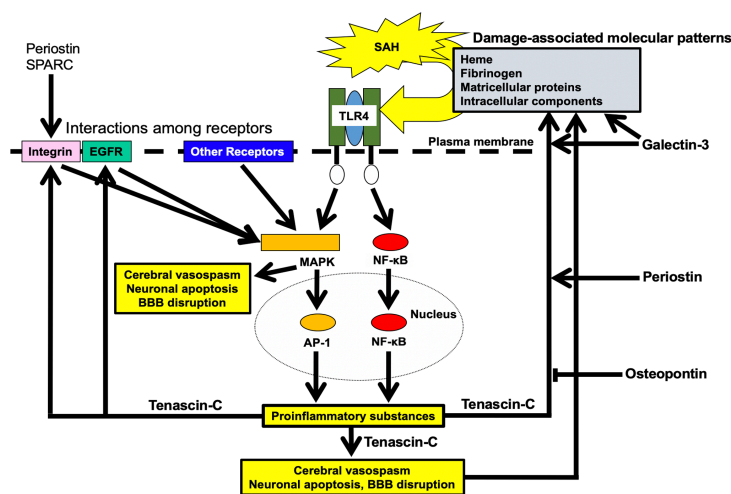
SAH 後の遅発性脳損傷の原因病態に関与するマトリセルラー蛋白の候補としてテネイシン C、ペリオスチン、オステオポンチン、ガレクチン-3 や secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) がなり得ることが明らかになった (右図)。

テネイシン C は SAH 後に脳実質(アストロサイト、神経細胞、毛細血管内皮細胞)、脳動脈壁(内皮細胞、平滑筋細胞、外膜細胞)およびくも膜下腔の炎症細胞で誘導された。誘導されたテネイシン C は Toll 様受容体 4、上皮成長因子受容体や様々なインテグリンに結合し、MAP キナーゼや NF- $\kappa$ B を介するシグナル伝達により脳血管攣縮、血液脳関門障害、神経細胞アポトーシスや非痙攣性てんかんの原因になることが明らかになった。また、テネイシン C はエンドセリン A 受容体の発現を増加させたり、ペリオスチン、オステオポンチンやガレクチン-3 などの他のマトリセルラー蛋白と相互作用した。

ペリオスチンは SAH 後に脳毛細血管内皮細胞や神経細胞で誘導され、テネイシン C と互いの誘導を誘発し合い、MAP キナーゼや NF- $\kappa$ B を介するシグナル伝達を活性化させた。結果として、ペリオスチンの誘導は血液脳関門障害や神経細胞アポトーシスの原因となったが、脳血管攣縮との関連は明らかではなかった。

ガレクチン-3 は SAH 後に脳毛細血管内皮細胞で誘導され、神経炎症や血液脳関門障害の原因となったが、脳血管攣縮との関連は明らかではなかった。ガレクチン-3 はテネイシン C と直接、結合し得るが、互いの関係については明らかになっておらず、今後の課題である。

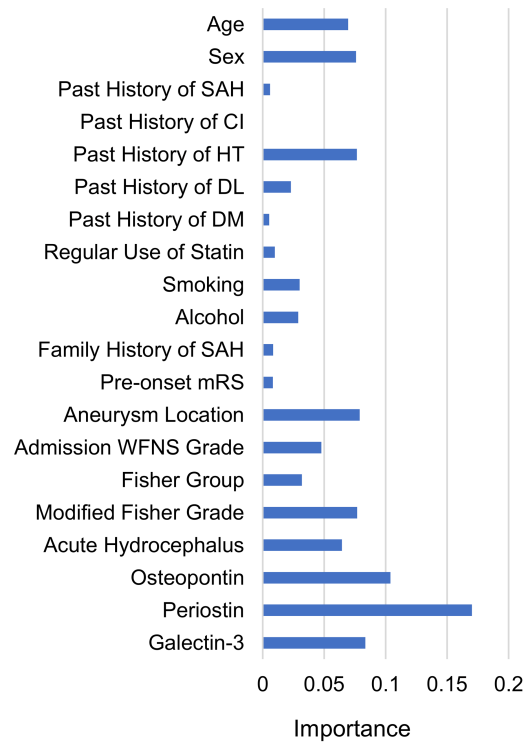
オステオポンチンの発現細胞は基本的にテネイシン C と同様であるが、より遅発性に発現し、テネイシン C に対し拮抗作用を発揮すると考えられた。すなわち、脳血管攣縮、血液脳関門障害や神経細胞アポトーシスの発生を抑制し、脳保護効果を示した。しかし、オステオポンチンの発現が増強した状態が長期間続くと、脳脊髄液シャント術を要する慢性水頭症の原因になることが明らかになった。



SPARC は SAH 後にアストロサイトや脳毛細血管内皮細胞で誘導され、少なくとも血液脳関門障害の原因になることが明らかになった。

SAH 患者での臨床研究では、テネイシン C、ペリオスチン、オステオポンチン、ガレクチン-3、SPARC はいずれも SAH 後急性期に血中で増加した。これらのうち、テネイシン C は脳血管攣縮および脳血管攣縮を伴わない遅発性脳虚血の予知に有効であったが、他のペリオスチン、オステオポンチン、ガレクチン-3、SPARC はいずれも脳血管攣縮を伴わない遅発性脳虚血の予知のみに有効であった。

機械学習を用いた研究では、評価項目として採用された SAH 後急性期のペリオスチン、オステオポンチン、ガレクチン-3 の血中濃度は、遅発性脳虚血の予知に広く利用されている世界脳神経外科連合 (WFNS) グレードや modified Fisher grade よりも遅発性脳虚血の予知に有効である可能性が示された (右図)。



# 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kanamaru H, Kawakita F, Nishikawa H, Nakano F, Asada R, Suzuki H	4. 巻 18
2. 論文標題 Clarithromycin Ameliorates Early Brain Injury After Subarachnoid Hemorrhage via Suppressing Periostin-Related Pathways in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurotherapeutics	6. 最初と最後の頁 1880-1890
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13311-021-01050-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 金丸英樹、川北文博、西川拓文、中野英美、浅田玲緒尚、鈴木秀謙	4. 巻 36
2. 論文標題 マウスくも膜下出血モデルにおけるクラリスロマイシン投与による脳保護効果とペリオスチンの発現変化	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 脳血管攣縮	6. 最初と最後の頁 123 ~ 125
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 中野英美、西川拓文、中塚慶徳、川北文博、金丸英樹、岡田 健、芝 真人、鈴木秀謙	4. 巻 36
2. 論文標題 くも膜下出血後に発現するマトリセラー蛋白間の関係と早期脳損傷	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 脳血管攣縮	6. 最初と最後の頁 15 ~ 19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okada T, Kawakita F, Nishikawa H, Nakano F, Liu L, Suzuki H	4. 巻 56
2. 論文標題 Selective Toll-like receptor 4 antagonists prevent acute blood-brain barrier disruption after subarachnoid hemorrhage in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol Neurobiol	6. 最初と最後の頁 976-985
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12035-018-1145-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakano F, Kawakita F, Liu L, Nakatsuka Y, Nishikawa H, Okada T, Kanamaru H, Pak S, Shiba M, Suzuki H	4. 巻 56
2. 論文標題 Anti-vasospastic effects of epidermal growth factor receptor inhibitors after subarachnoid hemorrhage in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol Neurobiol	6. 最初と最後の頁 4730-4740
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12035-018-1400-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanioka S, Ishida F, Nakano F, Kawakita F, Kanamaru H, Nakatsuka Y, Nishikawa H, Suzuki H, pSEED group	4. 巻 56
2. 論文標題 Machine learning analysis of matricellular proteins and clinical variables for early prediction of delayed cerebral ischemia after aneurysmal subarachnoid hemorrhage	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol Neurobiol	6. 最初と最後の頁 7128-7135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12035-019-1601-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakano F, Liu L, Kawakita F, Kanamaru H, Nakatsuka Y, Nishikawa H, Okada T, Shiba M, Suzuki H	4. 巻 67
2. 論文標題 Morphological characteristics of neuronal death after experimental subarachnoid hemorrhage in mice using double immunoenzymatic technique	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Histochem Cytochem	6. 最初と最後の頁 919-930
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1369/0022155419878181	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 鈴木秀謙、川北文博、浅田玲緒尚、山本篤志、宮崎敬大、山中拓也、佐藤丈典、辻 正範、西川拓文、藤本昌志、三浦洋一、安田竜太、当麻直樹
2. 発表標題 くも膜下出血の治療
3. 学会等名 第41回日本脳神経外科コンgres（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷岡 悟、石田藤麿、中野芙美、川北文博、金丸英樹、中塚慶徳、西川拓文、鈴木秀謙
2. 発表標題 入院早期のマトリセラー蛋白と臨床データを用いた機械学習によるDCIの発生予測
3. 学会等名 第36回スバズム・シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中野芙美、西川拓文、中塚慶徳、川北文博、金丸英樹、岡田 健、芝 真人、鈴木秀謙
2. 発表標題 くも膜下出血後のテネイシンCの発現変化とその他のマトリセラー蛋白との関連
3. 学会等名 第36回スバズム・シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hidenori Suzuki, Fumihiro Kawakita, Fumi Nakano, Hideki Kanamaru, Hirofumi Nishikawa, Masashi Fujimoto, Masato Shiba
2. 発表標題 Tenascin-C as a target for intervention in aneurysmal subarachnoid hemorrhage
3. 学会等名 The 3rd Meeting of China-Japan Neurosurgery Alliance (The 11th China-Japan Friendship Neurosurgical Symposium) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

#### 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

#### 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------