

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 11 日現在

機関番号： 14101  
 研究種目： 基盤研究（C）  
 研究期間： 2010 ～ 2012  
 課題番号： 22591584  
 研究課題名（和文） くも膜下出血後脳損傷の病態解明と新規治療法の開発  
 研究課題名（英文） Elucidation of pathogenesis and new treatment for brain injury after subarachnoid hemorrhage

## 研究代表者

鈴木 秀謙（SUZUKI HIDENORI）  
 三重大学・大学院医学系研究科・教授  
 研究者番号： 90345976

研究成果の概要（和文）：くも膜下出血（SAH）後の脳損傷は重大な予後不良因子であり、その本態の1つは血液脳関門（BBB）障害である。我々はラットの SAH モデルを用いて、マトリックス細胞蛋白（MCP）の1つであるオステオポンチンが SAH 後の BBB 障害の回復期に誘導され、脳損傷に対し保護的に作用することを証明した。更に、別の MCP 蛋白であるテネイシン C が SAH 後急性期に誘導され、オステオポンチンとは逆に脳損傷を引き起こす可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：Subarachnoid hemorrhage (SAH)-induced early brain injury (EBI) potentially contributes to poor outcome, one of whose key pathologic manifestation is the breakdown of the blood-brain barrier (BBB). We determined the role of osteopontin (OPN), a pleiotropic extracellular matrix glycoprotein (matricellular protein [MCP]), in the post-SAH BBB disruption in rats. The OPN levels in the brain were significantly induced and peaked at 72 hours after SAH, in the recovery phase of EBI. OPN siRNA significantly blocked the endogenous OPN induction and aggravated neurological impairment and BBB disruption at 72 hours after SAH. Pre-SAH administration of recombinant OPN (r-OPN) significantly prevented a loss in body weight, neurological impairment, brain edema and BBB disruption compared with the control rats. Treatment with r-OPN was associated with the deactivation of NF- $\kappa$ B activity, inhibition of MMP-9 induction, and the consequent preservation of cerebral microvessel basal lamina proteins and tight junction proteins. These findings suggest the protective effects of OPN against BBB disruption after SAH. In addition, we obtained new findings, suggesting that tenascin-C, another MCP, causes brain injury after SAH.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：脳神経外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：脳血管障害学、くも膜下出血、脳損傷、細胞外基質蛋白

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現在

においても重篤な脳血管障害である。従来、脳血管攣縮がくも膜下出血後の最も重要な予後不良かつ予防可能な因子とされ、過去50年以上にわたり広範に研究されてきた。しかし、最近、脳血管攣縮に加え、早期脳損傷と総称される病態の解明と新たな治療法の開発が、くも膜下出血の予後改善には不可欠であると強調されてきた。

オステオポンチンはマトリックス細胞蛋白の1つで、その生物学的作用は多様であるが、様々な状況下で組織損傷に対し保護的に作用すると報告されてきた。また、我々は既にオステオポンチンがくも膜下出血後の脳に誘導されることを明らかにしていた。そこで、くも膜下出血後の脳におけるオステオポンチンやその他のマトリックス細胞蛋白の役割を明らかにすることは、くも膜下出血後の早期脳損傷の病態生理の解明や、それに対する治療法の開発に大いに貢献するものと考えた。

## 2. 研究の目的

脳動脈瘤破裂によるくも膜下出血患者の予後を改善するためには、脳血管攣縮の予防や治療だけでは不十分で、脳動脈瘤破裂による脳損傷そのものに対する対策が必要である。我々は既にマトリックス細胞蛋白の1つであるオステオポンチンがくも膜下出血後の脳で誘導され、脳保護効果を示すことを明らかにした。本研究ではラットのくも膜下出血モデルを用い、オステオポンチンの脳保護効果の機序を血液脳関門保護効果に焦点を絞り明らかにした。また、オステオポンチン以外のマトリックス細胞蛋白がくも膜下出血後の脳損傷に関与するか調べた。

## 3. 研究の方法

オスのSDラットを用い、endovascular perforation modelを作成した。簡潔に述べると、仰臥位にて頸部を正中切開し、左外頸動脈より先端を尖らした4-0モノフィラメントナイロン糸を15-18mm挿入し、前大脳動脈と中大脳動脈の分岐部で穿通させ、くも膜下出血を作成した。Sham群ではナイロン糸を動脈に穿通させずに回収した。

くも膜下出血作成24時間前に、くも膜下出血群、Sham群のラットにそれぞれオステオポンチン(OPN) siRNA、negative control siRNAおよびvehicleを定位的に左側脳室内に投与した。くも膜下出血後24時間および72時間後に、神経学的所見とくも膜下出血の重症度評価をおこない、Western blot法および免疫組織化学法にて左大脳半球におけるOPN、MMP-9やその基質蛋白の発現変化を評価した。

次に外因性OPNがくも膜下出血後に生じる血液脳関門障害を防ぐか調べるために、recombinant OPNまたはvehicleを、くも膜

下出血作成1時間前にくも膜下出血群、Sham群のラットにそれぞれ定位的に脳室内投与した。血液脳関門障害はEvans blueの血管外漏出をspectrophotometryを用いて測定することにより評価し、脳浮腫はwet/dry weight methodにて測定した。またWestern blot法および免疫組織化学法により、左大脳半球におけるMMP-9およびMMP-9の基質や炎症性マーカーの発現変化を調べた。更に、Arg-Gly-Asp containing hexapeptide (GRGDSP、integrin receptor antagonist) が recombinant OPNの血液脳関門に対する保護効果を阻害するか否か調べた。

最後に、OPNとは別のマトリックス細胞蛋白であるテネインCがくも膜下出血後の脳で発現されるか、発現された場合、テネインCと脳損傷との関係について、免疫組織学的に検討した。更に血小板由来成長因子阻害薬イマチニブを投与して、テネインCの発現を抑制した場合に、脳損傷の程度がどのように影響を受けるか調べた。

## 4. 研究成果

① OPNはくも膜下出血後の血液脳関門障害部を中心に遅発性に誘導される

くも膜下出血後の血液脳関門障害は24時間後に最も重篤で、72時間後にはほぼ軽快した。一方、OPNの発現はくも膜下出血後72時間後に最も強く、新生血管内皮や活性化されたグリア細胞に強く発現した。OPNの発現分布はほぼ血液脳関門障害が生じた部位と一致した。

② OPN siRNAのくも膜下出血前投与は血液脳関門障害を増悪する

OPN siRNAによりくも膜下出血後の脳における内因性OPNの発現はほぼ完全に抑制された。この効果は、mitogen-activated protein kinase (MAPK)、NF $\kappa$ B、MMP-9の活性化を伴った。また、MMP-9の基質である血管基底膜やtight junction蛋白のdegradationを伴った。

③ recombinant OPNのくも膜下出血前投与は血液脳関門障害を抑制する

外因性OPNの投与により、くも膜下出血後の体重減少、神経症状および血液脳関門障害は有意に抑制された。この効果は、MAPK、NF $\kappa$ B、MMP-9の不活性化を伴った。また、GRGDSPの投与により外因性OPNの脳保護効果は消失し、OPNの受容体がRGD依存性インテグリンであることが示された。

④ テネインCは脳損傷を引き起こす

くも膜下出血後の脳でテネインCは、脳損傷のピークである24時間後に主にグリア細胞で誘導された。また血小板由来成長因子阻害薬イマチニブを投与して、テネインCの発現を抑制すると脳損傷は軽減した。

以上より、2つのマトリックス細胞蛋白、

OPN とテネascin C がくも膜下出血後の脳に対し異なる作用を示すことが明らかになった。すなわち、OPN は脳保護作用を示し、テネascin C は脳に対し有害作用を示した。これら2つのマトリックス細胞蛋白の発現をコントロールすることにより、くも膜下出血後脳損傷に対する新しい治療戦略が開発できる可能性があり、更に研究を進める価値があると考えられる。

#### 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 40 件)

- ① Masato Shiba, Hidenori Suzuki, et al, Imatinib mesylate prevents cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage via inhibiting tenascin-C expression in rats, *Neurobiol Dis*, 査読有, 46 巻, 2012, 172-179
- ② Yu Hasegawa, Hidenori Suzuki, et al, Treatment with sodium orthovanadate reduces blood-brain barrier disruption via phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN) phosphorylation in experimental subarachnoid hemorrhage, *J Neurosci Res*, 査読有, 90 巻, 2012, 691-697
- ③ Orhan Altay, Hidenori Suzuki, et al, Isoflurane attenuates blood-brain barrier disruption in ipsilateral hemisphere after subarachnoid hemorrhage in mice, *Stroke*, 査読有, 43 巻, 2012, 2513-2516
- ④ Yan Zhan, Chunhua Chen, Hidenori Suzuki, et al, Hydrogen gas ameliorates oxidative stress in early brain injury after subarachnoid hemorrhage in rats, *Crit Care Med*, 査読有, 40 巻, 2012, 1291-1296
- ⑤ 鈴木秀謙、他、アルファ7ニコチン性受容体作動薬 PNU-282987 のくも膜下出血後 early brain injury 抑制効果、脳血管攣縮、査読有、28 巻、2012、13-18
- ⑥ 鈴木秀謙、他、テネascin C と early brain injury および脳血管攣縮との関連、脳血管攣縮、査読有、28 巻、2012、1-4
- ⑦ 鈴木秀謙、他、脳血管疾患とテネascin C (総説)、呼吸と循環、査読無、59 巻、2011、1099-1105
- ⑧ Qingyi Ma, Bin Huang, Nikan Khatibi, William Rolland II, Hidenori Suzuki, et al, PDGFR- $\alpha$  inhibition preserves blood-brain barrier after intracerebral hemorrhage, *Ann Neurol*, 査読有, 70 巻, 2011, 920-931
- ⑨ Hidenori Suzuki, et al, Cerebrospinal fluid tenascin-C in cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage, *J Neurosurg Anesthesiol*, 査読有, 23 巻, 2011, 310-317
- ⑩ Yu Hasegawa, Hidenori Suzuki, et al, Preservation of tropomyosin-related kinase B (TrkB) signaling by sodium orthovanadate attenuates early brain injury after subarachnoid hemorrhage in rats, *Stroke*, 査読有, 42 巻, 2011, 477-483
- ⑪ Wanqiu Chen, Qingyi Ma, Hidenori Suzuki, et al, Osteopontin reduced hypoxia-ischemia neonatal brain injury by suppression of apoptosis in a rat pup model, *Stroke*, 査読有, 42 巻, 2011, 764-769
- ⑫ Hidenori Suzuki, et al, Tenascin-C is induced in cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in rats and humans, *Neurol Res*, 査読有, 32 巻, 2010, 179-184
- ⑬ Hidenori Suzuki, et al, Protective effects of recombinant osteopontin on early brain injury after subarachnoid hemorrhage in rats, *Crit Care Med*, 査読有, 38 巻, 2010, 612-618
- ⑭ Hidenori Suzuki, et al, Mechanisms of osteopontin-induced stabilization of blood-brain barrier disruption after subarachnoid hemorrhage in rats, *Stroke*, 査読有, 41 巻, 2010, 1783-1790
- ⑮ Hidenori Suzuki, et al, Recombinant osteopontin in cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage, *Ann Neurol*, 査読有, 68 巻, 2010, 650-660

[学会発表] (計 28 件)

- ① 鈴木秀謙、他、テネascin C と early brain injury および脳血管攣縮との関連 (シンポジウム)、第 28 回スパズムシンポジウム、2012 年 4 月 26 日、福岡
- ② 藤本昌志、鈴木秀謙、他、Tenascin-C は脳動脈を収縮させる (シンポジウム)、第 28 回スパズムシンポジウム、2012 年 4 月 26 日、福岡
- ③ 芝 真人、鈴木秀謙、他、ラットくも膜下出血後 early brain injury におけるテネascin C の役割 (シンポジウム)、第 28 回スパズムシンポジウム、2012 年 4 月 26 日、福岡
- ④ 藤本昌志、鈴木秀謙、他、Tenascin-C の脳動脈収縮効果、第 101 回日本病理学会総会、2012 年 4 月 26 日、東京
- ⑤ Hidenori Suzuki、他、Possible role of

- osteopontin and tenascin-C in cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in rats、第10回オステオポンチン研究会、2011年6月18-19日、札幌
- ⑥ Hidenori Suzuki, et al, Matricellular protein: a new player in cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage, The 11th International Conference on Neurovascular Events after Subarachnoid Hemorrhage, 2011年7月21-23日, Cincinnati, USA
- ⑦ Masato Shiba, Hidenori Suzuki, et al, Role of platelet-derived growth factor in cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in rats, The 11th International Conference on Neurovascular Events after Subarachnoid Hemorrhage, 2011年7月21-23日, Cincinnati, USA
- ⑧ 芝 真人、鈴木秀謙、他、くも膜下出血後脳血管攣縮におけるテネイシンCの役割、第1回テネイシンフォーラム、2011年11月5日、津
- ⑨ 鈴木秀謙、くも膜下出血後脳損傷および脳血管攣縮におけるマトリックス細胞蛋白質の役割 (特別講演)、第32回東海クモ膜下出血研究会、2011年10月28日、名古屋
- ⑩ 芝 真人、鈴木秀謙、他、くも膜下出血後脳血管攣縮におけるPDGF受容体の役割、第70回日本脳神経外科学会学術総会、2011年10月12-14日、横浜
- ⑪ 藤本昌志、鈴木秀謙、他、Tenascin-Cの脳動脈収縮効果およびその機序についての検討、第70回日本脳神経外科学会学術総会、2011年10月12-14日、横浜
- ⑫ 鈴木秀謙、他、ラットくも膜下出血モデルにおける神経学的評価(シンポジウム)、第27回スパズムシンポジウム、2011年7月30日、京都
- ⑬ 芝 真人、鈴木秀謙、他、ラットくも膜下出血モデルにおけるImatinibの抗脳血管攣縮効果(シンポジウム)、第27回スパズムシンポジウム、2011年7月30日、京都
- ⑭ Hidenori Suzuki, et al, Effects of recombinant osteopontin on blood-brain barrier disruption after subarachnoid hemorrhage in rats, The

- 3rd International Conference on Intracerebral Hemorrhage, 2010年3月7-9日, Rancho Mirage, USA
- ⑮ 鈴木秀謙、他、くも膜下出血後の血液脳関門障害におけるオステオポンチンの役割、第69回日本脳神経外科学会学術総会、2010年10月27-29日、福岡

[図書] (計4件)

- ① Hidenori Suzuki, et al, Springer-Verlag, Matricellular protein: a new player in cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage, 2013, 213-218
- ② Hidenori Suzuki, et al, Humana Press, Neurobehavioral assessments of subarachnoid hemorrhage, 2012, 435-440
- ③ Hidenori Suzuki, et al, Springer-Verlag, Role of osteopontin in early brain injury after subarachnoid hemorrhage in rats, 2011, 75-79
- ④ Hidenori Suzuki, et al, Springer-Verlag, Effects of recombinant osteopontin on blood-brain barrier disruption after subarachnoid hemorrhage in rats, 2011, 231-236

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木 秀謙 (SUZUKI HIDENORI)  
三重大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号： 90345976

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし