

テネイシン C を標的としたくも膜下出血後脳損傷に対する治療法開発のための基礎的研究

鈴木秀謙

三重大学大学院医学系研究科 臨床医学系講座 脳神経外科学

【研究の背景】

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。

【目 的】

本研究では近年、注目されている疾患非特異的に様々な反応を修飾する特殊な細胞外基質蛋白の 1 つであるテネイシン C に焦点を絞り、テネイシン C が SAH 後脳損傷を引き起こす機序を解明するとともに、テネイシン C の特異な生理活性を活かした全く新しい脳保護治療法の開発を目指した新たな方向性を示すことを目的とする。

【方 法】

野生型マウスおよびテネイシン C ノックアウトマウスに SAH の急性期モデルとして確立している血管内穿通法による SAH を導入した。SAH 後 24 時間後および 48 時間後に神経学的所見 (改訂ガルシア法)、SAH の血腫量 (スガワラらによる SAH grade)、脳浮腫 (wet/dry 法による脳水分含有量測定)、血液脳関門障害 (エバンス・ブルー法)、脳血管攣縮 (墨汁法による血管造影) を評価し、テネイシン C のノックアウトにより、どのような影響を受けるか検討した。また、野生型マウスの SAH モデルにおいて、テネイシン C の免疫染色を実施し、テネイシン C 発現細胞を同定した。さらに、ウェスタンブロット法にてテネイシン C 受容体およびその下流の情報伝達機構を探索し、各種拮抗薬を用いてその関与を確認した。次いで、テネイシン C ノックアウトマウスの SAH モデルに合成テネイシン C 蛋白を定量的に脳室内 (髄腔内) 投与し、テネイシン C のノックアウトにより抑制されたと考えられる各事象が再び発現されるか確認した。

テネイシン C が脳動脈および脳実質に作用するために必要な受容体候補の特異的拮抗薬を野生型マウス SAH モデルに投与し、SAH 後脳損傷を抑制する治療薬として利用できるか検討した。さらに SAH 患者の臨床検体を経時的に採取し、テネイシン C が臨床例においても SAH 後脳損傷に伴い発現するか検討した。

【結 果】

テネイシン C ノックアウトは sham 手術を実施したマウスには全ての評価項目において影響を認めなかった。また SAH モデルにおいてもテネイシン C ノックアウトはバイタルサインや SAH 血腫量に影響を与えなかった。

SAH を導入すると、野生型マウスでは sham 群と比較して有意に神経所見は悪化し、脳浮腫、血液脳関門障害および脳血管攣縮を認めた。テネイシン C ノックアウトマウスでは、SAH の重症度が同等であったにも拘らず、野生型マウス SAH モデルと比較して神経所見、脳浮腫、血液脳関門障害、脳血管攣縮のいずれにおいても有意な改善を認めた。SAH 後のテネイシン C の発現は脳実質では大脳皮質を中心に神経網で認め、脳動脈では外膜を中心に、一部平滑筋層でも認めた。また、分裂促進因子活性化タンパク質 (MAP) キナーゼの活性化を脳毛細血管内皮細胞および脳動脈平滑筋細胞に認めた。テ

ネイシンCノックアウトにより、これらのMAPキナーゼはいずれの部位においても不活化された。ウェスタンブロット法では、SAH後の脳ではマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)-9の活性化とその基質であるタイト結合の構成蛋白の分解を認め、テネイシンCによる血液脳関門障害の機序としてMAPキナーゼ・MMP-9経路が考えられた。一方、脳動脈のウェスタンブロットではToll様受容体(TLR)4の活性化を認め、テネイシンCによる脳血管攣縮発生機序にTLR4・MAPキナーゼ経路が関与することが示唆された。テネイシンCノックアウトSAHマウスに合成テネイシンC蛋白を投与すると、脳損傷は野生型マウスSAHモデルと同等まで悪化し、テネイシンCノックアウトにより抑制されたMAPキナーゼ・MMP-9経路は再活性化された。また、野生型マウスSAHモデルに特異的TLR4拮抗薬あるいは中和抗体を投与することにより、脳血管攣縮は有意に抑制された¹⁾。

臨床検体を用いた研究では、SAH急性期にSAH患者の血中でテネイシンC濃度が有意に上昇することが明らかになった。転帰不良や慢性水頭症発生は血中テネイシンC濃度高値と有意な相関を認め、臨床的にもテネイシンCがSAH後脳損傷に関与するだけでなく、脳損傷の重篤度を予知する分子マーカーとして利用できる可能性が示唆された²⁾。

【考 察】

SAH後の脳損傷には様々な病態が混在しており、最近では早期脳損傷と遅発性脳損傷の密接な結びつきを強調する報告が多い^{3,4)}。テネイシンCは誘導型の細胞外基質蛋白の1つであるが、組織液中に分泌される非構造蛋白で、様々な機能を発揮することからマトリセル蛋白と総称されている⁴⁾。テネイシンCはSAH後、少なくとも血小板由来増殖因子、血管内皮増殖因子、TLR4リガンド(ヘム、フィブリノーゲン、テネイシンC、障害関連分子パターン、サイトカインなど)により誘導され、MAPキナーゼを介し、TLR4、血小板由来増殖因子受容体およびテネイシンC自体の発現を誘導・活性化させることから、早期脳損傷および遅発性脳損傷を悪化させる正のフィードバック機構として作用する可能性がある^{1,4)}。また、他のマトリセル蛋白と相互作用することから、さらに未知の複雑な機能を担っている可能性がある⁴⁾。本研究やこれまでの研究を総合すると、テネイシンCはSAH後脳損傷の立役者である可能性が高く、さらに研究を促進する価値がある。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究により、テネイシンCを分子マーカーとして利用し、従来、不可能であったSAH後脳損傷やその病態の早期診断法の確立へと発展できる可能性がある。また、テネイシンCを分子標的とした初の細胞外基質を基盤とした脳保護治療法の開発へと繋がる可能性がある。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、本研究で開発される脳保護治療法は、他疾患に起因する様々な脳損傷にも応用できる可能性があり、今後の脳保護治療の新たな方向性を示すと考える。

【参考・引用文献】

- 1) Kawakita F, Fujimoto M, Liu L, Nakano F, Nakatsuka Y, Suzuki H. Effects of Toll-like receptor 4 antagonists against cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage in mice. *Mol Neurobiol*. 2016 Oct 13. [Epub ahead of print]
- 2) Nakatsuka Y, Kawakita F, Yasuda R, Umeda Y, Toma N, Sakaida H, Suzuki H, pSEED group. Preventive effects of cilostazol against the development of shunt-dependent hydrocephalus after subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*. 2016 Aug 5:1-8. [Epub ahead of print]
- 3) Suzuki H, Shiba M, Nakatsuka Y, Nakano F, Nishikawa H. Higher cerebrospinal fluid pH may contribute to the development of delayed cerebral ischemia after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Transl Stroke Res*. 2016 Sep 14. [Epub ahead of print]
- 4) Suzuki H, Kawakita F. Tenascin-C in aneurysmal subarachnoid hemorrhage: deleterious or protective? *Neural Regen Res* 2016; 11:230-231.