

## 血管周囲腔 NETs によるくも膜下出血後微小血管攣縮誘発メカニズムの解明

糸数隆秀

大阪大学大学院医学系研究科

### 【研究の背景】

くも膜下出血 (SAH) が生じた際、数日の潜伏期間を置いて血管攣縮が比較的大きな動脈に生じ (=delayed large-vessel vasospasm) 脳虚血に至る症例が 2 割程存在する。本現象による遅発性神経障害は SAH の重要な予後規定因子として盛んに研究され、clazosentan 等の治療薬も開発された。しかし近年、delayed large-vessel vasospasm を治療するだけでは遅発性脳虚血を完全に予防できないことが明らかになり、より小さな細動脈レベルで生じる微小血管攣縮 (microvasospasm) の重要性が着目されているが、その実態及び発症メカニズムは殆ど解明されていない。

### 【目 的】

本研究では、独自に確立した in vivo イメージング実験系を用いて見出した細動脈血管周囲腔への好中球浸潤と、それに引き続いて生じる好中球細胞外トラップ (NETs) の血管周囲腔への放出が、微小血管攣縮を惹起する原因となっているとの仮説のもと、現象の証明とメカニズム探索を行うことで、全く新しい視点からの遅発性脳虚血予防法提案に繋げることを目的とする。

### 【方 法】

くも膜下出血マウスモデルは脳底部への血腫注入により作成した。このマウスの脳血管周囲病態を長期間観察可能な、多光子顕微鏡を用いた in vivo イメージング実験系を開発し、血管及び免疫細胞を可視化してその動態の評価を実施した。また、微小血管攣縮発症時に内皮細胞・血管平滑筋細胞で生じている性質変化を検証する為、髄膜血管ホールマウント手法確立に取り組んだ。

### 【結 果】

独自に確立した in vivo で NETs を可視化できる方法論により、細動脈周囲腔で好中球が盛んに NETs を放出する現象が再現性高く生じていることを示した。また DNase の髄腔内投与で NETs を除去できることを見出した。これらの知見を併せ、NETs 出現タイミングに合わせた髄腔への DNase 投与を実施した上で血管形態の経時的イメージングを行ったところ、DNase 処置により微小血管攣縮が大幅に抑制されることが明らかになった。また、血管内皮細胞・平滑筋細胞を対象とした分子病態評価のための髄膜血管ホールマウント手法の確立に成功し、本方法によっても、in vivo 2光子イメージングで認められた微小血管攣縮が定量的に評価可能であることを示した。

### 【考 察】

感染等の刺激を受けた好中球は DNA や細胞質内タンパクを含む網状構造物である NETs を細胞外に放出し細胞死に至る (NETosis)。本現象は感染においては生体防御に働くが、無菌性の炎症状態においては、NETs は血管内皮細胞を障

害し、病態増悪因子となることが報告されている。我々は、脳底部への血腫注入によるくも膜下出血 (SAH) マウスモデルを用い、SAH 直後に脳微小血管の血管周囲腔に血液が充満すること、翌日には同部位に多量の好中球が浸潤していることを見出した。さらにこれらの好中球は次々と細胞死を起し、血管周囲腔内で好中球細胞外トラップ (NETs) を放出していることを確認した。さらに観察を続け、同部位の脳微小血管は 5 日後に狭窄し、微小血管攣縮を発生していることを観察した。本研究ではこの現象の間の因果関係を検証し、髄腔への DNase 投与による NETs の除去により、微小血管攣縮を緩和可能であることを示した。では、血管周囲腔への NETs 放出から微小血管攣縮に至る具体的な分子細胞メカニズムはどのようなものであろうか。現在、内皮細胞、および血管平滑筋細胞に変化が生じているとの仮説のもと、各細胞を分取しての網羅的遺伝子解析および今回確立した髄膜血管ホールマウント手法を用いた免疫染色による細胞性質変化の同定を実施している。特に、NETs が血管周囲腔に放出された後、同部位に接して存在する内皮細胞および血管平滑筋細胞がフェノタイプスイッチを介して、微小血管攣縮に関与している可能性を検証している。

#### 【臨床的意義・臨床への貢献度】

SAH 後の微小血管攣縮についての研究は未だ少なく、その病態メカニズムは未解明である。したがって本現象に着目した治療法は存在しなかった。今回見出した DNase の脳室内投与により微小血管攣縮が抑制されるという結果は、本現象が SAH 後の新たな治療標的となり得ることを初めて提示したものであり、臨床的意義は大きい。今後、さらに分子メカニズム解明を進めることで、これまでになかった視点からの分子標的薬開発に繋げていきたい。

#### 【参考・引用文献】

- Nakagawa R, Itokazu T, Shibuya N, Kishima H, Yamashita T. Perivascular Neutrophil Extracellular Traps Exacerbate Microvasospasm After Experimental Subarachnoid Hemorrhage. *Stroke*. 2024;55(12):2872-2881.
- Witsch J, Witsch T, Martinod K. Emerging Role of Neutrophil Extracellular Traps in Subarachnoid Hemorrhage. *Stroke*. 2024;55(12):2882-2884.