

課題番号 14

## 中枢性メラトニン/ラパマイシン標的蛋白クロストークに着目したくも膜下出血の早期脳損傷に対する制御機構の解明

### [1] 組織

代表者： 守屋 孝洋  
(奥羽大学薬学部)  
対応者： 武藤 達士  
(東北大学加齢医学研究所)  
分担者： 山本 修三  
(東北大学病院)

研究費：物件費 15 万円

### [2] 研究経過

脳動脈瘤破裂によるくも膜下出血(subarachnoid hemorrhage: SAH)は、予後不良な脳卒中疾患として知られている。その最大の原因として、経過中に約半数に起こる遅発性脳虚血/脳血管攣縮がある。近年、その前駆段階の病態として、早期脳損傷(early brain injury: EBI)が影響している可能性が指摘されており、世界的な研究の流れは EBI の機序解明と治療法の開発にシフトしつつある。

ラパマイシン(Rap)は、ほ乳類ラパマイシン標的蛋白(mammalian target of rapamycin: mTOR)シグナル伝達経路の阻害を主体としたMAPK経路の制御に加え、オートファジー促進や抗炎症・抗酸化作用、免疫抑制作用といった多面的効果を有することが知られている。一方、メラトニン(Mel)は、松果体から分泌されるホルモンで、視交叉上核に存在するMT1及びMT2受容体作動薬として概日リズムの位相調節や哺乳類の季節繁殖の制御等を司る。Melとその代謝産物は、高容量においても細胞毒性の低い強力な抗酸化物質として、虚血性脳卒中におけるマイトファジーを介した抗炎症作用と抗アポトーシス作用を有する可能性が注目されている。

本共同研究では、Mel-mTOR伝達経路の中枢性制御機構を明らかにすることを目的として研究を行った。研究は、C57BL/6マウスを用いて左外頸動脈から5-0 ナイロン糸を逆行性に挿入し、頸動脈分岐部を介して内頸動脈先端部に誘導してSAHを誘発する、

endovascular perforation法による疾患モデルを用いて実験を行った。予め、Melの脳室内微量注入(ICV)用カテーテルを、これまでに確立した手法[1]で定位的に右側脳室内に留置した。Rapは先行論文で設定した投与量(1 mg/kg/day, SAH前4日間腹腔内投与(IP))を用いた[2]。SAH後1時間の時点で、Melを速やかに投与(10 mg/kg, ICV)した。今回はmTORに関連した中枢性疼痛制御に関する影響を評価する上で、neurotrophinを用いた実験も併せて実施した。

SAH急性期のEBIに及ぼす影響を評価するために、高解像度超音波エコー、光音響共鳴装置と脳MRIを用いて、SAH急性期の脳循環動態および心機能のIn vivoイメージングを行った。神経行動評価として、神経学的スコア(Garcia neuroscore)ならびにオープンフィールドテストを行った。最後に摘出脳を用いて、グリア細胞の変化につき免疫組織学的手法を用いて分析することを計画した。主にICV Mel、ICV Mel+ IP Rapおよび対照群(CONT)における各項目の推移について、多重比較法による統計学的解析を施行した。

以下、研究活動状況の概要を記す。

新型コロナ感染症の波及も祟り、研究打ち合わせは主に web を用いた週 1 回のミーティングを行い、適時進捗状況を確認するように努めた。実験は各施設の動物施設内にて分担して遂行した。月 1 回の実験を計画していたものの、コロナ禍の影響で予想以上に停滞した。摘出組織の解析は遅延しているが、試薬等の準備が整い次第、解析を始める予定としている。

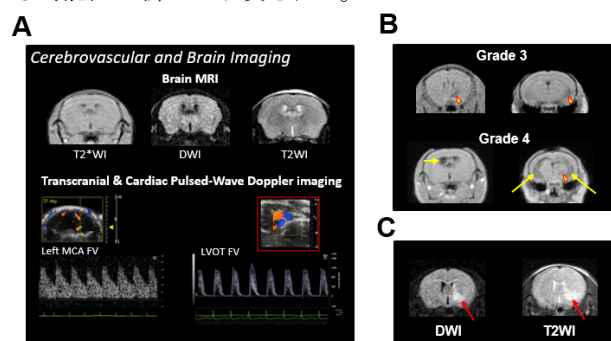
### [3] 成果

#### (3-1) 研究成果

本研究は3年間の継続研究として申請した。まず初年度および2年度は、マウス SAH モデル作成後における、循環動態解析、神経行動分析データを蓄積した。また、24 時間後の MRI 拡散強調像による急性期脳梗塞(EBI を反映した虚血性変化)およびT2\*強調像による SAH の分布と重症度評価も行った[3]。

次に3年目となる本年度は、SAH 作成後の脳室内投与実験を実施した。Mel の ICV は、24 時間後

の脳血流量（全脳容積に対する血流信号 [%vascularity]）として評価）低下を対照群と比べて有意に軽減した( $P < 0.01$  vs. CONT)。こうした脳血流量の改善は、SAHに先行するRap処置により、増強する可能性が示唆された( $P < 0.01$  vs. Mel+Rap)。急性期梗塞ならびにオープンフィールドテストによる行動指標の回復も有意に短縮した。これらの結果は、Melの中枢機序としてmTORの選択阻害が関わっていることを示している。Melの全身投与(IP)は、海馬におけるmTORの蛋白発現の低下を来し、その下流にあるIL-1 $\beta$ 、IL-6といった炎症性サイトカイン濃度を低下させ、全身麻酔薬による認知機能低下を改善することが動物実験から報告されている(Yuan et al. Front Aging Neurosci, 2019;34)。今回の結果からは、Melの中枢性作用として、出血性脳卒中後の循環動態改善にも効果がある可能性が新たに示唆された。



### (3-2) 波及効果と発展性など

加齢医学研究所における共同研究を通して学外研究者との交流が活性化し、国内外の研究者とともに疾患モデルを用いたIn vivoイメージングの研究を進める機会を得た。特にMelは、SAH後の日内リズム形成にも関与していることから、Rapによる相互作用を含めた時間生物学的な検証も必要と考えられる。コロナ渦にて実験の停滞を余儀なくされているが、今後も継続研究としてのデータ蓄積に加えて、新研究領域の開拓を進めていきたい。

### [4] 成果資料

1. Yamamoto S, Mutoh T, Sasaki K, Mutoh T, Taki Y. Central action of rapamycin on early ischemic injury and related cardiac depression following experimental subarachnoid hemorrhage. Brain Res Bull.2019;144:85-91.
2. Sasaki K, Yamamoto S, Mutoh T, Tsuru Y, Taki Y, Kawashima R. Rapamycin protects against early brain injury independent of cerebral blood flow changes in a mouse model of subarachnoid haemorrhage. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2018;45(8):859-862.

3. Mutoh T, Yamamoto S, Moriya T. Post-event application of neurotrophin protects against ischemic insult toward better outcomes in a murine model of subarachnoid hemorrhage. Biomedicines. 2021;9(6):664.