

脳出血および二次的脳損傷における
グリベンクラミドの脳浮腫抑制効果
(要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程
外科系脳神経外科学専攻

塩川諒治

修了年 2021 年

指導教員 大島秀規

【緒言】脳卒中は我が国における死亡原因、ならびに永続的障害をもたらす原因の上位を占めている。その克服は社会的・経済的損失の打開という意味においても重要な課題である。出血性脳卒中である脳出血の研究は疫学的側面とリハビリテーションに集中しているが機能予後は未だに悪い。また、脳出血については薬物治療の選択肢が未だ無い。脳出血の病態形成に関わる組織・細胞・分子レベルでの機序の解明とともに、真に有効な治療薬の開発が切望されている。脳出血後の二次的脳損傷は、血腫周辺の虚血・炎症性反応であると考えられており【1】、マイクログリアの活性化がその一端を担っている。活性化したマイクログリアは脳に悪影響を及ぼす物質を貪食する半面、様々な炎症性因子を放出する【2】。炎症性因子の放出により、炎症性細胞の遊走や浸潤が亢進し、さらに細胞毒性因子を放出することで、二次的脳損傷を引き起こす【3】。脳出血後のマイクログリアの活性化を抑制することで、血液脳関門 (blood-brain barrier: BBB)の破綻抑制や神経学的予後が改善すると報告されている【4】。脳梗塞やくも膜下出血の研究においてスルホニルウレア受容体 1 (sulfonyleurea receptor 1: SUR1) の存在が注目されている【5,6】。虚血や損傷早期より発現し、脳浮腫だけでなく炎症性反応に関与している事が解明されてきた【7】。脳出血後の浮腫の発生にも SUR1 が関与している可能性が高く、BBB の破綻や血腫周辺の虚血・炎症性反応を引き起こしていると考えられる。グリベンクラミドは 2 型糖尿病の治療薬として臨床で広く使用されており、SUR1 の選択的阻害作用を有している【8】。近年の研究では、血糖降下作用以外にも虚血後の脳浮腫改善作用が示されている【9】。虚血後には神経細胞・グリア細胞・血管内皮細胞で SUR1 が発現し、細胞内へのナトリウムイオンとカルシウムイオンの流入を引き起こす。そして、細胞の膨化・細胞膜の脱分極がおき、細胞死に至ることが知られている。グリベンクラミドは SUR1 の選択的阻害作用により、これらの反応を抑制する。Simard らの報告では、ラット脳梗塞モデルにおいてグリベンクラミドの投与により、梗塞後脳浮腫の軽減や死亡率の低下が示された【9】。脳出血の研究では、脳出血後にグリベンクラミドを投与することで、BBB の破綻抑制や脳浮腫の抑制効果が示されている。しかし、グリベンクラミド投与による脳出血後のマイクログリア活性化や炎症性細胞の遊走・浸潤への効果について未だ不明な点が多い。そこで、本研究ではラット脳出血モデルを用いて、グリベンクラミド投与による、マイクログリア活性化や炎症性細胞の遊走・浸潤の抑制効果について検討した。

【方法】雄 Sprague-Dawley (SD)ラット 56 頭を用いて naïve 群 (n=6) 、sham (穿刺のみ施行) 群 (n=6) 、脳出血ーコントロール群 (n=23) 、脳出血ーグリベンクラミド群 (n=21) 、を作製した。脳出血ーコントロール群は、グリベンクラミドの溶解剤として用いた dimethyl sulfoxide (DMSO) のみとした。脳出血直後から皮下に埋め込み型浸透圧ポンプを留置し、薬物の持続投与を行った。24 時間後に脳を摘出し、脳の冠状断切片を作製した。各脳切片の写真を撮影し、ImageJ (v1.52n, National Institutes of Health) を用いて血腫量を測定した。血腫中心の 1 切片を出血側と非出血側に分け、さらに大脳皮質および被殻に分離し、SUR1 の encode messenger ribonucleic acid (mRNA) である *ATP-binding cassette transporter sub-family C member 8 (ABCC8)* の発現を、polymerase chain reaction (PCR)法で測定した。活性化型マイクロ

グリアの指標として galectin-3 を、炎症性細胞の遊走・浸潤の指標として cluster of differentiation 11 b (CD11b) を、Western blotting 法で評価した。また、血腫中心の1切片の水含有割合を、modified wet-dry weight 法を用いて測定し、脳浮腫の評価をした。形態学的検討として、脳出血-コントロール群と脳出血-グリベンクラミド群 (各群 n = 2) を作製し、マイクログリアを抗 Iba-1 抗体を用いて免疫組織染色した。米澤らの報告により、コラゲナーゼ注入で生じる血腫量は $86 \pm 6.1 \text{ mm}^3$ であり【10】、本研究でも評価検体の血腫量は $85 \pm 15 \text{ mm}^3$ のものとした。血糖値のデータ解析には二元配置分散分析を用いた。他のデータの解析には一元配置分散分析を用いた。分散が等しくないデータに対してはイプシロンで自由度を調整した。分散分析で要因に有意差が認められた場合のみ、その後の検定を行った。その後の検定には Tukey 法を用いた。すべて両側検定を行い、p 値 0.05 以下を有意とした。結果は、平均値±標準偏差で表記した。統計解析には SPSS Statistics (version21: IBM, USA) を使用した。

【結果】本研究で評価検体として採用した血腫体積は $85 \pm 15 \text{ mm}^3$ 前後の検体である。脳出血-コントロール群 (n = 6) の血腫量は $85.1 \pm 11.7 \text{ mm}^3$ 、脳出血-グリベンクラミド群 (n = 8) の血腫量は $88.8 \pm 8.2 \text{ mm}^3$ であり、有意差は認めなかった ($p > 0.05$)。血糖値については、術後 24 時間の血糖値は、脳出血-コントロール群 (n = 6) で $157.6 \pm 16.1 \text{ mg/dL}$ 、脳出血-グリベンクラミド群 (n = 8) で $134.0 \pm 12.1 \text{ mg/dL}$ であり、両群間で有意差を認めなかった ($p > 0.05$)。脳水分含有割合については、脳出血-コントロール群 (n = 6) で $87.4 \pm 1.1 \%$ 、脳出血-グリベンクラミド群 (n = 8) は $79.6 \pm 5.9 \%$ であり、脳出血-グリベンクラミド群で有意に脳水分含有割合は低値であった ($p = 0.008$)。SUR1 の encode mRNA である *ABCC8* の発現割合は、比較数値を *ABCC8 / GAPDH* で算出した。出血側大脳皮質において、*ABCC8* の発現割合は、naive 群 (n = 6) で 0.56 ± 0.15 、脳出血-コントロール群 (n = 6) で 1.28 ± 0.08 、脳出血-グリベンクラミド群 (n = 6) で 1.47 ± 0.05 であった。naive 群で低値であり、脳出血-コントロール群 ($p < 0.001$)・脳出血-グリベンクラミド群 ($p < 0.001$) で有意に上昇した。脳出血-コントロール群と脳出血-グリベンクラミド群の比較では、有意差を認めなかった ($p > 0.05$)。出血側被殻においても、*ABCC8* の発現割合は、naive 群 (n = 6) で 1.17 ± 0.06 、脳出血-コントロール群 (n = 6) で 1.46 ± 0.06 、脳出血-グリベンクラミド群 (n = 6) で 1.51 ± 0.18 であった。naive 群で低値であり、脳出血-コントロール群 ($p = 0.003$)・脳出血-グリベンクラミド群 ($p < 0.001$) で有意に上昇した。脳出血-コントロール群と脳出血-グリベンクラミド群の比較では、有意差を認めなかった ($p > 0.05$)。活性型マイクログリアの指標である galectin-3 と、炎症性細胞の遊走・浸潤の指標である CD11b は、比較数値を目的タンパク / beta-Actin で算出した。galectin-3 は、出血側大脳皮質において、脳出血-コントロール群 (n = 6) で 9.35 ± 1.54 、脳出血-グリベンクラミド群 (n = 6) で 4.28 ± 1.52 であり、脳出血-グリベンクラミド群で有意に低下した ($p < 0.001$)。出血側被殻においても、脳出血-コントロール群 (n = 6) で 9.53 ± 3.36 、脳出血-グリベンクラミド群 (n = 6) で 5.60 ± 2.13

であり、脳出血ーグリベンクラミド群で有意に低下した ($p < 0.001$)。CD11b は、出血側大脳皮質において、脳出血ーコントロール群 ($n = 6$) で 2.41 ± 1.07 、脳出血ーグリベンクラミド群 ($n = 6$) で 0.77 ± 0.76 であり、脳出血ーグリベンクラミド群で CD11b は有意に低下した ($p < 0.001$)。出血側被殻においても、脳出血ーコントロール群 ($n = 6$) で 0.41 ± 0.20 、脳出血ーグリベンクラミド群 ($n = 6$) で 0.27 ± 0.13 であり、脳出血ーグリベンクラミド群で有意に低下した ($p = 0.009$)。脳出血ーコントロール群 ($n = 2$) の抗 Iba-1 抗体染色では、大脳皮質、被殻を含む脳全体に陽性細胞を認め、これらの陽性細胞を強拡大で観察すると、マイクログリアの胞体が肥大化しており、突起の乏しい、活性型である amoeboid 型であった。一方、脳出血ーグリベンクラミド群 ($n = 2$) では、大脳皮質、被殻を含む脳全体に陽性細胞を認めるものの、これらの陽性細胞を強拡大で観察すると、脳出血ーコントロール群と比較して、amoeboid 型のマイクログリアが少なく、静止型である ramified 型のマイクログリアが多く認められた。

【考察】脳虚血や脳損傷が起こると、細胞内の adenosine triphosphate (ATP) が低下し、細胞膜上に SUR1 が発現する。SUR1 が発現すると、細胞の脱分極や細胞膨化、細胞死を引き起こし、細胞毒性浮腫が起こる【11】。本研究においても、naive 群と脳出血ーコントロール群および脳出血ーグリベンクラミド群の比較では、脳出血ーコントロール群および脳出血ーグリベンクラミド群で有意に *ABCC8* の発現が上昇しており、コラゲナーゼによる出血性変化で SUR1 の発現がおきていることが示された。グリベンクラミドは世界的に使用されている 2 型糖尿病治療薬で SUR1 に対する選択的な阻害作用を有しており、中枢神経系の SUR1 への作用として、脳虚血や脳損傷後に起こる神経細胞・グリア細胞・血管内皮細胞の脱分極や細胞膨化を抑制することが知られている【12,13】。本研究において、同等の血腫量でも脳出血後にグリベンクラミドを投与することで、脳浮腫が抑制されることが示された。脳出血後には、マイクログリアの活性化および好中球やマクロファージなど炎症性細胞の血腫周囲への浸潤が起こる。活性化マイクログリアや浸潤した炎症性細胞は、神経毒性因子を放出し、BBB の破綻や脳浮腫の悪化を引き起こす。脳出血の研究で、マイクログリアの活性化および炎症性細胞の浸潤を抑制することで、脳出血後の脳浮腫に伴う二次的脳損傷を抑制できることが報告されている【14,15,16】。本研究において、活性型マイクログリアの指標である galectin-3、炎症性細胞の浸潤の指標である CD11b を評価した。出血側大脳皮質および被殻で galectin-3 および CD11b の上昇を認めたが、グリベンクラミドを投与することで、出血側大脳皮質および被殻での galectin-3 と CD11b の低下を認めた。グリベンクラミド投与により、脳出血後のマイクログリアの活性化と炎症性細胞の浸潤が抑制されることが示された。また、形態学的評価でも、グリベンクラミド投与により活性型である amoeboid 型のマイクログリアの減少を認めた。これらの効果は、グリベンクラミドの投与により脳出血後の炎症性反応が抑制され、それに伴い脳浮腫が抑制されたものと考えられる。

【結語】 SUR1 受容体の選択的拮抗薬であるグリベンクラミドの投与により、脳出血後の脳浮腫を軽減した。また、マイクログリアの活性化および炎症性細胞の浸潤を抑制出来ることが示された。今後の更なる研究により、脳出血後の脳浮腫を主体とした二次的脳損傷における SUR1 の作用およびグリベンクラミドの効果を解明することで、臨床における脳出血後の予後改善に寄与することが出来ると考える。

引用文献

1. Zheng H, Chen C, Zhang J, Hu Z: Mechanism and Therapy of Brain Edema after Intracerebral Hemorrhage: *Cerebrovasc Dis* 2016; 42: 155-169
2. Bernardino L, Balosso S, Ravizza T, Marchi N, Ku G, Randle JC, Malva JO, Vezzani A: Inflammatory events in hippocampal slice cultures prime neuronal susceptibility to excitotoxic injury: a crucial role of P2X7 receptor-mediated IL-1beta release: *J Neurochem*: 2008; 106: 271-280
3. Wang J: Preclinical and clinical research on inflammation after intracerebral hemorrhage: *Prog Neurobiol*: 2010; 92: 463-477
4. Gao Z, Wang J, Thiex R, Rogove AD, Heppner FL, Tsirka SE: Microglial activation and intracerebral hemorrhage: *Acta Neurochir Suppl*: 2008; 105: 51-53
5. Simard JM, Tsybalyuk N, Tsybalyuk O, Ivanova S, Yurovsky V, Gerzanich V: Glibenclamide is superior to decompressive craniectomy in a rat model of malignant stroke: *Stroke*: 2010; 41: 531-537
6. Simard JM, Geng Z, Woo SK, Ivanova S, Tosun C, Melnichenko L, Gerzanich V: Glibenclamide reduces inflammation, vasogenic edema, and caspase-3 activation after subarachnoid hemorrhage: *J Cereb Blood Flow Metab*: 2009; 29: 317-330
7. Da Silva-Santos JE, Santos-Silva MC, Cunha Fde Q, Assreuy J: The role of ATP-sensitive potassium channels in neutrophil migration and plasma exudation: *J Pharmacol Exp Ther*: 2002; 300: 946-951
8. Ortega FJ, Gimeno-Bayon J, Espinosa-Parrilla JF, Carrasco JL, Batlle M, Pugliese M, Mahy N, Rodríguez MJ: ATP-dependent potassium channel blockade strengthens microglial neuroprotection after hypoxia-ischemia in rats: *Exp Neurol*: 2012; 235: 282-296
9. Simard JM, Chen M, Tarasov KV, Bhatta S, Ivanova S, Melnitchenko L, Tsybalyuk N, West GA, Gerzanich V: Newly expressed SUR1-regulated NC(Ca-ATP) channel mediates cerebral edema after ischemic stroke: *Nat Med*: 2006; 12: 433-440
10. Yonezawa T, Sakaki T, Hashimoto H: COLLAGENASE INDUCED INTRACEREBRAL HEOMORRHAGE IN RATS: *J Nara Med Ass*: 2000; 51: 139-144
11. Mehta RI, Tosun C, Ivanova S, Tsybalyuk N, Famakin BM, Kwon MS, Castellani RJ, Gerzanich V, Simard JM: Sur1-Trpm4 Cation Channel Expression in Human Cerebral Infarcts: *J Neuropathol Exp Neurol*: 2015; 74: 835-849
12. King ZA, Sheth KN, Kimberly WT, Simard JM: Profile of intravenous glyburide for the prevention of cerebral edema following large hemispheric infarction: evidence to date: *Drug Des Devel Ther*: 2018; 12: 2539-2552
13. Jha RM, Bell J, Citerio G, Hemphill C, Kimberly WT, Narayan RK, Sahuquillo J, Sheth KN, Simard JM: Role of Sulfonylurea Receptor 1 and Glibenclamide in Traumatic Brain Injury: A

Review of the Evidence: *Int J Mol Sci*: 2020: 21: 409

14. Wang J, Rogove AD, Tsirka AE, Tsirka SE: Protective role of tuftsin fragment 1-3 in an animal model of intracerebral hemorrhage: *Ann Neurol*: 2003: 54: 655-664
15. Wang J, Tsirka SE: Tuftsin fragment 1-3 is beneficial when delivered after the induction of intracerebral hemorrhage: *Stroke*, 2005: 36: 613-618
16. Titova E, Ostrowski RP, Kevil CG, Tong W, Rojas H, Sowers LC, Zhang JH, Tang J: Reduced brain injury in CD18-deficient mice after experimental intracerebral hemorrhage: *J Neurosci Res*: 2008: 86: 3240-3245