

論文の内容の要旨

氏名： 笥 雄 三

専攻分野の名称： 博士（医学）

論文題名： ラット脳梗塞モデルにおける二次性脳挫傷に対する Epac2 の影響

脳梗塞を発症すると生命の危機に陥るだけでなく、重篤な後遺症が残る可能性がある。脳梗塞後の直接的な損傷（一次性脳損傷）がきっかけで脳虚血の進行・代謝障害・形態的变化・炎症反応などが生じ、二次性脳損傷を誘発する。これは機能予後に大きくかかわる因子である。現在、二次性脳損傷についての治療は確立されていない【1, 2, 3, 4】。脳出血や外傷性脳損傷において、Exchange protein directly activated by cAMP 2 (Epac2) の発現が優位に増加していることが報告されており、神経細胞のアポトーシスに関与していることが知られている【5, 6】。本研究は Epac2 特異的阻害酵素 (ESI-05 (1,3,5-Trimethyl-2-[4-methylphenyl] sulfonyl]-benzene)) を用いてその発現を抑制することにより脳梗塞に伴う虚血カスケードである細胞死の軽減、二次性脳損傷の防止について検討し、今後の治療法の確立につなげることを目的とする (図 15)。

雄 Sprague-Dawley (SD) ラット 34 頭を用いて naïve 群 (n = 6)、sham (手術操作のみ施行) 群 (n = 6)、脳梗塞群 (n = 6)、脳梗塞-DMSO 投与群 (n = 8)、脳梗塞-ESI-05 投与群 (n = 8) を作製した。脳梗塞-ESI-05 投与群は、脳梗塞処置の 30 分前に 8 mg/kg ESI-05 を腹腔内に投与した。脳梗塞-DMSO 投与群は、同時期に ESI-05 の溶解液として用いた dimethyl sulfoxide (DMSO) のみを細胞毒性による神経障害の評価のため腹腔内投与した。24 時間後に脳を摘出し、脳の冠状断切片を作製した。検体を梗塞側の梗塞範囲・非梗塞範囲と非梗塞側に分けた。脳切片を 2% 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC) 染色による梗塞範囲と脳浮腫範囲の測定と wet-dry weight 法を用いた脳水分含有割合の測定を行った。また、神経細胞死における Epac2 の役割を調べるために Epac2、cleaved caspase 3、total-p38、phospho-p38、beta-actin のタンパク質発現および Epac2、cleaved caspase 3 の免疫染色、Fluoro Jade C (FJC) 染色、TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) 染色を用いて検討した。

本研究では、脳梗塞により Epac2 が増加することが確認できた。脳梗塞の指標である TTC 染色の面積と脳浮腫の指標である水分含有率は、脳梗塞-DMSO 投与群と比較して脳梗塞-ESI-05 投与群で有意に低下した。ESI-05 投与により Epac2 の発現が抑制されるとアポトーシスのマーカーである cleaved caspase 3 が減少した。Total-p38 は変化がなかったがリン酸化され活性化した phospho-p38 は ESI-05 投与で減少していた。そのため、二次性脳損傷には p38 MAPK 経路のリン酸化の抑制が関わっていると考えられる。

免疫組織学的染色でも Epac2 制御により cleaved caspase3 が減少していた。それに加えて、脳梗塞辺縁部においてアポトーシスが減少することが TUNEL 染色、FJC 染色で分かった。

脳梗塞発症時に Epac2 を制御することで脳浮腫、細胞死が抑制できることが確認された。ESI-05 を用いてその発現を抑制することにより脳梗塞に伴う浮腫抑制、二次性脳損傷を軽減することが治療法として確立されれば、脳梗塞後の生命・機能予後に大きく寄与しうるものと期待される。

引用文献

1. Aronowski J, Zhao X. Molecular pathophysiology of cerebral hemorrhage: secondary brain injury. *Stroke*. 2011 Jun;42(6):1781-6.
2. Bramlett HM, Dietrich WD. Pathophysiology of cerebral ischemia and brain trauma: similarities and differences. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2004 Feb;24(2):133-50.
3. Pfister HW, Scheld WM. Brain injury in bacterial meningitis: therapeutic implications. *Curr Opin Neurol*. 1997 Jun;10(3):254-9.
4. Rabinstein AA. Secondary brain injury after aneurysmal subarachnoid haemorrhage: more than vasospasm. *Lancet Neurol*. 2011 Jul;10(7):593-5.
5. Zhuang Y, Xu H, Richard SA, Cao J, Li H, Shen H, Yu Z, Zhang J, Wang Z, Li X, Chen G. Inhibition of EPAC2 Attenuates Intracerebral Hemorrhage-Induced Secondary Brain Injury via the p38/BIM/Caspase-3 Pathway. *J Mol Neurosci*. 2019 Mar;67(3):353-63.
6. Zhang L, Zhang L, Liu H, Jiang F, Wang H, Li D, Gao R. Inhibition of Epac2 Attenuates Neural Cell Apoptosis and Improves Neurological Deficits in a Rat Model of Traumatic Brain Injury. *Front Neurosci*. 2018 Apr 23;12:263.