

氏名（本籍）	松原博文	（岐阜県）
学位の種類	博士（医学）	
学位授与番号	甲第1194号	
学位授与日付	令和4年3月25日	
学位授与要件	学位規則第4条第1項該当	
学位論文題目	Nafamostat protects against early brain injury after subarachnoid hemorrhage in mice.	
審査委員	（主査）教授	小澤 修
	（副査）教授	小倉 真治 教授 坂口 裕和

論文内容の要旨

くも膜下出血は(SAH)は、主に動脈瘤の破裂を原因とした重篤な脳血管障害である。SAHへの治療介入方法（クリッピングやコイル塞栓術）や術後の全身管理は進歩しているが、死亡率や寝たきり患者の割合は依然として高い水準で推移している。SAHによる脳障害は主に、発症から72時間以内に生じる早期脳障害と4日から2週間ごろに生じる遅発性脳障害に分類される。早期脳損傷には、神経炎症、血液脳関門(BBB)の破壊、血小板凝集、内皮障害などが含まれ、これらは遅発性脳障害や転帰の悪化要因とされている。したがって、SAH後早期脳損傷の改善が予後の改善に直結すると考えられ、新たな治療法ならびに新規治療薬の開発が望まれている。

ナファモスタットは、セリンプロテアーゼ阻害剤であり、本邦においては肺炎、播種性血管内凝固症候群、血液透析の管理に使用されており、昨今世界的な大流行となっている新型コロナウイルス感染症患者への治療薬としても注目されている。ナファモスタットは、抗炎症作用および血管内皮保護作用を有し、脳虚血性脳卒中の実験モデルにおいて、神経保護作用が報告されている。また、SAHモデルにおいては、遅発性脳障害の主因となる脳血管攣縮に対する有効性が報告されているが、早期脳障害への効果については報告がなく、有効性についても明らかとなっていない。

そこで、*in vivo*（血管内穿孔 SAH マウスモデル）および *in vitro*（ヒト脳微小血管内皮細胞 [HBMVECs]）試験により、ナファモスタットの早期脳損傷に対する効果を検討した。

【対象と方法】

8週齢・雄性マウスに血管穿孔でSAHを誘発し、直後から2時間毎にナファモスタット（0.1 or 1 mg/kg）を合計4回腹腔内投与した。Vehicle群には溶媒である5%ブドウ糖液を同様に投与した。SAH誘発から24時間後に脳血流、神経学的行動テスト（0～24点評価：最良は24点）、血腫量、タンパク質発現を評価した。また、ナファモスタットが及ぼす凝固系への影響については、8週齢・雄性マウスを用いて、ナファモスタット（1 mg/kg）群とVehicle（5%ブドウ糖液）群に群分けし、腹腔内投与から1時間後にAPTTおよびPTを評価した。*In vitro*モデルでは、ヒト脳微小血管内皮細胞（HBMVECs）を使用し、低酸素（O₂:1%）下でトロンビン（5単位/ml）を24時間処置した後、ウェスタンブロット法でナファモスタットの効果を検討した。

【結果】

In vivo SAHマウスモデルにおいて合計88匹のマウスを使用し、うち15匹（17%）を死亡または血

腫形成不全のために除外した。ナファモスタット投与は、0.1 mg/kg 群および1 mg/kg 群共に血腫量を増加することなく、脳血流にも影響を与えなかった。しかし、1 mg/kg 投与群においてSAH誘発24時間後の神経学的行動所見を有意に改善した(Vehicle vs. 1 mg/kg: 10.9 ± 5.87点 vs. 14.3 ± 5.33点, $p = 0.025$)。脳サンプルを用いたウエスタンブロット法での評価においては、プロトロンビン、トロンビン及びmatrix metalloproteinase-9 (MMP-9)の発現を有意に抑制した($p = 0.020$, $p = 0.022$, $p = 0.020$)。ナファモスタット投与1時間後のAPTT, PTについては1 mg/kg 群とVehicle 群間に有意差を認めなかった。また、HBMVECs を用いた *in vitro* の検討では、トロンビン/低酸素処置モデルにおいて、ナファモスタットはp38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)のリン酸化およびintracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)の発現を有意に抑制した($p = 0.026$, $p < 0.0001$)。

【考察】

基礎研究領域においては、脳内出血、脳虚血、SAH後のBBB破綻や脳浮腫の発生に、セリンプロテアーゼの凝固タンパク質であるトロンビンが関係していることが複数報告されている。また、トロンビン阻害剤であるアルガトロバンは、SAH後の早期脳障害に対する保護効果が報告されており、同じくトロンビン阻害作用を有するナファモスタットにも、神経保護作用が認められた。

SAHは発症後超早期から微小血栓の出現が報告されており、これは早期および遅発性脳障害を惹起する。トロンビンは血栓形成における主要因子であり、SAH後の微小血栓形成に関与している。また、血液脳関門の構成細胞である周皮細胞、血管内皮細胞では、トロンビン活性化の亢進によってMMP-9とICAM-1の発現およびp38 MAPKの活性化が促進されるが、これらは脳卒中後の神経所見の増悪因子として知られている。本検討において、ナファモスタットはSAH後に上昇するトロンビンの発現を抑制し、神経学的所見を有意に改善した。その機序としては①微小血栓の抑制、②周皮細胞でのMMP-9の発現抑制、③内皮細胞でのp38 MAPKの活性化およびICAM-1の発現抑制が考えられた。

【結論】

ナファモスタットは、トロンビン/低酸素処置後の脳血管内皮細胞に対して保護作用を示し、くも膜下出血(SAH)後の神経学的転帰の改善に寄与することが示唆された。以上のことから、ナファモスタットは、SAH治療の新たな治療薬となる可能性があると考えられた。

論文審査の結果の要旨

申請者 松原 博文は、セリンプロテアーゼ阻害剤であるナファモスタットがくも膜下出血後の早期脳損傷に対し、保護効果を示すことをモデルマウスおよび細胞レベルにおいて明らかにした。本研究の成果は、ナファモスタットがくも膜下出血に対する新たな治療薬となる可能性を示唆するものであり、脳神経外科学の発展に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

Hirofumi Matsubara, Takahiko Imai, Shohei Tsuji, Natsumi Oka, Yusuke Egashira, Yukiko Enomoto, Noriyuki Nakayama, Shinsuke Nakamura, Masamitsu Shimazawa, Toru Iwama, Hideaki Hara: Nafamostat protects against early brain injury after subarachnoid hemorrhage in mice.

J Pharmacol Sci. Issue 1, Jan 2022, 65-72. doi: 10.1016/j.jphs.2021.10.007