

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15527

研究課題名(和文)酸化ストレス応答を応用した新規 in vivo 分子イメージング法の確立

研究課題名(英文)Novel in vivo optical imaging method monitoring oxidative stress

研究代表者

阿部 康二(Abe, Koji)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：20212540

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：OKD-lucマウスはKeap1-Nrf2システムを応用し開発され、このマウスでは酸化ストレス下の細胞が発光タンパクであるルシフェラーゼ(luciferase;luc)を発現し発光する。今回我々は、このOKD-lucマウスの中大脳動脈閉塞モデルを作製し、酸化ストレスの経時的変化を詳細に観察した。その結果、この酸化ストレスイメージングは、酸化ストレスを生きた動物のままin vivoで検出することができ、脳梗塞の病態を評価する新規のイメージング法として大変有用であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)： We investigated the time-dependent change of in vivo optical imaging of oxidative stress after stroke with OKD mice. The in vivo signals showed a peak at 1 d after tMCAO that was slightly correlated to infarct volume. The strong ex vivo signals, which were detected in the peri-ischemic area, corresponded to endogenous Nrf2 expression.

Our result of synchronization between in vivo imaging and endogenous Nrf2 expression might provide a benefit to verification of drugs targeting the Nrf2-mediated defense pathway and the therapeutic time window in acute phase of ischemic stroke.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：in vivo イメージング 脳梗塞 Keap1 Nrf2 酸化ストレスセンサー

## 1. 研究開始当初の背景

脳梗塞などの脳疾患の病態解析を行う際、様々な種類の蛋白が時間の経過とともに劇的に変化することから、これまでは動物モデルを相当数作成し、複数のタイムポイントで切片を作成することで、解析を行うことが多かった。しかしながら動物モデルはその個体間のばらつきがあるため、その評価が困難である場合も多く認めた。その問題を解決するため近年注目を浴びているのが光イメージング技術であり、蛍光などで標識したプローブを生体内のターゲット分子や細胞・臓器に集積させ、生体内での特定の蛋白の発現やプローブの動態を体外から空間的・時間的に測定することができ、病態解析に非常に有用であることが分かってきている。またこれまでの研究結果から、活性酸素が多く作り出される酸化ストレス状態は、脳梗塞のみならず筋萎縮性側索硬化症 (ALS) やアルツハイマー型認知症など様々な神経変性疾患の病態に大きく関与していることが明らかになってきており、治療標的としても注目を浴びている。

本研究では、近年開発された OKD-luc マウスを用いて、酸化ストレスの分子イメージング技術を確立することで、脳梗塞や神経変性疾患の病態解析と各種薬剤の治療効果解析モデルとして応用することを目的としている。

## 2. 研究の目的

本研究では近年開発された酸化ストレスを評価できることを可能にした OKD-luc マウスを用いて、脳梗塞急性期ならびに ALS の病態解析ならびに各種治療を行った場合の治療効果解析を行うことを可能とする新たな酸化ストレス・病態分子イメージング技術の確立が目的である。

## 3. 研究の方法

OKD-luc マウスを準備した上で、8-9

週齢オスの OKD-luc マウスに 45 分間一過性中大脳動脈閉塞術を行い、その 3, 6, 12, 24 時間後、3, 7 日後に *in vivo* イメージングを行い、luc の脳における発光の定量を行った。その結果、luc の発現は虚血後 12 時間後から安定して発現が認められるようになり、24 時間後が発現のピークとなることが明らかになった。また各時点の動物モデルから脳切片を作成し、免疫組織学的手法により luc, NRF2, Keap1 の経時的な蛋白レベルでの発現の評価を行った。その結果、*in vivo* イメージングで脳虚血後 24 時間後にピークをもって発現していた luc の発現パターンと、脳内の NRF2 の蛋白発現が相関していることが明らかになった。またこの luc の発現強度と脳梗塞体積も相関を認めた。さらに 2 重免疫染色を行うことで NRF2 が主にニューロンと、一部オリゴデンドロサイトとペリサイトに発現していることを明らかにした。

## 4. 研究成果

上記の結果から、今回行った酸化ストレスイメージングは脳梗塞内で起こる酸化ストレスを評価する新規イメージング方法として非常に有用であることが明らかになった。以上の結果を、英語論文にまとめ *J Neurosci Res* 誌に 2017 年に報告した (Nakano Y, Yamashita T, Li Q, Sato K, Ohta Y, Morihara R, Hishikawa N, Abe K. Time-dependent change of *in vivo* optical imaging of oxidative stress in a mouse stroke model.)

今後慢性脳虚血モデルに対してもこの *in vivo* イメージングモデルが応用できるかを検討する予定である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

- 1) Nakano Y, Yamashita T, Li Q, Sato K, Ohta Y, Morihara R, Hishikawa N, Abe K. Time-dependent change of in vivo optical imaging of oxidative stress in a mouse stroke model. *J Neurosci Res*, (2017) (査読有り).
  - 2) Kusaki M, Ohta Y, Inufusa H, Yamashita T, Morihara R, Nakano Y, Liu X, Shang J, Tian F, Fukui Y, Sato K, Takemoto M, Hishikawa N, Abe K. Neuroprotective Effects of a Novel Antioxidant Mixture Twendee X in Mouse Stroke Model. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, (2017) 26 (1191-96) (査読有り).
  - 3) Yamashita T, Abe K. Recent Progress in Therapeutic Strategies for Ischemic Stroke. *Cell Transplant*, (2016) 25 (893-8) (査読有り).
  - 4) Morihara R, Yamashita T, Kono S, Shang J, Nakano Y, Sato K, Hishikawa N, Ohta Y, Heitmeier S, Perzborn E, Abe K. Reduction of intracerebral hemorrhage by rivaroxaban after tPA thrombolysis is associated with downregulation of PAR-1 and PAR-2. *J Neurosci Res*, (2016) doi: 10.1002/jnr.24013. (査読有り).
  - 5) Li Q, Ohta Y, Yamashita T, Shang J, Deguchi K, Feng T, Sato K, Hishikawa N, Nakano Y, Abe K. Dynamic mislocalizations of nuclear pore complex proteins after focal cerebral ischemia in rat. *J Neurosci Res*, (2016) doi: 10.1002/jnr.24005. (査読有り).
  - 6) Li Q, Nakano Y, Shang J, Ohta Y, Sato K, Takemoto M, Hishikawa N, Yamashita T, Abe K. Temporal Profiles of Stress Protein Inductions after Focal Transient Ischemia in Mice Brain. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, (2016) 25 (2344-51) (査読有り).
- [学会発表](計4件)
- 1) 2016. 7. 14-17  
Asia Pacific Stroke Conference 2016 (Brisbane, Australia)  
Yamashita T, Yun Zhai and Abe K  
Cerebrovascular remodeling in Alzheimer`s pathology
  - 2) 2016. 4. 19-22  
The 9th International Symposium on Neuroprotection Neurorepair 2016 (Leipzig, Germany)  
Yamashita T, Morihara R and Abe K.  
Novel cell transplantation therapy for stroke using induced neural stem cells
  - 3) 2015.6.27-30  
BRAIN 2015 (Vancouver, Canada)  
Morihara R, Kono S, Nakano Y, Yamashita T, Deguchi K, Omote Y, Yunoki T, Sato K, Kurata T, Hishikawa T, Abe K  
Rivaroxaban and Apixaban Reduce Hemorrhagic Complication by Protection of Neurovascular Unit after Recanalization with Tissue-type Plasminogen Activator in Ischemic Stroke of Rat
  - 4) 2015.6.18-21  
The 9th International Conference on Complex Medical Engineering 2015 (CME2015) (Okayama, Japan)  
Yamashita T, Tian F, Deguchi K, Ohta Y, Hishikawa N, Abe K  
In vivo optical imaging in post-stroke mice model treated with bone marrow stromal cells or edaravone

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

阿部 康二 (Koji Abe)

岡山大学大学院医歯薬総合研究科

脳神経内科学・教授

研究者番号：20212540

### (2) 研究分担者

山下徹 (Toru Yamashita)

岡山大学大学院医歯薬総合研究科

脳神経内科学・講師

研究者番号：60644408