

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業

研究成果報告書



令和 元 年 6 月 26 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10714

研究課題名（和文）脳虚血下のグリア細胞機能の可視化とその機能の解明

研究課題名（英文）Functional imaging of astroglia in ischemic conditions

研究代表者

常俊 顕三（Kenzo, Tsunetoshi）

福井大学・学術研究院医学系部門（附属病院部）・助教

研究者番号：50569134

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000 円

研究成果の概要（和文）：脳の虚血にともなってアストロサイトは活性化する。脳虚血により脳梗塞が完成していない部分では、微小脳血管拡張が起きている部分があり、この部分はアストロサイトの活性化部位と関連していた。虚血に対し、アストロサイトは微小血管拡張によって抵抗するように働いている可能性があるが、アストロサイトの機能制御によって実際の脳虚血がどのように変化するかは慎重に見極める必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳の神経活動を担っている細胞には、ニューロンだけでなく、神経細胞をサポートと考えられてきたアストログリア細胞も含まれている。このアストログリア細胞は脳の虚血に対し、脳の微小血管を広げるなどして抵抗しているように見える。このアストログリア細胞の働きをコントロールすることで、脳血管が閉塞したときの脳のダメージを減らせるようにすることが可能となるかもしれない。

研究成果の概要（英文）：Astrocytes were activated in an ischemic conditions. We could observe vasodilation of micro vessels in marginal regions of ischemic brain, and the regions were correlated to the astrocyte activated sites. These facts denote that the astrocyte make a stand against ischemia by dilating microvessels. However, the relationship between controlling an astrocyte function and an ischemic degree should be investigated carefully.

研究分野：脳虚血

キーワード：脳虚血 アストログリア 微小血管

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳神経系を構成する細胞には neuron(神経細胞)と glia 細胞(astroglia)がある。過去 neuron については詳細に検討されてきているが、glia 細胞についてはその機能の大半は未知のままである。

脳虚血は全脳卒中の 3/4 をしめ、寝たきり原因の第 1 位である。脳虚血治療のなかで最も効果が高いのは発症から数時間で行われる急性期血行再建(血栓溶解剤の投与やカテーテルによる血栓除去)であるが、このような治療が適応できるのは全脳虚血患者のうち 1 割に満たない。残りの約 9 割の患者に対しては neuron に対し保護的な薬剤を用い、リハビリテーションを行うなどであるが、もう一方の glia 細胞(astroglia)に対する治療的介入は、その機能が未知なため、未だなされていない。

glia 細胞は acetate を選択的にエネルギー基質として利用する。我々が開発中の ^{18}F -Fluoroacetate をトレーサーとした Positron Emission Tomography (PET)を用いる事で glia 細胞の代謝を画像化することが可能である。これを用いることで、脳虚血病態下における glia 細胞の代謝変化を可視化し、将来的に、脳虚血時の glia 細胞に対する治療介入開発の基礎的データを提供することが可能となる。

2. 研究の目的

本研究の目的は脳虚血病態下における glia 細胞の代謝を可視化し、glia 細胞の挙動を明らかにすることと、虚血による脳組織の様々な変化と glia の変化を比較し、その関連を調べることである。

3. 研究の方法

脳梗塞モデルラットの作成:

12 週齢の SD ラットを用いて実験する。ラットは 30%酸素混合気中で 5%のイソフルレン吸入にて麻酔導入し、1.5%から 2.0%の濃度で麻酔維持する。麻酔後、右側頭部にレーザードップラー血流計 FLO-C1 (OmegaFlow) を装着する。仰臥位にし、頸部を切開、外頸動脈を分岐から 3-5mm 遠位で結紮切断、その近位側から 4-0 ナイロン糸の先にシリコンコーティングをおこなったスレッドを頭蓋内へ向けてゆっくり挿入、レーザードップラー血流計の計測値が前値の約 20%に低下するところで止める(虚血状態)。一旦麻酔から覚醒させ、麻痺の有無など神経所見を確認する。その 30 分 / 60 分 / 90 分後に再度麻酔をかけ、スレッドを引き抜き、外頸動脈断端を結紮止血する。

PET 撮影方法:

撮影に際しては、イソフルレン吸入麻酔を用い、右大腿動脈ならびに静脈に外径 0.61mm のポリエチレン製チューブを挿入、採血経路ならびに Fluoroacetate 投与経路とする。静脈から $500 \mu\text{Ci}/1\text{ml}$ の ^{18}F -Fluoroacetate を $0.5\text{ml}/\text{min}$ で投与し、動脈側から投与開始から 90 分後まで定時採血を行う。採血血液の重量と血中放射能をガンマカウンター ARC-7001 (AROKA) で測定、PET 画像のカウント値と併せて計算し、脳局所の ^{18}F -Fluoroacetate 取り込みを定量する。

組織学的検討法:

脳は 2mm 厚に冠状断スライスし、未固定のまま暗所にて 2%TTC 溶液に浸ける(TTC 染色)。TTC 染色切片をデジタルカメラ撮像し、画像解析ソフトウェア解析し切片における脳梗塞領域の判別と脳梗塞体積を求める。その後 4%PFA で固定し、HE 染色、各種免疫染色を行う。免疫染色では抗 s100b 抗体にて glia 細胞の総数の評価、抗 GFAP 抗体にて活性化 glia 細胞の評価、抗 NeuN 抗体にて残存 neuron の評価、抗 RECA-1 抗体にて血管床面積の評価を行う。

脳血流測定法:

ラット大腿動静脈に投薬・採血ラインを確保する。動脈血 $40 \mu\text{l}$ 採血し、血液ガス分析装置 i-STAT 300F (扶桑)にて血液ガス分析する。脳血流は動脈血二酸化炭素飽和度、すなわち呼吸の量によって大きく変わるため、適正な値の範囲内に麻酔深度を調整する。静脈側から ^{125}I -IMP $20 \mu\text{Ci}/300 \mu\text{l}$ を投与し、投与から 2 秒~298 秒まで $40 \mu\text{l}$ ずつ定点採血、ガンマカウンターにて血液放射能を測定する。急速深麻酔下に脳を摘出し凍結の上、前頭極から 4mm、6mm 尾側で $20\mu\text{m}$ 厚に薄切し、イメージングプレートに露光、FLA-7000 (富士フィルム)で解析、局所の脳血流量を算出する。

4. 研究成果

脳虚血部分では glia 細胞の活性化が生じており、その部分に関連して微小血管床の増大が見られた。脳梗塞が生じる流虚血時間を越えると中心部分は全細胞密度、血管床ともに減少に転じ、虚血に反応した glia と血管症増大との関連が示唆された。

しかし、血管のセグメントの数は虚血・非虚血で優位な差を持った増加はなく、この血管症の増大は微小血管の拡張によると考えられた。

ただ、血管床の拡大が虚血耐性を成しているかどうかは未確認である。グリア代謝を増減させることができる方法を開発し、検討をすすめていく。

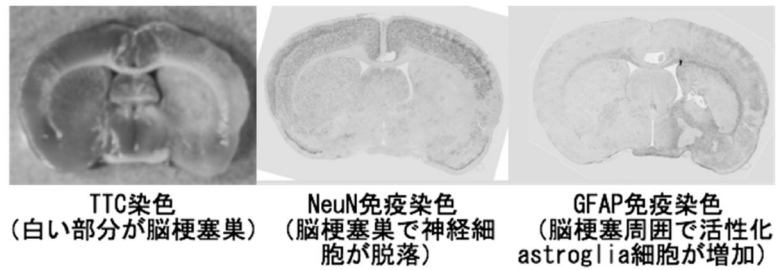


図 1 : ラット脳梗塞モデルの脳の冠状切片

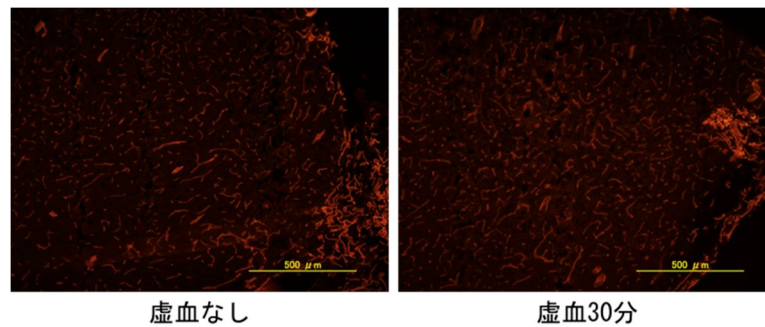


図 2 : 梗塞コア周辺部の微小血管。虚血後、微小血管の血管床面積に増加がみられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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 :
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 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究協力者
研究分担者氏名 : 菊田 健一郎

ローマ字氏名：Kikuta, Ken-ichiro

研究協力者氏名：岡沢 秀彦

ローマ字氏名：Okazawa, Hidehiko

研究協力者氏名：根石 拡行

ローマ字氏名：Neishi, Hiroyuki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。