

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K10764

研究課題名(和文) 神経活動と末梢血流の多角的光学計測による血行障害への保存療法に対する実験的解析

研究課題名(英文) Experimental analysis of conservative therapy for blood circulation disorders using multifaceted optical measurement of nerve activity and peripheral blood flow

研究代表者

地引 政利 (JIBIKI, Masatoshi)

国際医療福祉大学・大学病院・准教授

研究者番号：50422481

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ラット(生後5-6週齢)の交感神経幹の標本で、最適濃度のコラゲナーゼを含む人工脳脊髄液(ACSF)で処理し、吸光膜電位感受性色素(VSD)NK2761を用いて、ラットの交感神経幹を染色することが可能となった。さらに、交感神経幹の電気刺激により交感神経節からシナプス電位を記録することに成功した。ACSF中では、spike状のfast signalと時間経過の長いslow signalが記録された。シグナルの波形解析からシナプス前ニューロンの活動電位、シナプス後ニューロンの活動電位、シナプス後ニューロンの興奮性シナプス後電位(神経伝達物質はアセチルコリン)に相当するシグナルを分離に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、血管外科と生理学を融合した独創的な研究であり、閉塞性動脈硬化症(PAD)患者の保存的治療における臨床上的の問題点を端を究し、治療法の基盤となる基礎的背景(虚血筋への栄養血管の発達)を生理学と組み合わせた解析、すなわち、従来の電気生理学的測定法を適用するのではなく、膜電位感受性色素を用いたニューロン活動の光学的イメージング法を導入し、神経系の機能形成・機能発生・機能構築過程について解析を行ってきた。これにより、問題解明の第一歩になった。さらに、得られる成果を臨床にフィードバックすることで、PAD治療に生かせるであろう。

研究成果の概要(英文)：Sympathetic nerve trunk preparations from rats (5-6 weeks of age) were treated with artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing optimal concentrations of collagenase, and the voltage-absorbing membrane voltage-sensitive dye (VSD) NK2761 was used to detect sympathetic activity in rats. It became possible to stain the nerve trunk. Furthermore, we succeeded in recording synaptic potentials from sympathetic ganglia by electrical stimulation of the sympathetic trunk.

In ACSF, a spike-like fast signal and a slow signal with a long lapse of time were recorded. From waveform analysis of signals, we succeeded in separating signals corresponding to action potentials of presynaptic neurons, action potentials of postsynaptic neurons, and excitatory postsynaptic potentials of postsynaptic neurons (the neurotransmitter is acetylcholine).

研究分野：血管外科

キーワード：閉塞性動脈硬化症 多角的光学計測法 光学イメージング法 膜電位感受性色素 新生血管発達 側副血行路

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、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

高齢化社会での閉塞性動脈硬化症患者の増加

現在の高齢化社会において冠動脈疾患・脳血管疾患は増加傾向にあり、さらに腹部・下肢動脈に動脈硬化性変化の生じる閉塞性動脈硬化症 (PAD) も年々増加してきている。アテローム血栓症イベントリスクを持つ7万人弱の患者を対象とした大規模な国際前向き観察研究、REACH Registry (JAMA. 2006 11;295(2):180-9.) から PAD 患者では冠動脈疾患や脳血管疾患といった脈管疾患を併発する危険性が他の疾患に比較して最も高いことが言及されている (J Am Coll Cardiol.;48(6): 1183-9, 2006)。したがって PAD の臨床においては正確な早期診断とそれに続く効率的な治療が肝要である。PAD の治療には、保存的治療 (運動療法・薬物療法)、外科的治療 (外科的バイパス術、経皮的血管拡張術、交感神経ブロック) などがある。とくに経皮的血管拡張術は低侵襲で積極的に行われているが、高齢化社会に向けて低侵襲な治療とその必要最小限の治療を行うことで、医療コスト削減できる効率的な治療が選択され、期待される。さらに、これに至る前の保存的治療、特に運動療法や薬物療法によって疾患の進行を防ぎ改善し、PAD の早期診断することが重要である。

### 保存的治療である運動療法による歩行能力改善

保存的治療の一つである運動療法によって、最大歩行距離が改善されることは以前から観察されているが、これに比べて、血流の指標である安静時 ABI (下肢分節血圧比: 下肢血圧/上腕動脈血圧) の改善は少ないといわれる。運動療法や薬物療法の根拠となる側副血行路発達のメカニズムに関しては、いまだにその正確な機序は不明のままであり、その解明が責務である。

### 運動療法効果のメカニズム

運動療法効果のメカニズムとしては、既存の側副血行路の拡張、運動による誘発される血管新生、NO を介した血管内皮細胞の血管拡張効果の増強 (Napoli C. Nitric oxide and atherosclerosis. 2001.)、血小板凝集抑制、骨格筋の代謝上昇、血液粘調度の低下などが考えられる。さらに、保存的治療である薬物療法も、臨床的に、跛行症状の改善が得られることは報告されているが (Ichiki M. J Jpn Coll Angiol, 50, 2010)、側副血行路は発達には、不明のところが多い。

虚血肢において効果的に側副血行路の発達には arteriogenesis 誘導物質を選択的にデリバリーすることが必要であることが言われ、さらに、側副血行治療物質のデリバリーターゲットの選択が重要であることが示されている (Kagatya, Gene Therapy19; 61-69, 2012)。したがって、その効率的な側副血行路を得るために、側副血行路の発達のメカニズムを詳細に解析する必要がある。

### 保存的療法と側副血行路—神経との関与—

以上述べてきたように、PAD 患者において保存的療法によっていかに側副血行路を形成するかが大切である。Takeshita らは、家兎片側下肢虚血モデルを作成し、腸骨動脈内への VEGF 投与によって側副血行路を促進させたことを報告した (Takeshita S, J Clin Invest; 93(2):662-670, 1994)。一方、他のメカニズムに着目した側副血行路を形成の研究も見られる。マウス表皮における末梢神経と動脈の併走に関する研究においては、末梢神経軸索のパターンにより動脈形成が行われる (Mukouyama, Cell 109, 693-75, 2002) との報告がある。さらに、遺伝子改変動物を用いた解析から、動脈の形成に神経が重要な役割をはたすことが明らかにされ始めた (Mukouyama, Cell 109, 693-75, 2002; Li, Dev. Cell 24, 359-37, 2013)。血管の発生過程では、一様な網目状の毛細血管が形成され、さらにそこに神経が出現すると近傍の毛細血管が動脈へと分化して、動脈と神経との並走性が構築されることになる (Kidoya, Dev. Cell 33; 247-259, 2015)。この毛細血管の動脈化は、神経から産生される VEGF および CXCL12 が関与していると報告されている (Kidoya, Cell, Dev. Cell 33; 247-259, 2015)。





図 2：大型の光学顕微鏡 (Nikon Eclipse E800) の上に載せてある黒い大きな箱の中に、464 本の光ファイバーと 464 個のフォトダイオード・I-V コンバーターが納められている。

#### 4. 研究成果

- (1) ラット (生後 5-6 週齢) の交感神経幹の標本から比較的充分な長さを得ることができ、最適濃度のコラゲナーゼを含む人工脳脊髄液 (ACSF) で処理し、吸光膜電位感受性色素 (VSD) NK2761 を用いて、ラットの交感神経幹を染色することが可能となった図 3 (A, B)。その結果、交感神経幹の電気刺激により交感神経節からシナプス電位を記録することに成功した。

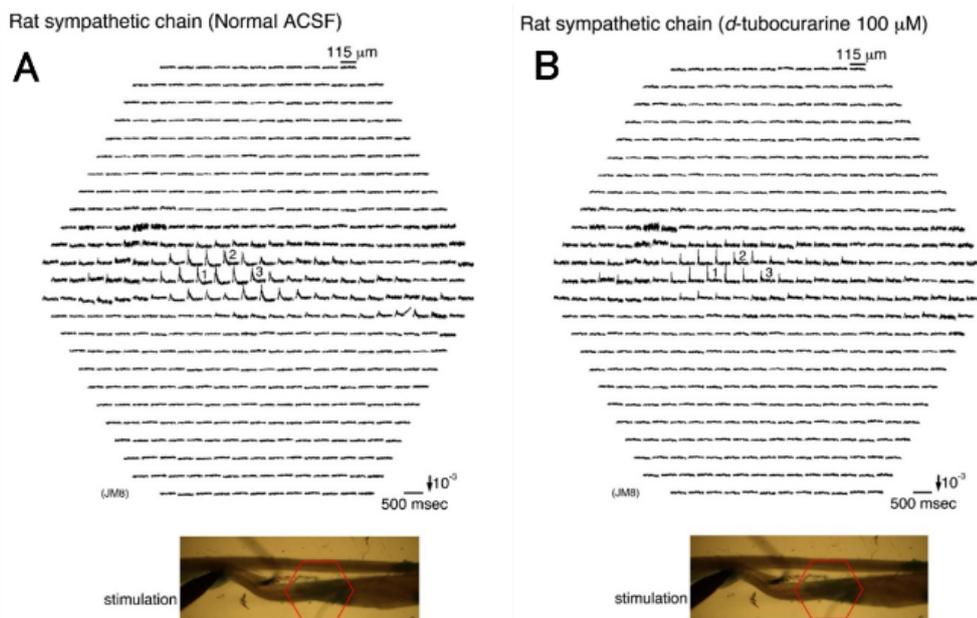


図 3 (A, B) rat から摘出した胸部交感神経幹を NK2761 で染色し、神経束を電気刺激したときに交感神経節で記録された光学シグナル (A: Normal ACSF での記録で、8 回の刺激で得られた光学シグナルを加算平均) 測定部位：赤い六角形の部位。B は 100  $\mu$ M の d-tubocurarine を含む

ACSF での記録を行った。

- (2) ACSF 中では、spike 状の fast signal と時間経過の長い slow signal が記録された。一方、d-tubocurarine を含む ACSF では、spike 状の fast signal のみが観察された。

- (3) シグナルの波形解析からシナプス前ニューロンの活動電位、シナプス後ニューロンの活動電位、シナプス後ニューロンの興奮性シナプス後電位 (神経伝達物質はアセチルコリン) に相当するシグナルを分離に成功した。

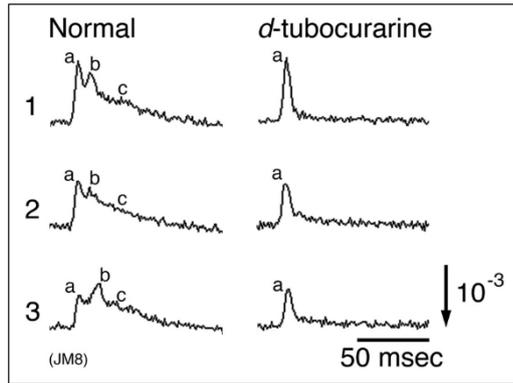


図 4：図 3 の光学的記録において、図中 1～3 の領域で得られた光学シグナルを拡大表示した図。 Normal ACSF 中では、spike 状の fast signal (a, b) と時間経過の長い slow signal (c) が記録された。一方、d-tubocurarine を含む ACSF では spike 状の fast signal (a) のみが観察された。a, b, c はそれぞれ、シナプス前ニューロンの活動電位、シナプス後ニューロンの活動電位、シナプス後ニューロンの興奮性シナプス後電位（神経伝達物質はアセチルコリン）に相当するシグナルと考えられた。

<引用文献>

- ① Regensteiner JG, et al. Exercise training improves functional status in patients with peripheral arterial disease. *J Vasc Surg.* 1996;23(1):104-15.
- ② Wullink M, et al. A primary care walking exercise program for patients with intermittent claudication. *Med Sci Sports Exerc.* 2001;33(10):1629-34.
- ③ Meilhac O, et al. Role of arterial wall antioxidant defense in beneficial effects of exercise on atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21(10) :1681-8.
- ④ Napoli C, et al. Nitric oxide and atherosclerosis. *Nitric Oxide.* 2001;5(2):88-97.
- ⑤ Ichiki M. *J Jpn Coll Angiol.* 2010;50:449-454.
- ⑥ Mukoyama YS, et al. Sensory nerves determine the pattern of arterial differentiation and blood vessel branching in the skin. *Cell.* 2002;14;109(6):693-705.
- ⑦ Li W, et al. Peripheral nerve-derived CXCL<sub>12</sub> and VEGF-A regulate the patterning of arterial vessel branching in developing limb skin. *Dev Cell.* 2013;25;24(4):359-71.
- ⑧ Kidoya H, et al. APJ Regulates Parallel Alignment of Arteries and Veins in the Skin. *Dev Cell.* 2015;4;33(3):247-59.
- ⑨ Momose-Sato Y, Sato K, et al. Evaluation of optimal voltage-sensitive dyes for optical monitoring of embryonic neural activity. *J Membr Biol.* 1995;144(2):167-76.

5. 主の発表論文等

[学会発表] (計 1 回)

地引政利、佐藤勝重、末梢血流発達に関する多角的光学計測による実験的解析、第 60 回日本脈管学会総会、2019.

6. 研究組織

研究分担者

研究分担者氏名：佐藤 勝重

ローマ字氏名：SATO Katsushige

所属研究機関名：駒沢女子大学

部局名：人間健康部

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：80291342

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|                                      |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>地引政利、佐藤勝重                 |
| 2. 発表標題<br>末梢血流発達に関する多角的光学計測による実験的解析 |
| 3. 学会等名<br>第60回日本脈管学会総会              |
| 4. 発表年<br>2019年                      |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                         | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                   | 備考 |
|-------|---|---|----|
| 研究分担者 | 佐藤 勝重<br><br>(SATOU Katsushige)<br><br>(80291342) | 駒沢女子大学・人間健康学部・教授<br><br><br><br>(32696) |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

|         |         |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|