

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08963

研究課題名(和文) 脳脊髄液動態の制御機構を解明し脳代謝産物の頭蓋外への排泄を促進させる

研究課題名(英文) Acceleration of brain metabolism outflow by the analysis of cerebrospinal fluid movement regulation system

研究代表者

赤井 卓也 (AKAI, Takuya)

富山大学・学術研究部医学系・講師

研究者番号：50222500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：脳脊髄液は脈絡叢で産生され、各脳室を経由してくも膜下腔に出てくも膜顆粒を経て静脈洞に流れていくとするBulk flow theoryが定説であった。本研究はマウス胎児を用いた実験であるが、金コロイドおよび蛍光色素の脳室内注入による生体での脳脊髄液動態を把握する手法を確立した。その結果、前頭蓋底、脈絡叢、脳実質内毛細血管などが、脳脊髄液の頭蓋外への流出路となっていることが示唆された。また、頭蓋外への流出には分子量、サイズの制御があることが明らかとなった。脈絡叢に入った粒子は直下の血管内へと流出することが推察されるが、前頭蓋底に出た粒子はどの組織を経由して全身へと拡がるか未だ解明できていない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

頭蓋内代謝産物の頭蓋外への流出に脳脊髄液が重要な役割をもっていることが近年注目されている。脳脊髄液の頭蓋外への流出路とその制御機構が明らかになることで、脳脊髄液動態をコントロールする手法の解明につながり、脳代謝産物の蓄積による中枢神経変性疾患や脳老化、水頭症、頭蓋内腫瘍の治療へと発展させることが可能となる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the outflow mechanism of substances in the CSF from the brain. We established gold conjugates injection and fluorescein injection methods into mouse fetus lateral ventricle. The gold particle deposition was mainly observed in the frontal skull base. Electron microscopic study showed the deposition on the choroid plexus and ependyma in the lateral ventricle and also in the liver. By fluorescein injection with different molecular weight revealed that only small molecular size fluorescein can spread to extracranial space. This study indicated that the particles in the CSF were shown to move from the brain to the frontal skull base and also into the blood stream through the choroid plexus. The outflow of particles in the CSF may be regulated by molecular size and weight. The tract histology through frontal skull base should be disclosed in the future study.

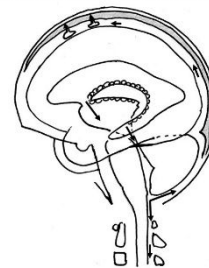
研究分野：医学

キーワード：脳脊髄液 動態 金コロイド 透明化 蛍光色素 マウス胎児 脳変性疾患 水頭症

1. 研究開始当初の背景

脳脊髄液は、脳および脊髄を浸す水として存在し、その役割は、脳・脊髄を乾燥から守る、脳・脊髄を衝撃から守る、頭蓋内圧コントロールに關与するとされているが、それ以上の役割は明らかでない。また、脳脊髄液が過剰であっても過少であっても、生体の活動を妨げ、その恒常性維持は生命に関わる。これまで脳脊髄液は、約 100 年前に提唱された定説(脳脊髄液は脈絡叢で産生された後、側脳室から第 3、4 脳室を経て、くも膜顆粒を介して静脈洞に流入していく：**Bulk flow theory**) が指示されてきた。(上図)しかし、近年の研究によりその矛盾点が明らかとなった。また、脳脊髄液の新たな役割として、脳で産生される老廃物を頭蓋外へ排出させる可能性が発見された。

<脳脊髄液循環の定説>



よって、脳脊髄液循環制御機構およびその経路を解明することは、脳に過剰な脳脊髄液が貯留する水頭症の治療だけでなく、老廃物の蓄積による中枢神経系変性疾患および脳老化の予防・治療、脳への有効な薬物運搬路の開発へと発展させることができると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、脳脊髄液循環制御機構および経路を解明することで、**老廃物の頭蓋外への排出を促進する手段を開発する**。それにより、脳の水分調節だけでなく、**認知症、脳老化、変性疾患の予防・治療**に役立てることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 脳脊髄液循環路測定方法 (Multi-labeled shotgun tracer法) の確立

金コロイド法による脳脊髄液循環路測定方法を確立

ファストグリーンを混じた金コロイド (2-200 nm) をマイクロインジェクション法を用いて生体マウス胎児脳室内に注入する。

- 1) 胎児を母胎にもどし、固定後銀染色を行い金コロイドを可視化、胎児全身を透明化することで金粒子集積部位を同定。
- 2) 胎児を固定後、電子顕微鏡で金粒子付着部位を同定

蛍光色素法による脳脊髄液循環動態解明のためのlive imaging法を確立

市販および独自に合成した分子量の異なる蛍光色素標識トレーサーをマウス胎児脳室内に注入し、蛍光顕微鏡下に蛍光色素の移動をlive imagingで観察した。

(2) 脳脊髄液循環動態の解明

蛍光色素法および金コロイド法を用いて脳脊髄液循環チャンネルの篩い

サイズの異なる金粒子の頭蓋内外の付着部位および分子量の異なる蛍光色素の移動をlive imagingで観察すること、および頭蓋外で観察できた金粒子サイズを測定することで、脳脊髄液内粒子の頭蓋外への移動制御に関わる篩の分子量、サイズを決定する。

頭蓋外への脳脊髄液循環路を可視化

- 1) ポリアクリルアミドキャスト法
色素を混じたポリアクリルアミドを生体胎児脳室内に注入し、脳脊髄液循環路のキャストを作成する。
- 2) 蛍光色素脳室内注入法

Cadaverine を生体胎児脳室内に注入し、一定時間後に固定することで、Cadaverine の脳室外、頭蓋外への移動経路を同定する。

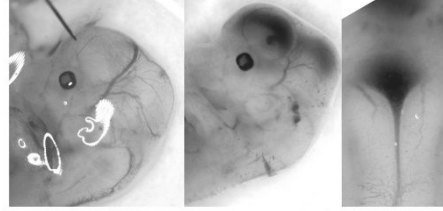
4. 研究成果

(1) 脳脊髄液循環路測定方法 (Multi-labeled shotgun tracer法) の確立

金コロイド法による脳脊髄液循環路測定方法を確立

1) 母胎子宮から出した胎児生体マウス脳室内にファストグリーンを混じた金コロイドを注入し、母胎に胎児をもどすことで、金コロイドの生体内での移動を観察する手法を確立した (右図)。

ファストグリーンの脳室内注入と脳室、脊髓腔の描出



臍帯につながった状態で子宮から取り出した胎児側脳室にファストグリーンを注入(左)。側脳室(中)、脊髓腔(右)が描出されている。

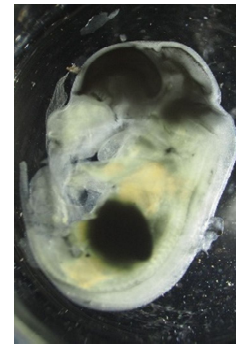
2) 透明化による金粒子集積部位の同定

前頭蓋底および脊柱管内に金粒子の集積を確認した (右図)。

3) 電子顕微鏡下での金粒子集積部位の同定



脳室上衣間および細胞質内、脈絡叢上衣間および細胞質内、心臓内および肝臓に金粒子を認めた。肝臓内に認めた金粒子は2nmのもののみであった。

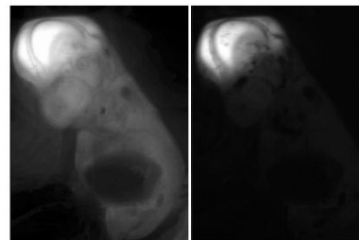


脳室上衣間および細胞質内の金粒子 (上図)

蛍光色素法による脳脊髄液循環動態解明のためのlive imaging法を確立

脳室内に注入した蛍光色素は、分子量小さいものは短時間で体全体に広がるが、分子量が大きいものは頭蓋外に拡がらなかった (右図)。

蛍光色素の脳室内注入



MW 759

MW 3000

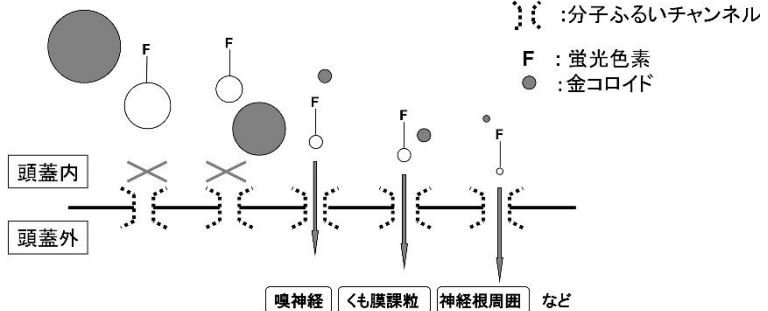
蛍光色素を胎児側脳室に注入し、live imagingで観察。分子量の小さい蛍光色素は全身に拡がったが、高分子量の蛍光色素は頭蓋内にとどまった。

(2) 脳脊髄液循環動態の解明

蛍光色素法および金コロイド法を用いて脳脊髄液循環チャンネルの篩い

上記の実験結果から、脳脊髄液中の粒子の頭蓋内から頭蓋外への移動には、そのサイズおよび分子量の篩があることが明らかとなった (右図)。

<脳脊髄液移動の分子ふるいチャンネル>



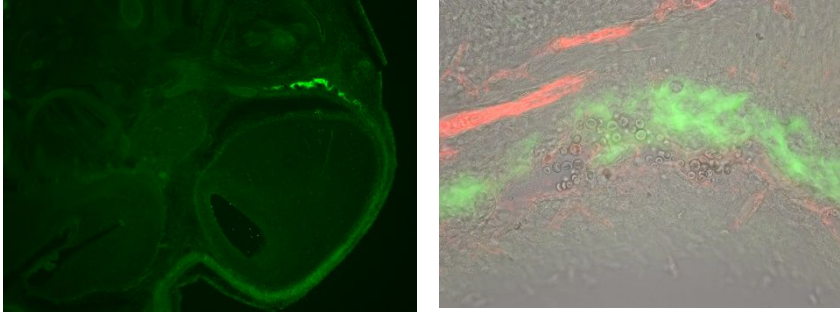
頭蓋外への脳脊髄液循環路を可視化

1) ポリアクリルアミドキャスト法

脳室内に濃度の異なるポリアクリルアミドを注入したがキャストを作成させることができなかった。

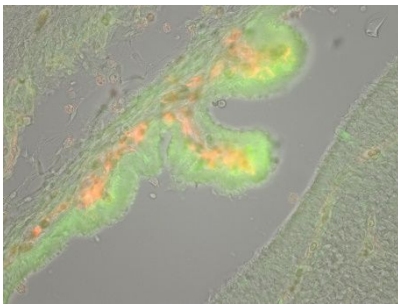
2) Cadaverine 脳室内注入法

Cadaverine が前頭蓋底、脈絡叢上衣、脳室上衣、脳実質内細血管に付着していることを同定した。CD21 との二重染色では、Cadaverine 付着部位と血管内皮は一致していなかった。



マウス胎児頭部

前頭蓋底 : Cadaverine (green), CD21 (red)



側脳室内脈絡叢

Cadaverine (green), CD21 (red)

これらに実験により、前頭蓋底、脈絡叢、脳実質内毛細血管などが、脳脊髄液内粒子の頭蓋外への流出路候補として考えられた。また、頭蓋外への流出には分子量、サイズの制御があることが明らかとなった。しかし、脈絡叢に入った粒子は直下の血管内へと流出することが推察されるが、前頭蓋底に出た粒子はどの組織を経由して全身へと拡がるか解明できていない。また、これらの実験は、くも膜顆粒が存在しないマウスを用いた実験であり、必ずしもヒトに当てはまらない可能性がある。また、胎児ではなく成体ではどのようなになっているか解明が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Akai Takuya, Hatta Toshihisa, Shimada Hiroki, Mizuki Keiji, Kudo Nae, Hatta Taizo, Otani Hiroki	4. 巻 58
2. 論文標題 Extracranial outflow of particles solved in cerebrospinal fluid: Fluorescein injection study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Congenital Anomalies	6. 最初と最後の頁 93~98
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cga.12257	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Akai Takuya, Hatta Toshihisa, Sakata-Haga Hiromi, Yamamoto Seiji, Otani Hiroki, Yamamoto Shusuke, Kuroda Satoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Cerebrospinal fluid may flow out from the brain through the frontal skull base and choroid plexus: a gold colloid and cadaverine injection study in mouse fetus (in press)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Childs Nerv Syst	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Akai Takuya, Hatta Toshihisa, Shimada Hiroki, Kuroda Satoshi
2. 発表標題 Extracranial outflow of gold particles in cerebrospinal fluid
3. 学会等名 International Society of Pediatric Neurosurgery (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 赤井卓也、八田稔久、島田ひろき、黒田 敏
2. 発表標題 脳脊髄液循環動態の解明 - 脳室内注入金粒子および蛍光標識プローベの動態解析 -
3. 学会等名 日本脳神経外科学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	八田 稔久 (HATTA Toshihisa) (20238025)	金沢医科大学・医学部・教授 (33303)	

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
---------	---------