

令和 4 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2018～2021
課題番号：18K10125
研究課題名(和文) アルコールが乱す脳梗塞神経細胞ニッチ

研究課題名(英文) Ethanol disturbs inchemic brain edema

研究代表者

片田 竜一 (Katada, Ryuichi)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：00423757

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：脳梗塞後、脳浮腫及び脳アクアポリン4(AQP4)発現が増大した。AQP4発現は脳梗塞後5日目までは脳梗塞辺縁部の方が中心部よりも相対的に増大したが、7日目では中心部の方が増大した。初代培養アストロサイトに虚血負荷を行うと、AQP4発現が増大した。エタノールを負荷すると、エタノールの中程度濃度負荷でAQP4発現増大がピークとなったものの、虚血負荷を合わせると消失した。虚血負荷によるAQP4発現に及ぼす影響に対しエタノールが関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳梗塞後脳浮腫において、アクアポリン4(AQP4)発現は、虚血後の経過時間により、また梗塞巣内でも中心部か辺縁部かで異なることが明らかとなった。したがって、脳浮腫軽減を目的としたAQP4に対する治療としては、病巣部位を考慮する必要がある。酩酊状態で脳梗塞を発症すると、AQP4発現に及ぼす影響がアルコールによって変化し、脳浮腫軽減を目的とした治療が困難になる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：After cerebral infarction, brain edema was augmented by the increase of aquaporin 4 (AQP4) expression. As for AQP4 expression, cerebral infarction marginal region was more remarkable after the cerebral infarction than a center until the fifth day, however, a center became higher on the seventh day. AQP4 expression increased under ischemic stress in the primary astrocyte culture. On the other hand, although the increase of AQP4 expression showed peak under mild dose of ethanol exposure, together with ischemic and ethanol exposure, the peak was passed away. Ethanol was shown to be concerned for influence to give to AQP4 expression by the ischemic stress.

研究分野：法医学

キーワード：脳浮腫 アクアポリン4 脳卒中 アストロサイト

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

法医実務において、脳卒中は交通事故、転落などの外因への関与にもつながり、また原死因、直接死因ともに関わることから、発症機序及び病態の把握は重要である。脳卒中の内、最も頻度が高い脳梗塞においては、高齢者の増加に伴って、脳卒中関連死者も増加してきている。研究代表者らは以前、飲酒者の頭部外傷重症化に着目し、エタノールが脳挫傷後脳浮腫を増大させ、予後を悪化させることを動物実験により明らかにした。しかしながら、頭部外傷よりも罹患率が多い脳卒中において、エタノールがどのように影響するのかは明らかではない。厚生労働省によると、1日1合以上飲酒する飲酒習慣者は、40歳代以上で20から30%を占める。脳梗塞においては、40歳程度から発症が認められる点を踏まえると、脳梗塞の発症にアルコールが関与している可能性が高い。飲酒時に脳梗塞を発症しやすいと経験的に知られている一方で、実験的には、脳梗塞発症後におけるエタノール投与が脳梗塞治療に有効であるとの報告もある。エタノールは炎症関連因子、神経保護関連因子、水チャンネル等、脳卒中あるいは脳挫傷の予後に関わる因子に影響することが知られている。日本国民に最も馴染みのある薬物であるアルコールが脳卒中、特に脳梗塞の病態にどのように関与するのか明らかでない。

2. 研究の目的

日本国民にとって最も身近な薬物であるアルコールは虚血性脳疾患、主に脳梗塞にどのように影響するかを検討するのが目的である。現在の高齢社会において、脳梗塞の罹患率は増加することが確実視され、また国民性の影響からか飲酒率は変化しないことが予想される。従って、飲酒による脳梗塞の影響を検討することは、飲酒をした、あるいは長年飲酒していることによって、不幸にして発症もしくは死亡してしまった方に対する治療または予防の一助になる可能性がある。以前、研究代表者はエタノールが脳挫傷の予後を悪化させ、その機序にアクアポリン4(AQP4)が関与することを報告した。エタノールの脳梗塞に及ぼす影響についてはほとんど知られていないのが現状であり、飲酒が脳梗塞に及ぼす影響の程度、機序を明らかにすることにより、発症予防、より有効な治療方法の発見が期待できる。

アルコールの投与は脳梗塞にどのように影響を与えるのか、影響するのであればその機序は何かを明らかにする。研究代表者らはこれまで、エタノールが転写制御因子であるNF-kappaB活性を増大させ、炎症性サイトカインを上昇させることを初代培養肝細胞を用いて明らかにしてきた。またエタノールの慢性投与は大腿骨頭壊死を発症させ、その機序に炎症性サイトカインが関与することも明らかにしてきた。そして脳挫傷後脳浮腫の増大に水チャンネルの1つであるAQP4がエタノールにより増大することも明らかにしてきた。従って、脳梗塞に対してもエタノールはこれらの因子が関与する可能性が高い。まずはエタノールが脳梗塞に対してどのように影響するのか、動物実験により検討を行う。エタノールは脳浮腫を増大させることから、脳梗塞に対して予後を悪化させる可能性が高い。脳梗塞部位にはマイクログリア(マクロファージ等)が集積し、神経細胞の損傷に関与したり、回復を促進する働きがあることが知られている。そこで、脳梗塞病巣部分のマイクログリア及びアストロサイトをを用いた細胞実験により、エタノールがこれらの細胞へ及ぼす影響を検討した。

3. 研究の方法

(1)動物実験

生後約8週齢のラットに対し、右中大脳動脈閉塞による脳梗塞モデルを作成した。具体的には、頸部切開の後、頸動脈分岐部を露出、外頸動脈を結紮焼灼して総頸動脈及び内頸動脈をクリップにて一時遮断。内頸動脈を切断して切断面から先を丸めたナイロン糸を挿入。内頸動脈側のクリップをはずしつつ、糸を1cm挿入して右中大動脈まで進め、閉創する。脳梗塞作成後に脳を抽出してweight/dry ratio法(脳を乾燥させる前と後での重量比)により脳浮腫の評価を行った。またTTC(2,3,5-Triphenyl tetrazolium chloride)染色を行い組織学的にも虚血病巣を確認した。

(2)細胞実験

既報に従って単離した初代培養アストロサイトを使用した解析を行った。初代培養アストロサイトは、安楽死させた新生仔ラットの脳を摘出し、髄膜等を除去した後、メッシュ破碎を行って、遠心等の処置を施行して培地に播種した。その後、PLLコーティングプレート処置等によりアストロサイトを単離した。アストロサイトに対し、培地中にエタノールを0から100mMの濃度で反応させ初代培養アストロサイトを抽出し、培地にエタノールを添加し、その1時間後から虚血環境として、oxygen-glucose deprivation (OGD)負荷を6時間行った。通常培地に戻して24時間後に細胞を採取し、解析を行った。

上記動物実験により作成した梗塞脳を摘出し、梗塞巣に集積したマイクログリアを単離した。具体的には、右中大脳動脈閉塞後7日目の大脳を摘出し、梗塞側の右脳を裁断、濾過、遠心等の処置を行ってプレートに播種した。その後、初代培養アストロサイトとマイクログリアとの共培養実験を行った。

4. 研究成果

(1) 脳梗塞後脳浮腫と AQP4 発現

右中大脳動脈閉塞後、7日目まで経時的に脳を摘出し、梗塞側である右脳と非梗塞側である左脳で weight/dry ratio 法等により評価したところ、時間依存的に脳浮腫が悪化した。また AQP4 の mRNA 発現を検討したところ、脳浮腫の程度と同様に経時的に発現量が增大した。これは脳梗塞後5日目までは脳梗塞辺縁部の方が、中心部よりも顕著であったものの、7日目では中心部の方が発現量が高かった。

脳梗塞後脳浮腫において、AQP4 発現は脳梗塞発症後の時間経過により、また梗塞巣内でも中心部か辺縁部かで異なることが明らかとなった。したがって、AQP4 をターゲットとした脳浮腫軽減を図るとすると、治療としては、病巣部位を考慮する必要がある。

(2) アストロサイト、マイクログリアに及ぼす AQP4 への OGD・エタノールの影響

初代培養アストロサイトの培地にエタノールを 0, 10, 25, 50, 100mM の濃度で添加して、AQP4 mRNA 発現を検討したところ、エタノールの比較的低濃度群では、コントロールに比べ、低下し、高濃度では発現が増大した(図1)。初代培養アストロサイトとマイクログリアの共培養実験で、同様にエタノールを負荷するも、特に変化は認められなかった。

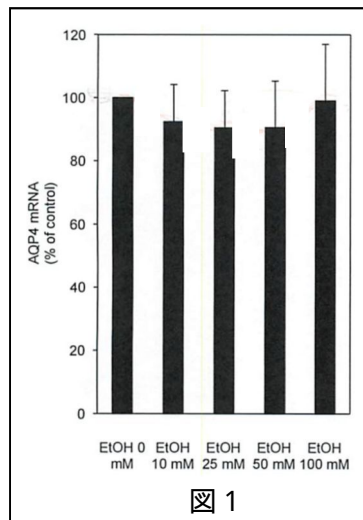


図 1

初代培養アストロサイトに OGD 負荷 (6 時間) を行うと、負荷後 36 時間までは非負荷群と比べ変化がなかったが、負荷後 48 時間になると、OGD 負荷により AQP4 発現が増大した。初代培養アストロサイトとマイクログリアの共培養実験では、OGD 負荷により負荷後 24 時間及び 48 時間で AQP4 発現が低下した。このことから、OGD 負荷による AQP4 発現の増大がマイクログリアによって抑制される可能性が示唆された。

エタノールを単独で負荷すると、50mM をピークに AQP4 発現が増大した。OGD 負荷の 1 時間前からエタノールを添加し、OGD を 6 時間負荷させた(飲酒者の脳梗塞発症を想定した)実験群では、エタノール単独負荷で見られた中濃度域での増大ピークは、OGD 負荷を追加すると、差は認められなくなった(図2)。

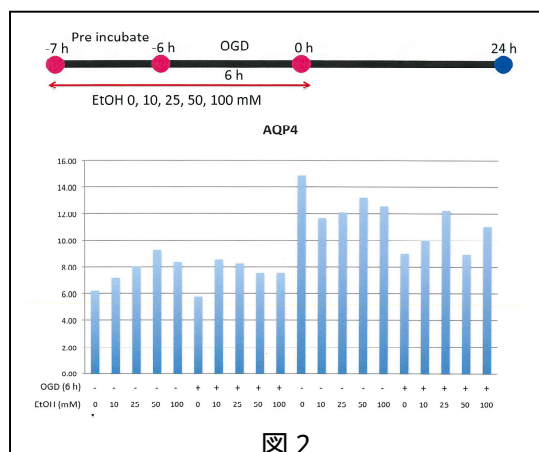


図 2

このことから、飲酒者の脳梗塞後に生じる脳浮腫については、AQP4 をターゲットにした場合、飲酒の有無のみならず、血中エタノール濃度にも注意して、発現を抑制する等の効果のある薬剤等を検討するのが、効果的である可能性が示唆された。

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 0件）

1. 著者名 Murata Yukie, Sugimoto Kana, Yang Chihpin, Harada Kazuo, Gono Rina, Harada Teiji, Miyashita Yohei, Higashisaka Kazuma, Katada Ryuichi, Tanaka Junya, Matsumoto Hiroshi	4. 巻 140
2. 論文標題 Activated microglia-derived macrophage-like cells exacerbate brain edema after ischemic stroke correlate with astrocytic expression of aquaporin-4 and interleukin-1 alpha release	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 104848 ~ 104848
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuint.2020.104848	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 -

1. 著者名 Yang Chihpin, Sugimoto Kana, Murata Yukie, Hirata Yuichiro, Kamakura Yu, Koyama Yoshihisa, Miyashita Yohei, Nakama Kentaro, Higashisaka Kazuma, Harada Kazuo, Katada Ryuichi, Matsumoto Hiroshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Molecular mechanisms of Wischnewski spot development on gastric mucosa in fatal hypothermia: an experimental study in rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1877 ~ 1877
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-58894-8	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16件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 郷野里奈, 杉本香奈, 原田悌志, 楊志斌, 宮下洋平, 東阪和馬, 原田和生, 片田竜一, 松本博志
2. 発表標題 虚血性脳梗塞後の脳浮腫の進行に対するトレッドミル運動の影響
3. 学会等名 第67回日本法医学会学術近畿地方集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉本香奈, 村田幸咲, 楊志斌, 郷野里奈, 原田悌志, 宮下洋平, 東阪和馬, 原田和生, 片田竜一, 松本博志
2. 発表標題 脳梗塞後の脳浮腫形成にもたらす梗塞巣集積マクロファージの種類とその役割
3. 学会等名 第104次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉本香奈, 楊志斌, 村田幸咲, 郷野里奈, 平田雄一郎, 原田悌志, 宮下洋平, 東阪和馬, 原田和生, 片田竜一, 松本博志
2. 発表標題 一過性脳虚血モデルラットにおけるmiRNAの経時・空間的発現変動の網羅的解析
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村田幸咲, 杉本香奈, 楊志斌, 郷野里奈, 原田悌志, 宮下洋平, 東阪和馬, 原田和生, 片田竜一, 田中潤也, 松本博志
2. 発表標題 脳梗塞後の脳浮腫形成にもたらす活性化microglia/macrophagesの役割
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村田幸咲, 杉本香奈, 楊志斌, 郷野里奈, 平田雄一郎, 宮下洋平, 東阪和馬, 原田和生, 片田竜一, 松本博志
2. 発表標題 脳梗塞後の脳浮腫形成にもたらす活性化microglia/macrophageの役割
3. 学会等名 第65回日本法医学会学術近畿地方集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片田竜一, 吉澤秀憲, 樋口勝麻, 楊志斌, 高橋真樹子, 宮下洋平, 東阪和馬, 杉本香奈, 原田和生, 松本博志
2. 発表標題 分節性動脈内膜融解を認めた椎骨動脈解離症例
3. 学会等名 第65回日本病理学会秋期特別総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Murata Y, Sugimoto K, Yang C, Katada R, Matsumoto H
2. 発表標題 Role of microglia on astrocyte aquaporin-4 expression under oxygen-glucose deprivation
3. 学会等名 第103次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村田幸咲, 杉本香奈, 楊志斌, 郷野里奈, 原田悌志, 宮下洋平, 東阪和馬, 原田和生, 片田竜一, 田中潤也, 松本博志
2. 発表標題 脳梗塞後の脳浮腫形成にもたらず活性化microglia/macrophagesの役割
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉本香奈, 楊志斌, 村田幸咲, 郷野里奈, 平田雄一郎, 原田悌志, 宮下洋平, 東阪和馬, 原田和生, 片田竜一, 松本博志
2. 発表標題 一過性脳虚血モデルラットにおけるmiRNAの経時・空間的発現変動の網羅的解析
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Katada R, Nakagawa S, Nakama K, Miyashita Y, Fujimoto H, Higashisaka K, Sugimoto K, Harada K, Matsumoto H
2. 発表標題 The effect of ethanol on victims by murder
3. 学会等名 19th Congress of International Society for Biomedical Research on Alcoholism (ISBRA) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮下洋平, 中間健太郎, 東阪和馬, 杉本香奈, 原田和生, 片田竜一, 松本博志
2. 発表標題 全エクソーム解析からみた心臓突然死症例の遺伝学的プロファイル
3. 学会等名 日本DNA多型学会第27回学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮下洋平, 中間健太郎, 東阪和馬, 杉本香奈, 原田和生, 片田竜一, 松本博志
2. 発表標題 大阪大学法医学講座におけるゲノム解析体制の構築
3. 学会等名 日本DNA多型学会第27回学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yang C, Sugimoto K, Hirata Y, Kamakura Y, Katada R, Matsumoto H
2. 発表標題 Molecular mechanisms of Wischnewski spot under hypothermia: an experimental study in rats
3. 学会等名 第102次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Go A, Nakama K, Ishida T, Yoshizawa H, Fujimoto H, Yang C, Takahashi M, Mochizuki K, Katada R, Matsumoto H
2. 発表標題 Investigation of the correlation between the lung volumes using postmortem computed tomography images and body heights
3. 学会等名 第102次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 片田竜一
2. 発表標題 脳アクアポリン4に及ぼすアルコールの影響.
3. 学会等名 令和3年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉本香奈, 郷野里奈, 村田幸咲, 楊志斌, 原田悌二, 宮下洋平, 東阪和馬, 原田和生, 片田竜一, 松本博志
2. 発表標題 脳梗塞後のトレッドミル運動による脳浮腫軽減の分子機構
3. 学会等名 第105次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪大学法医学教室ホームページ http://www.legal.med.osaka-u.ac.jp/
--

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

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