

令和 4 年 5 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09456

研究課題名(和文) 脳梗塞予後改善効果をもたらす臓器連関のオミックス解析による分子機構の解明

研究課題名(英文) Trans-omics analysis reveals the inter-organ communication in cerebral infarction

研究代表者

杉本 香奈 (Sugimoto, Kana)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：00581034

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)：脳梗塞後に生じる脳浮腫の治療法はまだ確立されていない。また、運動療法は有効な治療法だが、その効果機序の解明は殆ど進んでない。本研究では、脳浮腫の形成メカニズムを明らかにし、運動療法の効果機序を明らかにすることにより、脳浮腫の新規治療法の開発を目指した。我々は脳梗塞後の梗塞巣に存在する活性化マイクログリアから産生されるIL-1 alphaやTNFが、アストロサイトにおけるAQP4の発現を上昇させ、その結果、脳浮腫の悪化を導くことを明らかにした。また、運動により骨格筋から分泌されるmyokineである内在性IL-1 receptor antagonistが脳浮腫の軽減に効果的であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳梗塞後の脳浮腫に対する治療法が確立されておらず、新規治療法の開発が望まれている。本研究では、脳梗塞の予後進展に及ぼす中枢-末梢臓器間連関を介した運動療法の効果を評価し、myokineであるIL-1 receptor antagonistの脳浮腫抑制効果を明らかにした。これらの研究成果が薬剤の創出に繋がれば、十分なりハビリを開始できない重篤な病態の方に対して、また運動療法が可能な場合においてもより効果的な治療法になることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Cerebral edema following cerebral infarction can be severe and directly cause death. Exercise therapy can be an effective therapy, but its molecular mechanism remains unclear. In this study, we aimed to develop a novel treatment for cerebral edema by clarifying the mechanism of cerebral edema formation and the effective mechanism of exercise therapy. We found that IL-1 alpha and TNF produced by activated microglia in ischemic cores increase the astrocytic AQP4 expression, which in turn exacerbates cerebral edema. Furthermore, we also found that endogenous IL-1 receptor antagonist, a myokine secreted by skeletal muscle during exercise, is effective in attenuating cerebral edema.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：ischemic stroke brain edema myokine IL-1 alpha TNF IL-1RA

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞は日本人の死因で割合が高く、死亡しない場合でも予後不良で運動機能障害等が生じることの多い疾患である。しかしながら、有効な治療法は発症初期を対象としたもので、発症後時間が経過した後の治療法はほとんどない。リハビリテーション(リハビリ)として実施される運動療法は、脳梗塞後遺症の改善効果を有するとして広く実行されている。急性期からのリハビリは、廃用症候群の予防、日常生活動作や生活の質の向上において大きく貢献している。従って、十分なリスク管理のもとに急性期からのリハビリが強く勧められている。しかしながら、病態や容態によっては急性期から十分なリハビリを行うことが難しい方も多い。

ラットやマウスの脳梗塞モデル動物を用いた研究からも急性期からの運動療法が脳梗塞の容積を明らかに減少させ、神経機能の改善をもたらすことが報告されている。これらの運動療法による効果は、脳梗塞の梗塞巣やその周辺領域における炎症性反応や内皮細胞のアポトーシス抑制、血管新生の亢進によるものだと報告されている^(1,2)。また、我々も脳梗塞モデルラットを用いて急性期運動療法が血中コルチコステロン濃度を上昇させ、脳浮腫を減少させることを明らかにした⁽³⁾。このように運動による効果が中枢神経以外の臓器との各種連関によってもたらされていると考えられるが、その詳細は明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究は、脳梗塞の予後進展に及ぼす中枢-末梢臓器間連関を介した運動療法の効果を評価することにより、中枢神経以外の臓器の神経保護機能を明らかにし、運動療法ができない場合、あるいは併用できる新規治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

7週齢の雄性Wistarラットを用いて一過性中大脳動脈閉塞(tMCAO)モデルを作成し、翌日の体重減少率を用いて軽症及び重症の2群に分けた。更に、非運動と運動群に分け、10分間、2-8m/minの速度で6日間トレッドミル運動を実施した。その後、脳浮腫の測定、神経学的機能およびグリップテストを実施した。また、脳を摘出し、2, 3, 5-Triphenyl-2H-tetrazolium Chloride (TTC)染色後、非虚血領域であるコントラ、虚血中心部の周辺領域であるペリ、虚血中心部であるコアの3領域に分けた。各組織内におけるmRNAおよびタンパク質の発現量の測定、血中におけるIL-1 receptor antagonist (IL-1RA)の測定も行った。脳梗塞モデルラットに対するIL-1RA投与実験ではtMCAO前にIL-1RA(10 µg/µL)を左側脳室内に2 µL投与した。コントロール群には人工脳脊髄液(ACSF)を投与した。培養アストロサイトを用いて、脳浮腫形成に寄与するAQP4の発現量に及ぼすIL-1α及びIL-1RAの影響を検討した。

4. 研究成果

(1) tMCAO後の重症度別に群分けを行う指標の探索

本研究では、運動開始前に重症度を見極める必要性があるため、tMCAO翌日の体重減少率に着目した⁽⁴⁾。その結果、tMCAO翌日の体重減少率とtMCAO7日目の脳浮腫、神経学的機能および運動機能に相関関係が認められた。このことからtMCAO翌日の体重減少率はtMCAO7日目の予後を反映していると考え、tMCAO翌日の体重減少率を基準として軽症ラットと重症ラットに群分けを行った。

(2) 脳浮腫、神経学的機能、筋力に対する運動の効果

軽症群(Non-Ex/Mild)と比較し、重症群(Non-Ex/Severe)では明らかに脳浮腫の悪化、神経学的機能及び筋力の低下が認められた(図1, 2)。軽症及び重症ラットをさらに運動群(Ex)と非運動群(Non-Ex)の2群に分け、トレッドミル運動を実施した。重症ラットでは運動により脳浮腫が有意に減少し、神経学的機能の改善が認められたが、軽症群ではこの傾向は認められなかった(図1, 2)。また、筋力に対する運動の効果は認められなかった。

(3) 脳浮腫関連因子に及ぼす運動の効果

次に、運動による効果が認められた重症ラットに着目して、tMCAO7日目のラットの脳浮腫に関与する遺伝子の発現変動を検討した。その結果、運動によりtMCAO7日

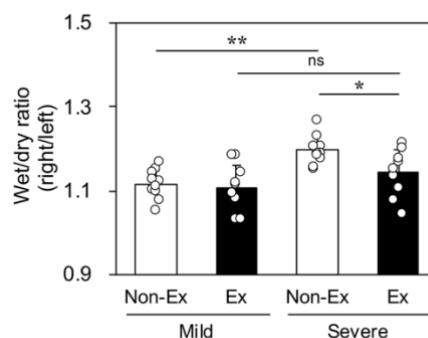


図1. 脳浮腫に及ぼすトレッドミル運動の影響

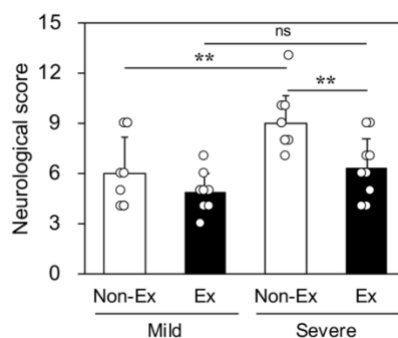


図2. 神経学的機能に及ぼすトレッドミル運動の影響

目の梗塞巣における AQP4 の発現量が有意に減少していた (図 3)。AQP4 の発現誘導に関与する IL-1 α や TNF、AQP4 発現抑制に関与する IL-1RA の遺伝子発現量には運動による影響が認められなかった。

(4) 血中 IL-1RA の濃度に対する運動の効果

IL-1RA は抗炎症性サイトカインであるとともに、運動により骨格筋から産生される myokine でもある。そのため、次に tMCAO 7 日目の血中 IL-1RA 濃度を測定した。まず、脳梗塞後に血中 IL-1RA 濃度が変化するかを調べた。その結果、sham 群と比較して tMCAO 群では、血中の IL-1RA 濃度が有意に低下することが分かった。次に、運動による血中 IL-1RA 濃度への影響を検討した結果、重症ラットでは非運動群と比較して運動群では、血中の IL-1RA 濃度が有意に増加していた (図 4)。

(5) 初代培養アストロサイトの AQP4 発現に及ぼす IL-1RA の影響

初代培養アストロサイトを用いて、IL-1RA が AQP4 の発現に影響を与えるのかを検討した。その結果、IL-1 α を添加すると、AQP4 の発現が増加し、この増加は IL-1RA を添加すると抑制された。従って、IL-1RA はアストロサイトにける AQP4 の発現を減少させることが分かった。

(6) 脳梗塞モデルラットへの IL-1RA の側脳室内投与

IL-1RA には脳浮腫への治療効果が期待できるのではないかと考え、tMCAO 手術前に IL-1RA の側脳室内投与を行った。Sham 群では側脳室内に ACSF を投与し、tMCAO の手術手技の模倣を行った。一方、ACSF 及び IL-1RA 群では、側脳室内に ACSF または IL-1RA を投与し、tMCAO 手術を行った。tMCAO 6 時間後に脳組織内における AQP4 の発現量を比較したところ、図 5 に示す通り、sham 群と比較して、脳梗塞モデルラットの ACSF 群では明らかに AQP4 の発現量が増加していた。一方、IL-1RA 投与群では、ACSF 群と比較して、有意に AQP4 の発現が抑制されていた。次に、tMCAO 7 日目に脳浮腫の測定を行った。その結果、明らかに IL-1RA 投与群では脳浮腫が軽減されていた (図 6)。

以上のことから、脳梗塞後の超急性期に実施するトレッドミル運動は、脳梗塞後に生じる IL-1RA の低下を抑制し、アストロサイトにおける AQP4 の発現減少を導くことにより、脳浮腫を軽減させることが明らかにした。また、IL-1RA の脳梗塞の治療薬として可能性を見出した。

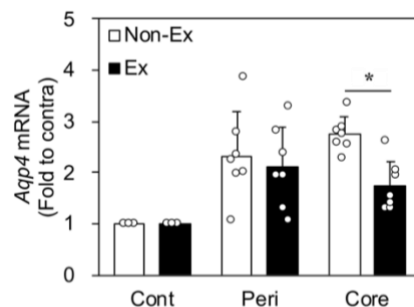


図 3. 脳組織内における Aqp4 mRNA の発現量に及ぼすトレッドミル運動の影響

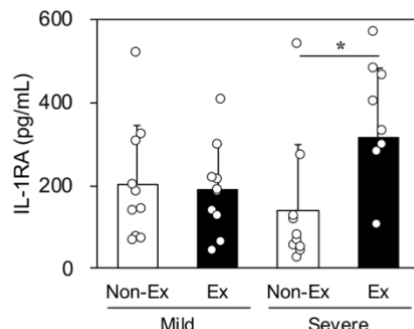


図 4. 血中 IL-1RA 濃度に及ぼすトレッドミル運動の影響

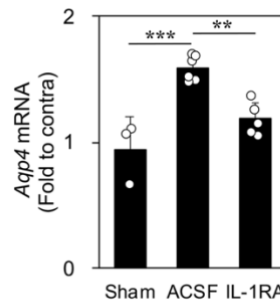


図 5. 脳梗塞モデルラットの梗塞巣における AQP4 発現量に及ぼす IL-1RA 投与の影響

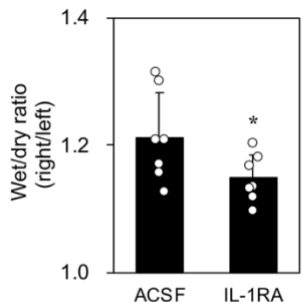


図 6. 脳梗塞モデルラットの脳浮腫に及ぼす IL-1RA 投与の影響

<引用文献>

- (1) Tian S, Zhang Y, Yang X, et al. Early exercise training improves ischemic outcome in rats by cerebral hemodynamics. *Brain Res* 2013; 1533: 114-121.
- (2) Gao Y, Zhao Y, Pan J, et al. Treadmill exercise promotes angiogenesis in the ischemic penumbra of rat brains through caveolin-1/VEGF signaling pathways. *Brain Res* 2014; 1585: 83-90.
- (3) Nishioka R, Sugimoto K, Aono H, et al. Treadmill exercise ameliorates ischemia-induced brain edema while suppressing Na⁺/H⁺ exchanger 1 expression. *Exp Neurol* 2016; 277: 150-161.
- (4) Murata Y, Sugimoto K, Yang C, et al. Activated microglia-derived macrophage-like cells exacerbate brain edema after ischemic stroke correlate with astrocytic expression of aquaporin-4 and interleukin-1 alpha release. *Neurochem Int* 2020; 140: 104848.

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 2件）

1. 著者名 Yukie Murata, Kana Sugimoto, Chihpin Yang, Kazuo Harada, Rina Gono, Teiji Harada, Yohei Miyashita, Kazuma Higashisaka, Ryuichi Katada, Hiroshi Matsumoto	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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Chihpin Yang, Kana Sugimoto, Yukie Murata, Yuichiro Hirata, Yu Kamakura, Yoshihisa Koyama, Yohei Miyashita, Kentaro Nakama, Kazuma Higashisaka, Kazuo Harada, Ryuichi Katada, Hiroshi Matsumoto	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
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kana Sugimoto, Rina Gono, Chihpin Yang, Yukie Murata, Yohei Miyashita, Kazuo Harada, Ryuichi Katada, Hiroshi Matsumoto
2. 発表標題 Molecular mechanism of reduction of cerebral edema by treadmill exercise after cerebral infarction
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉本香奈, 郷野里奈, 村田幸咲, 楊志斌, 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

1. 発表者名 杉本香奈, 村田幸咲, 郷野里奈, 楊志斌, 原田和生, 原田悌志, 宮下洋平, 東阪和馬, 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63回日本脳循環代謝学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 郷野里奈, 杉本香奈, 村田幸咲, 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105次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Rina Gono, Kana Sugimoto, Yukie Murata, Chihping Yang, Teiji Harada, Yohei Miyashita, Kazuma Higashisaka, Kazuo Harada, Ryuichi Katada, Hiroshi Matsumoto
2. 発表標題 The role of transglutaminase 2 in the ischemic stroke model rats
3. 学会等名 第105次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Chihpin Yang, Kana Sugimoto, Yukie Murata, Rina Gono, Yuichiro Hirata, Yohei Miyashita, Kentaro Nakama, Kazuma Higashisaka, Kazuo Harada, Ryuichi Katada, Hiroshi Matsumoto
2. 発表標題 Molecular mechanisms of Wischnewski spot development on gastric mucosa in fatal hypothermia: an experimental study in rats
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 Yukie Murata, Kana Sugimoto, Chihpin Yang, Rina Gono, Teiji Harada, Yohei Miyashita, Kazuma Higashisaka, Kazuo Harada, Ryuichi Katada, Junya Tanaka, Hiroshi Matsumoto
2. 発表標題 Role of activated microglia/macrophages in brain edema formation after brain infarction
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 Kana Sugimoto, Chihpin Yang, Yukie Murata, Rina Gono, Yuichiro Hirata, Teiji Harada, Yohei Miyashita, Kazuma Higashisaka, Kazuo Harada, Ryuichi Katada, Hiroshi Matsumoto
2. 発表標題 The spatial and time-dependent changes of various miRNAs expression in the ischemic rat brain
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/macrophagesの役割
3. 学会等名 第66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 村田幸咲, 杉本香奈, 楊志斌, 片田竜一, 松本博志
2. 発表標題 Role of microglia on astrocytes aquapoin-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

〔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	原田 和生 (Harada Kazuo) (50397741)	大阪大学・医学系研究科・特任准教授(常勤) (14401)	

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