

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09534

研究課題名（和文）脳動脈血行再建術後過灌流による認知機能障害の分子生物学的メカニズムの解明

研究課題名（英文）Molecular biological mechanism of cognitive impairment due to cerebral hyperperfusion after reconstructive surgery

研究代表者

千田 光平（Chida, Kohei）

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：30611016

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）：本研究では、既存の手法に改良を加えることで、最適な慢性脳虚血後の過灌流モデルを作成することができた。慢性脳虚血の程度を微調整することができ、過灌流を起こす際にも、容易に狭窄を解除することができる画期的なモデルである。この手法を用いて、過灌流導入後のラットの脳機能障害を評価し、血液脳関門の破綻や脳実質のダメージを分析し、そのメカニズムを明らかにする予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、既存の手法に改良を加えることで、最適な慢性脳虚血後の過灌流モデルを作成することができた。さらにこのモデルを用いることで、慢性脳虚血後の過灌流により認知機能障害が生じるメカニズムを解明することができる。このメカニズムが解明されることで、本研究が脳血行再建術後過灌流に対する新たな治療法の開発に貢献すると考える。

研究成果の概要（英文）：An optimal rat model representing cerebral hyperperfusion after chronic cerebral ischemia was developed by modifying previous methods. With this ingenious method, severity of chronic cerebral ischemia can be finely controlled, and the intentional arterial stenosis for inducing cerebral hyperperfusion can be easily recovered. We should assess cognitive impairment after cerebral hyperperfusion with this method, analyze the damage of the blood brain barrier and the cerebral parenchyma and then elucidate the mechanism of the cognitive impairment.

研究分野：脳循環代謝

キーワード：脳血行再建術後過灌流 認知機能障害

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

頸部内頸動脈狭窄症に対する頸動脈内膜剥離術 (CEA) は NASCET 研究をはじめとする大規模臨床試験により、その脳梗塞予防の有効性が確立されている。この CEA 後におこる過灌流は、脳代謝に合致しない異常な脳血流増加状態であり、頭痛、けいれん、局所神経脱落症状から、脳浮腫・脳出血といった重篤な合併症を引き起こすことが知られている¹⁾。また、頸部頸動脈狭窄症に対する頸動脈ステント留置術 (CAS) やもやもや病に対する直接血行再建術後にも、この過灌流が発生することが知られており^{2),3)}、この術後過灌流は無症候性であっても、多少なりとも脳組織にダメージを与え、認知機能障害を呈することも報告されている⁴⁾。一方で、その詳細なメカニズムは解明されていない。過灌流の治療としては、降圧・鎮静管理に加え、抗酸化剤であるエダラボンによる再灌流障害の緩和、ミノサイクリン塩酸塩による過灌流病態、頭蓋内出血の予防が報告されている^{5),6)}。しかし、これらの治療を行っても、血行再建術後過灌流による認知機能障害を完全に予防することはできない。

近年、慢性脳虚血のラットに対し過灌流を導入する方法が報告された⁷⁾。CEA 後過灌流の背景には、慢性脳虚血に伴う脳血管の自動調節能の破綻があることから、この手法は CEA 後過灌流の病態をより反映すると考えられる。分子生物学分野において、生物のもつ代謝産物を解析するメタボローム解析が盛んに行われており、遺伝子の発現やタンパク質の解析では解明できなかった細胞生理を明らかにしてきた⁸⁾。血液脳関門の細胞モデルを用いて、炎症反応後のバリア機能や細胞毒性に関してメタボローム解析を行い、特定のアミノ酸を中心とした代謝産物の発現を証明した報告もある^{9),10)}。我々は、このラットモデルにメタボローム解析を応用し、過灌流が血液脳関門や脳組織に及ぼすダメージのメカニズムを分子生物学的に解明する。

2. 研究の目的

本研究では、慢性脳虚血状態のラットに過灌流を導入し、過灌流のないラットに比べて、血液脳関門の破綻や脳実質のダメージと認知機能障害の関連を明らかにする。血液脳関門の破綻に関しては、Junction Protein (Claudin-5, Occludin, ZO-1, VE-Cadherin 等) やシグナル伝達路タンパク (RhoA, PKC, MAPK 等) のリン酸化の評価に加え、メタボローム解析を行い、その分子生物学的なメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

・ラットを用いた慢性脳虚血後の過灌流モデルの作成

1. 300g前後のウィスターラット100匹にY字型迷路試験、モーリス水迷路試験および8方向放射状迷路等の認知機能検査を行う。
2. 全身麻酔下に両側総頸動脈を結紮する (BCAO) する。
3. 4週間経過を観察し、この時点で再度前述の認知機能検査を行い、BCAOによる認知機能の障害を評価する。
4. 全身麻酔下に右頭頂部の頭蓋骨に2mmのburr holeを作成し、持続的にドップラー血流計で脳表の脳血流量を測定する。右総頸動脈を露出し、過灌流導入予定の50匹に対して右総頸動脈の結紮を解除する (過灌流を導入しない50匹は露出のみ)。さらに尾静脈を確保し、脳血流量が結紮解除前の2倍になるようにエフェドリンで昇圧し手術を終了する。

・標本の作成

1. 2週間後認知機能の評価を行い、Evans Blueを灌流後、ラットをホルマリンにて灌流固定し、脳を摘出する。

・データの解析

1. 大脳の標本において、Evans Blueの濃度にて血液脳関門の透過性を評価し、Hematoxylin & Eosin (HE) 染色にて脳実質の損傷範囲を評価する。またCaspase3/5、TNF α 、Akt、NF κ B等の特殊免疫染色を適宜追加して両群間の脳実質損傷におけるメカニズムの相違を評価する。

4. 研究成果

【2019年度】

2019年度は病院の移転に伴い動物実験を開始することができなかつたため、本研究のために購入したPC機器および統計ソフトを用いて、本研究と関連するMRIイメージングの研究を行い、「Identification of the distal end of carotid plaque using three-dimensional fast spin echo T1-weighted magnetic resonance plaque imaging」というタイトルで英文雑誌である「Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases」に投稿し受理され、4月号に掲載され、同研究を第6回日本心血管脳卒中学会学術集会で発表した。本学で動物実験を行うために必須である学内の講習会にも参加し、認定を取得した上で、学内の獣医師とも研究内容や実験方法について確認を行った。

【2020年度】

2020年度は、手術室および実験室の環境整備や情報収集を行った。前年度に病院が移転したが、梱包された大量の備品の整備ができていなかったため、実験室内の環境整備を行い、本研究で計画している免疫染色やPCRといった実験が可能となった。本研究で最も重要な計測機器であるレーザー血流計(OMEGA FLOW FLO-C1)を購入し、その使用方法を習得することができた。本年度実験のシミュレーションを行ったことで、実験開始後に不足となる機器や物品を抽出することができた。

【2021年度】

最終年度は、実験で得られた標本や実験結果の画像処理を行うべく大型モニターを購入し、過灌流モデル作成のための手術に必要なスタンドライトや体温維持装置も購入した。さらに小動物用の凝固止血機器や骨削除ドリルが必要となったため調達をした。これにより実際に実験を開始することができ、標本固定に用いる灌流ポンプも必要となったため追加購入した。過去の報告⁷⁾にしたがって両側総頸動脈を結紮することで、慢性脳虚血モデルを作成しようとしたが、実際に脳血流をレーザー血流計で測定したところ、50%程度脳血流が低下し、多くのラットに広範な脳梗塞が生じた(図1)。両側総頸動脈の結紮では、急性脳虚血に陥ってしまうことが判明したが、本研究を遂行中に新たな慢性脳虚血後の過灌流モデルの論文が発表された。一側の総頸動脈は結紮し、もう一側の総頸動脈は29ゲージの注射針とともに結紮し注射針を抜去し、頸動脈狭窄を作成する方法である¹¹⁾。この方法に切り替え、慢性虚血モデルの作成を行ったが、針を抜去した際の際間が大きいため、脳血流は結紮前と比べて低下しなかった。針の太さを、より細い30ゲージに変更したが、やはり

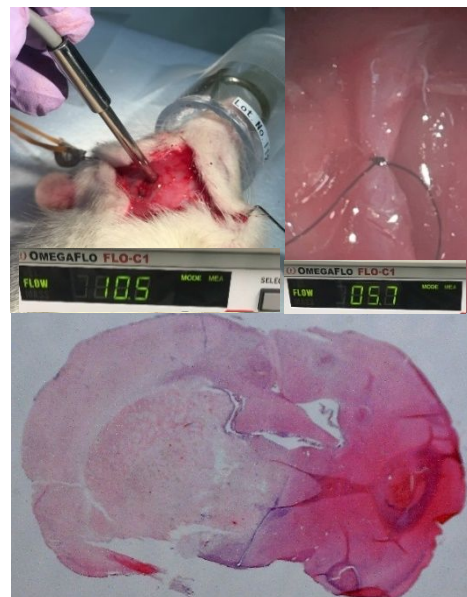


図1 両側総頸動脈を結紮したラットの脳表で脳血流を測定すると脳血流は著明に低下し、広範な脳梗塞を生じている。

脳血流の低下は認めなかった（図2）。そこで我々は、一側の総頸動脈は結紮し、もう一側の総頸動脈はナイロン糸とともに結紮し、その糸を抜去する独自の頸動脈狭窄作成法を開発した（図2）。とともに結紮する糸の太さや本数を調節することで狭窄率や脳血流低下を微調整することができ、糸を抜去することで安全に狭窄を解除できる画期的な方法である。さらに、手術の際に、内頸動脈の分枝である pterygopalatine artery や外頸動脈も露出し、これらも結紮することで、安定した慢性脳虚血モデルを作成することができた。この手法で得られた脳の標本では、脳梗塞を認めなかったため、慢性脳虚血のモデルとしては相応しいと考える（図2）。この手法で作成した慢性脳虚血モデルのラットの狭窄側の結紮を2週間後に解除することで、脳血流は結紮前よりも50%程度上昇し、過灌流が認められた。今後、狭窄を解除するまでの期間を1～4週間で行い、脳梗塞が生じずに過灌流が得られる最適な時期を検証する。これにより、当初予定していた慢性脳虚血後の過灌流モデルが完成となる。モリス水迷路および8方向放射状迷路は、実験室に備えられているため、今後事前に高次脳機能を評価した上で同モデルを作成し、過灌流がおよぼす血液脳関門の破綻や脳実質のダメージと認知機能障害の関連を明らかにする予定である。



図2 総頸動脈を注射針やナイロン糸とともに結紮している。得られた標本では脳梗塞を認めない。

<引用文献>

- 1) Ogasawara K, Sakai N, Kuroiwa T, et al. Intracranial hemorrhage associated with cerebral hyperperfusion syndrome following carotid endarterectomy and carotid artery stenting: retrospective review of 4494 patients. *J Neurosurg* 107: 1130-6, 2007
- 2) Buczek J, Karliński M, Kobayashi A, et al. Hyperperfusion syndrome after carotid endarterectomy and carotid stenting. *Cerebrovasc Dis* 35:531-7, 2013
- 3) Fujimura M, Niizuma K, Endo H, et al. Quantitative analysis of early postoperative cerebral blood flow contributes to the prediction and diagnosis of cerebral hyperperfusion syndrome after revascularization surgery for moyamoya disease. *Neurol Res* 37:131-8, 2015
- 4) Chida K, Ogasawara K, Suga Y, et al. Postoperative cortical neural loss associated with cerebral hyperperfusion and cognitive impairment after carotid endarterectomy: 123I-iomazenil SPECT study. *Stroke* 40:448-53, 2009
- 5) Ogasawara K, Inoue T, Kobayashi M, et al. Pretreatment with the free radical scavenger edaravone prevents cerebral hyperperfusion after carotid endarterectomy. *Neurosurgery* 55:1060-7, 2004
- 6) Fujimura M, Niizuma K, Inoue T, et al. Minocycline prevents focal neurological deterioration due to cerebral hyperperfusion after extracranial-intracranial bypass for moyamoya disease. *Neurosurgery* 74:163-70, 2014
- 7) Jia B, Zhao L, Xiao W, et al. A new rodent model of cerebral hyperperfusion. *Int J Clin Exp Med* 15:17441-50, 2015

- 8) Zamboni N, Saghatelian A, Patti GJ. Defining the metabolome: size, flux, and regulation. *Mol Cell* 21:699-706, 2015
- 9) Schultz L, Zurich MG, Culot M, et al. Evaluation of drug-induced neurotoxicity based on metabolomics, proteomics and electrical activity measurements in complementary CNS in vitro models. *Toxicol In Vitro* 25:138-65, 2015
- 10) Brown JA, Codreanu SG, Shi M, et al. Metabolic consequences of inflammatory disruption of the blood-brain barrier in an organ-on-chip model of the human neurovascular unit. *J Neuroinflammation* 12:306, 2016
- 11) Mansour A, Rashad S, Niizuma K, et al. A novel model of cerebral hyperperfusion with blood-brain barrier breakdown, white matter injury, and cognitive dysfunction. *J Neurosurg* 18:1-13, 2019

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Sato Shinpei, Fujiwara Shunrou, Miyoshi Kenya, Chida Kohei, Kobayashi Masakazu, Kubo Yoshitaka, Yoshida Kenji, Terasaki Kazunori, Ogasawara Kuniaki	4. 巻 41
2. 論文標題 Improvement in gait function after carotid endarterectomy is associated with postoperative recovery in perfusion and neurotransmitter receptor function in the motor-related cerebral cortex: a 123I-iodoamphetamine SPECT study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nuclear Medicine Communications	6. 最初と最後の頁 1161～1168
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MNM.0000000000001275	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 Kohei Chida, Yasuyoshi Shimada, Kentaro Fujimoto, Jun Yoshida, Daigo Kojima, Shunrou Fujiwara, Masakazu Kobayashi, Kenji Yoshida, Makoto Sasaki, and Kuniaki Ogasawara	4. 巻 29
2. 論文標題 Identification of the distal end of carotid plaque using three-dimensional fast spin echo T1-weighted magnetic resonance plaque imaging	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases	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） 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2020.104680	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 Chiba Takayuki, Fujiwara Shunrou, Oura Kazumasa, Oikawa Kohki, Chida Kohei, Kobayashi Masakazu, Yoshida Kenji, Kubo Yoshitaka, Maeda Tetsuya, Itabashi Ryo, Ogasawara Kuniaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Superb Microvascular Imaging Ultrasound for Cervical Carotid Artery Stenosis for Prediction of the Development of Microembolic Signals on Transcranial Doppler during Carotid Exposure in Endarterectomy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cerebrovascular Diseases Extra	6. 最初と最後の頁 61～68
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000516426	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 Kobayashi Masakazu, Igarashi Suguru, Takahashi Tatsuhiko, Fujiwara Shunrou, Chida Kohei, Terasaki Kazunori, Kubo Yoshitaka, Ogasawara Kuniaki	4. 巻 15
2. 論文標題 Optimal timing for measuring cerebral blood flow after acetazolamide administration to detect preexisting cerebral hemodynamics and metabolism in patients with bilateral major cerebral artery steno-occlusive diseases: 15 0 positron emission tomography studies	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging	6. 最初と最後の頁 507-518
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6件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 千田光平、島田泰良、藤本健太郎、吉田純、小島大吾、藤原俊朗、小林正和、吉田研二、佐々木真理、小笠原邦昭
2. 発表標題 MR Plaque Imagingによる頸動脈内膜剥離術前のプラーク遠位端の同定
3. 学会等名 第45回日本脳卒中学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 千田光平、千葉貴之、攝田典吾、大井清貴、津田圭介、土井尻遼介、木村尚人、小林正和、板橋亮、小笠原邦昭
2. 発表標題 腎機能障害患者に対しエコーガイド下 頸動脈ステント留置術が有用であった2例
3. 学会等名 第42回日本脳神経血管内治療学会東北地方会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 千田光平、千葉貴之、攝田典吾、赤松洋祐、木村尚人、久保慶高、小笠原邦昭
2. 発表標題 段階的塞栓術が有用であった出血発症multi-hole pial AVFの1例
3. 学会等名 第43回日本脳神経血管内治療学会東北地方会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 千田光平、島田泰良、藤本健太郎、吉田純、小島大吾、藤原俊朗、小林正和、吉田研二、佐々木真理、小笠原邦昭
2. 発表標題 MR Plaque Imagingによる頸動脈内膜剝離術前のプラーク遠位端の同定
3. 学会等名 第6回日本心血管脳卒中学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 千田光平
2. 発表標題 エキスパートから学ぶSPECT検査活用法 - 脳血管障害
3. 学会等名 第35回ブレイン・ファンクション・イメージング・カンファレンス（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 千田光平
2. 発表標題 成人虚血発症もやもや病における直接血行再建術後認知機能変化のメカニズム
3. 学会等名 第39回 The Mt. Fuji Workshop on CVD
4. 発表年 2021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	吉田 研二 (Yoshida Kenji) (10316367)	岩手医科大学・医学部・特任准教授 (31201)	

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