

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10298

研究課題名(和文) 一過性局所脳虚血/再灌流モデルを用いた遠隔虚血コンディショニングの効果

研究課題名(英文) Effect of remote ischemic preconditioning on central nervous system regeneration

研究代表者

百田 義弘 (Momota, Yoshihiro)

大阪歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：60247880

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)：非致死的な遠隔虚血負荷操作が、中枢神経再生機転に与える影響を検討した。実験はCB17マウスをFA群：両側大腿動脈、MCA群：左側中大脳動脈、CA群：左側頸動脈の3グループに分け虚血再灌流操作を行った。免疫組織化学染色法により神経幹細胞の発現様式を解析した。その結果、遠隔虚血負荷によって海馬歯状回の内因性神経幹細胞の誘導が活性化する可能性が示唆された。また、組織の修復に關与する反応性アストロサイトの存在が示唆され、虚血耐性の獲得に神経幹細胞、アストログリアが神経再生機転に大きく關与することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

不可逆的致死的脳虚血が生じる前に非致死性的虚血負荷が加わることで、虚血傷害部位のみならず海馬歯状回においても神経再生能の亢進が示された。さらに、非致死性的虚血負荷が責任動脈以外の血管においても神経再生機転の亢進に關与することが明らかとなった。以上の結果から、非致死性的虚血負荷があらかじめ加わることにより致死的虚血に対し脳保護作用を獲得することが示され術後のリハビリテーションにも大きく寄与する可能性があり社会的意義は大きいものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We examined the effect of non-lethal remote ischemic preconditioning (RIPC) on central nervous system regeneration. CB 17 mice were divided into 3 treatment groups. The femoral artery (FA) group, the middle cerebral artery (MCA) group, and the carotid artery (CA) group had temporary occlusion and reperfusion. Following the treatment, the expression of neural stem cells was examined by immunohistochemistry. These findings suggest that RIPC induces endogenous neural stem cells in the hippocampal dentate gyrus. Double staining (nestin and GFAP) further suggested the presence of astrocytes that are reactive to tissue damage. Thus, neural stem cells may be involved in regulating resistance to ischemia, and astrocytes may be involved in regeneration of the nervous system.

研究分野：歯科麻酔学

キーワード：一過性局所脳虚血 神経幹細胞 虚血耐性 海馬歯状回

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

虚血耐性現象は、あらかじめ非致死的な軽度の虚血負荷を与えておくことで、後に加わる致死的な虚血侵襲に対して抵抗性を獲得し、標的臓器の傷害が軽減される現象である。虚血耐性の獲得に関しては、初めに心筋で ischemic preconditioning 効果が観察され、その後も肺、肝臓、腎臓、脳といった多数の臓器で虚血耐性現象が報告されている。スナネズミやマウスを用いて、あらかじめ両側総頸動脈、中大脳動脈への非致死性虚血負荷再灌流後に致死性虚血負荷を加えた場合、海馬をはじめ大脳皮質領域において神経幹細胞による虚血への抵抗性獲得や梗塞巣の縮小が確認されている。

脳虚血耐性能の獲得に関しては低酸素ストレス、酸化ストレス、グルタミン酸ストレスからなる虚血ストレスがトリガーとなることで、転写因子の活性化とそれに続く遺伝子発現の誘導が指摘されており、耐性獲得時の熱ショックタンパク発現、CREB 活性化、アポトーシス抑制遺伝子 Bcl-2 などの相互反応や側副血行路の発達が関与するという報告はあるが、虚血耐性現象の獲得について神経再生の観点から観察した報告はなく、この点について解析することが重要であると考えた。

2. 研究の目的

本研究では責任血管である中大脳動脈のほかに両側大腿動脈、片側頸動脈に非致死性遠隔虚血負荷を加え再灌流後に海馬領域を中心としたニューロン、グリア、神経幹細胞の発現を詳細に観察することで中枢神経再生機転について検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 実験動物：雄性 CB17 系統マウス(6-10 週令)を用いた。実験は大阪歯科大学動物実験ガイドラインを遵守して行い、動物の疼痛と使用数を最小限に抑えるよう努め、解析期間中は自由に食餌摂取させ拘束は与えなかった。

(2) 方法：すべての実験はセボフルラン吸入下で行った。体温をモニタリングしながらヒートランプを用いて 37.0 ± 0.2 に保ち実験を行った。

FA 群：両側の大腿動脈を露出させ、血管クリップを用いて 10 分間血流遮断を行った後、クリップを解放し 5 分間の再灌流を行った。MCA 群：頭蓋骨を一部削除し左側の中大脳動脈を露出させ、7.0 ナイロン糸を用い反時計回転させることで 5 分間血流遮断した後、元に戻し 5 分間再灌流させる。CA 群：左側の総頸動脈を露出させ、血管クリップを用いて 5 分間血流遮断を行った後、クリップを解放して 5 分間の再灌流を行う。

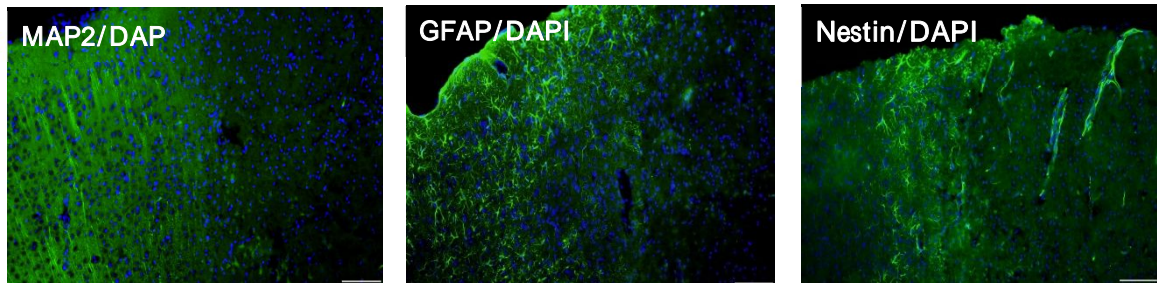
いずれの群においても上記の操作を 3 サイクル繰り返し行った。

(3) 評価法：再灌流 3 日後、7 日後、14 日後にホルムアルデヒド固定液を用いて還流固定後、脳を摘出した。固定液に一晩浸漬させた後、30%スクロース液に 3 日間浸漬した。続いて -80 で凍結し、クライオスタットを用いて $16 \mu\text{m}$ でスライスし、凍結切片を作製した。免疫組織染色には nestin、glial fibrillary acidic protein (GFAP)、microtubule-associated protein2 (MAP2) に対する抗体を用いた。二次抗体は Alexa Fluor 488 または 555 を用いた。細胞核の染色には 4' 6-diamidino-2' -phenylindole (DAPI) を使用した。観察は蛍光顕微鏡を用いて行った。

4. 研究成果

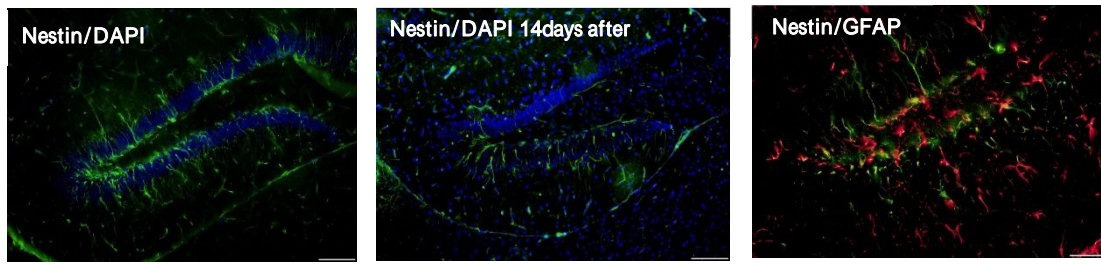
(1) 中大脳動脈の非致死性虚血負荷再灌流後の梗塞発現 (図 1)

MCA 群において、大脳皮質梗塞巣内の MAP2 陽性ニューロンは脱落し、GFAP 陽性アストロサイトはペナンプラ領域に多く発現した。梗塞巣内の微小血管周囲において nestin 陽性神経幹細胞の発現がみられた。



(2) 海馬歯状回における nestin 陽性細胞の発現 (図2)

FA 群および CA 群において、海馬歯状回では nestin 陽性細胞の発現亢進がみられ、特に顆粒層で著明に観察された。nestin 陽性細胞は再灌流 14 日後まで確認された。さらに、再灌流 3 日後の海馬顆粒層において nestin + GFAP 陽性反応性アストロサイトが観察された。



以上の結果より、致死性虚血の責任血管および遠隔臓器の血流遮断により非致死性虚血負荷を加えることで、海馬歯状回を中心に内在性神経幹細胞の発現が観察された。虚血耐性の獲得に神経幹細胞、反応性アストロサイトによる神経再生機転が大きく関与することが示唆された。

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 A Hasegawa, T Matsuyama, Y Momota	4. 巻 55
2. 論文標題 Effects of remote ischemic preconditioning on cerebral nervous system regeneration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Osaka Dental University	6. 最初と最後の頁 35-40
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 -

1. 著者名 N Miyatani, Y Momota, M Maeda, T Nakagomi, T Matsuyama	4. 巻 54
2. 論文標題 Brain pericytes are a major source of lipocalin-type prostaglandin D2 synthase in the cerebral cortex after ischemic stroke	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Osaka Dental University	6. 最初と最後の頁 91-99
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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長谷川絳里、松本英詔、三谷早希、吉田啓太、百田義弘
2. 発表標題 遠隔虚血操作が中枢神経再生能に及ぼす影響
3. 学会等名 第48回日本歯科麻酔学会学術集会
4. 発表年 2020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	中込 隆之 (Nakagomi Takayuki) (80434950)	兵庫医科大学・医学部・教授 (34519)	

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