

令和 2 年 5 月 19 日現在

機関番号：17701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2019

課題番号：19K24315

研究課題名(和文) 遠隔虚血プレコンディショニングと運動療法の併用による神経保護効果獲得に関する研究

研究課題名(英文) Study on induced of neuroprotective effects by combined use of remote ischemic preconditioning and preconditioning exercise.

研究代表者

大塚 章太郎(Otsuka, Shotaro)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任助教

研究者番号：80849901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,100,000円

研究成果の概要(和文)：遠隔虚血プレコンディショニング(RIPC)を7日間連続でラットに行い、介入後に脳梗塞を作成して、脳梗塞に対する神経保護効果や運動感覚機能障害軽減がみられるかを調べた。RIPC群は、No-RIPC群に比べて有意に脳梗塞体積の縮小が見られており、運動感覚機能障害も軽減していた。RIPCを行うことにより脳梗塞発症後に14-3-3の発現量増加した。神経細胞死に深く関与しているBaxやcaspase 3の発現量は、RIPC群で有意に減少していた。これらの結果より、脳梗塞発症前に7日間連続でRIPCを行うことにより、神経保護効果が獲得され脳梗塞体積縮小や運動感覚機能障害を軽減させる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳梗塞は、寝たきりになる可能性が高い疾患であるが、治療には限界があり、予防法は確立されていない。薬物療法の開発も難渋している。そこで、今回、脳梗塞の新規予防法として注目されている遠隔虚血プレコンディショニング(RIPC)の介入方法を確立するために実験動物を使用した研究を行った。脳梗塞発症前に7日間連続でRIPCを行うことにより、神経保護効果が獲得され脳梗塞体積縮小や運動感覚機能障害を軽減させる可能性が示唆された。RIPCによる介入は、非観血的かつ簡便であり、脳梗塞予防に寄与しうる可能性がある。

研究成果の概要(英文)： We investigated the neuroprotective effects of remote ischemic preconditioning (RIPC) was performed on rats for 7 consecutive days after brain ischemia. In the RIPC group, the infarct volume and sensorimotor dysfunction was significantly reduced compared with the No-RIPC group. An increase in the expression level of 14-3-3 was confirmed after brain ischemia by performing RIPC. The expression levels of Bax, which is a pro-apoptotic factor deeply involved in neuronal cell death, and caspase 3, which is a final determinant of apoptosis, were significantly decreased in the RIPC group compared to in the No-RIPC group after brain ischemia. Our findings suggest, that RIPC for 7 consecutive days induced neuroprotective and reduced the infarct volume and sensorimotor dysfunction.

研究分野：リハビリテーション科学

キーワード：遠隔虚血プレコンディショニング 神経保護効果 理学療法 予防運動

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本は超高齢社会を迎え、寝たきりになる疾患の 4 割を占めている脳血管障害の発症率が増加し、その中でも脳梗塞が 6 割を占めている。その治療や予防は社会的、医学的にも重要な問題である。脳梗塞発症後の治療法は、血栓溶解療法（以下、t-PA 療法）と脳保護薬の併用が主であるが、t-PA 療法は治療可能時間域があり、2-6%の患者しか治療の恩恵を受けることができない。このように、脳梗塞の治療には限界がある。また、脳卒中生存者はその後の生活で脳血管鬱や認知機能低下を生じることがよく知られている。脳血管障害を予防することや脳卒中生存者の鬱や認知機能低下を予防することはリハビリテーション医学にとって大変重要な課題である。

神経保護効果の獲得には、多くの要因が複雑に関係しており、薬剤の開発が難渋している現状がある。脳梗塞予防の一つとして、preconditioning と呼ばれる方法があり、心臓や脳に対して致死的とならないストレス(軽い虚血など)を負荷させると、その後の強いストレス(虚血、酸化ストレスなど)による細胞障害が軽減される。脳梗塞に対しても脳虚血耐性を誘導し、強力な神経保護効果を獲得されると報告されている。しかし、観血的処置を必要としており、臨床応用には難しいのが現状である。そこで、研究代表者はこれまで予防 (preconditioning) 運動による神経保護効果に着目し、脳梗塞モデル動物を用いて検討を行い、3 週間の継続的な preconditioning 運動により、脳梗塞発症後、脳梗塞体積の縮小効果や運動・感覚機能改善を示し、そのメカニズムに神経栄養因子の発現増加、血管新生、酸化障害の抑制、神経細胞死抑制が関与していることを報告した。近年、臨床で実行可能な別の方法として遠隔虚血プレコンディショニング (RIPC) が注目されている。これは、末梢血管を短時間遮断し虚血状態を生み出すことで神経保護効果を獲得する方法である。RIPC による遠位器官における虚血および再灌流の短い繰り返し期間は、別の重要な臓器への保護効果を持つことは十分に認識されており、心疾患に対する RIPC の効果についての報告が多くみられる。しかし、中枢神経障害に対する脳神経保護効果についての報告は少なく、さらに、運動療法との併用効果を検討している研究は見られない。また、そのメカニズムに関しては未だ完全には明らかになっていない。脳血管障害生存者の認知機能低下に効果が期待出来ることも報告されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、リハビリテーションの視点から脳血管障害に対する新規の予防的介入方法の確立とそのメカニズムを明らかにすることにある。RIPC の効果的な介入強度、頻度、回数などもよく分かっていない。そのため、リハビリテーション医療へ応用するためには保護メカニズムの解明や効果的な介入条件の検討が緊急の課題である。RIPC による神経保護効果の獲得と内在性保護因子に与える影響について検討を行う。

3. 研究の方法

Sprague-Dawley (SD) 系雄性ラット 8 匹を使用して、無作為に 4 匹ずつ RIPC 群と No-RIPC 群に分けて検討を行った。RIPC は、無麻酔下で尾に血圧測定用のカフを巻き 180mmHg ~ 200mmHg の圧で駆血 5 分、開放 10 分を 1 セットとして 3 回繰り返した。RIPC 群は、7 日間の介入を行い、その間 No-RIPC 群は自由飼育とした。介入終了後、小泉の方法に準じてラット左内頸動脈から塞栓子を挿入し、60 分間の虚血と再灌流により中大脳動脈領域の脳梗塞モデルを作成した。脳梗塞作成 2 日後に、神経学的評価として Neurological Score (NS)、運動感覚機能評価として、歩行時のバランス能力を評価する Beam Walking test (Bwt)、バランス能力と耐久性を見る Rotarod (RR) テスト、前肢の感覚運動機能を評価する Sticky tape test を行った。評価終了後に屠殺を行った。脳組織を採取して、2mm 間隔の前額断を作成し、TTC 染色を行い脳梗塞体積の測定を行った (図 1. A)。

4. 研究成果

脳梗塞発症前に 7 日間連続で RIPC を行うことにより脳梗塞発症後に No-RIPC 群と比べて脳梗塞体積の有意な縮小がみられた(図 1. B)。

さらに、運動感覚機能障害の有意な軽減も認められた (図 2. B)。しかし、Neurological Score (NS)、Beam Walking test (Bwt)、Rotarod (RR) テストは、No-RIPC 群に比べて RIPC 群で軽減していたが、有意な差は見られなかった。

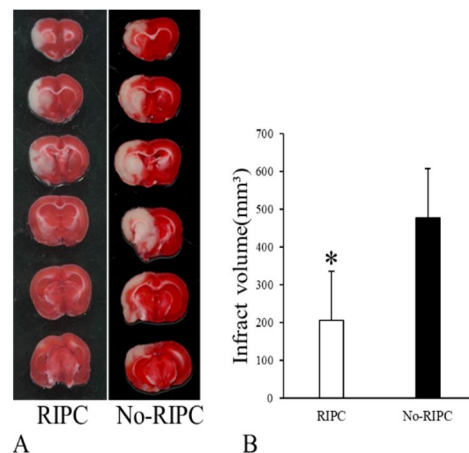


図 1. TTC 染色による脳梗塞画像 (A), 脳梗塞体積値 (B)

Mean ± SD *p<0.05

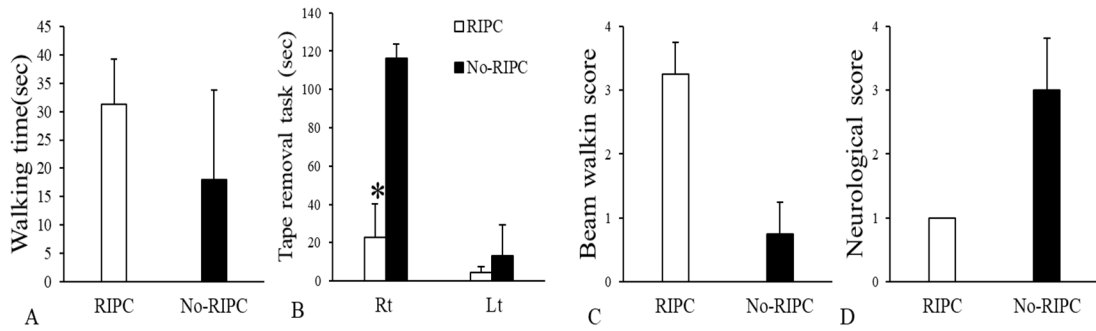


図 2. Rotarod (RR) テスト (A), Sticky tape test (B), Beam Walking test (C)、 Neurological Score (D) Mean \pm SD * $p < 0.05$

RIPC による脳梗塞体積の縮小効果が確認されたが、そのメカニズムとして内在性保護因子である 14-3-3 γ に着目した。RIPC を行うことによって脳梗塞発症後にペナンブラ（梗塞周囲巣領域）における 14-3-3 γ の発現量増加が確認された(図 3 A, B)。神経細胞死に深く関与しているアポトーシスの変化を確認した結果、アポトーシス促進因子である Bax やアポトーシス最終決定因子である caspase 3 の発現量は、RIPC 群で有意に減少していた(図 3A, C, D)。このことより、脳梗塞発症前に 7 日間連続で RIPC を行うことにより、脳梗塞発症後、脳梗塞体積を縮小し、神経障害や運動感覚機能障害を軽減させる可能性が示唆された。しかし、今回の研究で使用した実験動物の数が少なく、実験動物数を増やして検討を行う必要がある。さらに、RIPC のメカニズムには不明な点が多く、更なる検討が必要である。

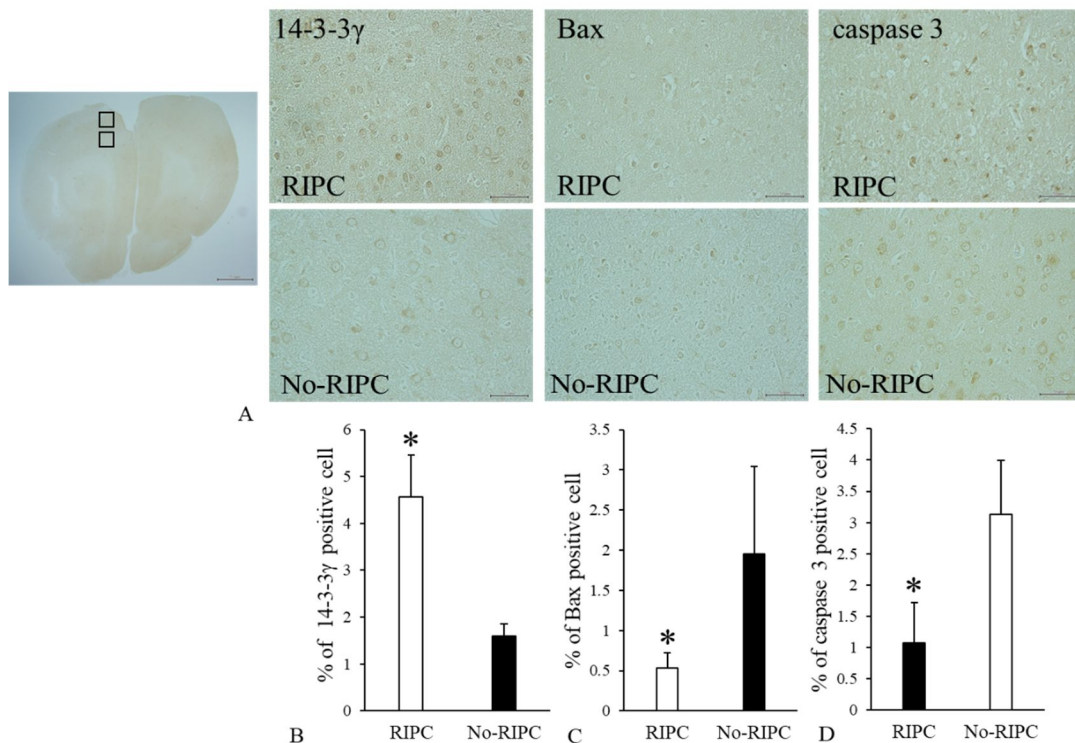


図 3. (A) 免疫染色画像で左から 14-3-3 γ , Bax, caspase 3, 脳梗塞周囲の で示した場所を撮影した。(B) 14-3-3 γ の発現量, (C) Bax の発現量, (D) caspase 3 の発現量をそれぞれ示した。Mean \pm SD * $p < 0.05$, (Scale bar:50 μ m)

今回の結果より、7 日間の連続した RIPC によって、内在性保護因子を介した神経保護効果が確認された。しかし、今回使用した実験動物は各群 4 匹ずつと n 数が少ないため今後、n 数を増やして RIPC の効果を実証し、メカニズムを明確にしていく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Takada S, Sakakima H, Matsuyama T, Otsuka S, Nakanishi K, Norimatsu K, Itashiki Y, Tani A, Kikuchi K.	4. 巻 17
2. 論文標題 Disruption of Midkine gene reduces traumatic brain injury through the modulation of neuroinflammation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neuroinflammation	6. 最初と最後の頁 1-12
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	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 0件）

1. 発表者名 大塚 章太郎, 谷 明, 板敷 裕喜, 則松 貢輔, 高田 聖也, 中西和毅, 丸山 征朗, 榎間 春利
2. 発表標題 Effects of detraining on neuroprotective effects due to preconditioning exercise-induced brain tolerance after ischemic stroke of rats
3. 学会等名 日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大塚章太郎
2. 発表標題 クモ膜下出血後の早期脳損傷に対する予防運動の効果
3. 学会等名 第18回コメディカル形態機能学会
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
---------------------------	-----------------------	----