

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591714

研究課題名(和文) 脳深部刺激療法の効果発現メカニズム－神経細胞新生の立場から

研究課題名(英文) Deep brain stimulation and neuronal reorganization

研究代表者

倉津 純一 (KURATSU JUN-ICHI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：20145296

研究成果の概要(和文)：脳深部刺激術(deep brain stimulation; DBS)の効果発現メカニズムについて、神経新生の関与について検討することを目的とした。動物実験により視床下核周辺で発現する転写因子 Pax6 が有用な神経新生マーカーとなり得る可能性を見出した。また、パーキンソン病症例の脳白質量と DBS 後の運動症状改善率との強い相関関係を明らかにし、運動回路の各コンポーネントを結ぶ軸索およびミエリンの量的保存が DBS の効果発現に重要であることを見出した。今後安定した DBS の動物モデルを確立し、DBS による神経新生マーカーの発現分布を検討する。

研究成果の概要(英文)：Mechanisms underlying clinical effect of deep brain stimulation (DBS) are still unclear; however, DBS may act through neuronal reorganization of the brain. By using animal model, we found that description factor Pax6 is expressed in the surrounding structure of subthalamic nucleus (STN) and may become a useful marker for neuronal regeneration subsequent to DBS. In human subjects with Parkinson's disease, effect of STN-DBS was significantly correlated to white matter volume, suggesting preserved connectivity between components of the basal ganglia-thalamocortical circuit may be required for the effectiveness of electrical stimulation. We continue to study to establish a stable animal model for STN-DBS to detect whether DBS substantially induces neuronal regeneration in the mammalian brain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：脳深部刺激術、神経細胞新生、マイクロアレイ、パーキンソン病、ジストニア、運動異常症

1. 研究開始当初の背景

(1)脳深部刺激術(deep brain stimulation; DBS)は、パーキンソン病、ジストニア、あるいは本態性振戦などの運動異常症や難治性

疼痛の外科的治療法として、今日では確立した地位を占めるに至った。しかしながら、その効果発現メカニズムに関する統一された見解はない。

(2)DBS によって大脳皮質-視床-基底核回路の各部位に c-Fos などの immediate early gene の発現が認められたとする報告があり、DBS が神経回路及び介在する神経細胞神経伝達物質の放出やシナプス効果に影響を及ぼし、遺伝子発現を介して神経回路そのものを再編成している可能性があると考えられる。

(3)我々のこれまでの研究（大脳基底核の組織形成に重要な拡散タンパクの研究、大脳皮質の形成を制御する遺伝子の研究）を応用することにより、DBS と遺伝子発現という異なるモダリティーを関連付け、DBS の効果発現メカニズムを解明できると考えた。

2. 研究の目的

(1) 視床下核 (subthalamic nucleus; STN)-DBS による大脳皮質-視床-基底核回路各部位における遺伝子発現変化について網羅的解析を行い、神経細胞新生と DBS 効果発現の関係について解明する。

(2) 神経細胞再生のマーカーとなり得る蛋白と遺伝子発現について検索する。

(3)DBS 臨床例における効果発現と神経機能・解剖学的特徴の関係について明らかにする。

3. 研究の方法

(1)STN-DBS 後の中樞神経系細胞における遺伝子発現変化の検討

①動物モデルの確立

小動物手術機器を用いて成体ラットの両側 STN に定位的にバイポーラ電極を挿入後、固定し、外部刺激装置による 12 時間/日以上 の刺激を 1 週間以上行う計画とした。

②遺伝子発現変化のスクリーニング

大脳皮質運動野及び感覚野、線条体、視床、大脳辺縁皮質、脳幹の各部位における mRNA の精製を行い、マイクロアレイにより刺激側と非刺激側の遺伝子発現プロフィールを比較する計画とした。

(2) 神経細胞再生のマーカーとなり得る蛋白と遺伝子発現についての検討

①成体 Wister/albino ラットに致死量の pentobarbital を腹腔内投与し、まず、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)、続いてリン酸緩衝 4% paraformaldehyde を心腔内投与し、灌流固定を行った。脳は、取り出され、4°C で一晚同じ固定液を用いて後固定され、パラフィン包埋され、そして 5µm に薄切された。

②上記組織切片に対して Pax6、Emx2、NeuroD、TuJ1、及び CR-50 の各抗体を用いた免疫染色を行った。

(3)パーキンソン病症例における STN-DBS の効果と神経機能・解剖学的特徴の解析
①パーキンソン病患者に対して STN-DBS を施行し、術後の改善率を算出する。

②定量的 3 次元脳画像をもとに、大脳各分画 (灰白質、白質、髄液) を定量し、STN-DBS 術後改善率との相関関係を検討する。

③¹²³I-metaiodoguanilylbenzidine (MIBG) を用いて、心筋のノルエピネフリン代謝の各パラメータを測定し、STN-DBS 術後改善率との相関関係を検討する。

4. 研究成果

(1)STN-DBS 動物モデル確立について

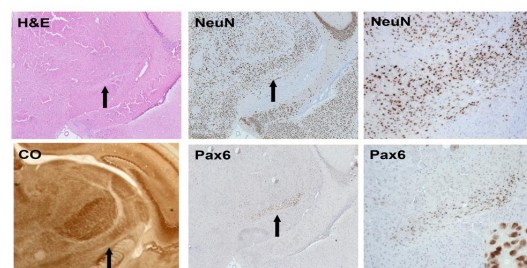
視床下核は神経細胞が密集している神経核ではあるが、ラットにおいて 1mm 程度の薄さしかない。動物用定位脳手術を用いて、この技術を確認しようとした。まず DBS 電極ではなく、ハミルトンシリンジを用いて色素 (エバンスブルー) 注入を行ったが、色素が STN に注入されることもあれば、外れることもあり、安定した手技を確立するに至っていない。効率的な DBS 電極挿入手技について現在検討しているところである。

(2) 神経細胞再生のマーカーとなり得る蛋白について

①Emx2、NeuroD、TuJ1 及び CR-50 の結果は、これまで報告されている発現パターンとほぼ同一のものであり、特に今回の実験系で標的核となる間脳の STN 近傍には明らかな発現を認めなかった。

②これに対して Pax6 は、STN に近い不確帯 (Zona incerta, ZI) で発現していることが明らかとなった。図①において ZI は H&E 染色および cytochrome oxidase (CO) 染色における矢印で示され、神経細胞が密集している STN の直上に位置している。免疫染色の弱拡大の矢印で示された部分を強拡大すると ZI において NeuN の発現はないが、Pax6 の発現が認められる。

図①



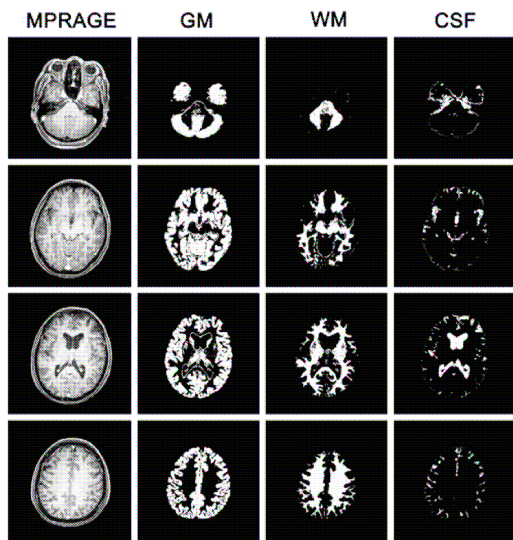
この結果は、Stoykova らが行った Pax gene family の遺伝子発現パターン (Stoykova and Gruss, 1994) の解析結果とよく一致している。成体まで発現している Pax6 の機能は不明であるが、ある特定の神経細胞の発生、分化、

さらには成体における細胞機能維持に関与する可能性がある (Stoykova and Gruss, 1994)。さらに Pax6 は、生後に神経細胞新生が存在する部位での広範な発現が知られており、発達期のみならず、成体脳においても神経幹細胞の増殖調節やその分化における重要な役割が示唆されている (Osumi et al., 2008)。以上のことから、Pax6 はラット STN-DBS の実験系に置いて、特に有用な神経新生のマーカーとして注目される。

(3) パーキンソン病患者に対する STN-DBS における効果と神経機能解剖学的特徴の関係について

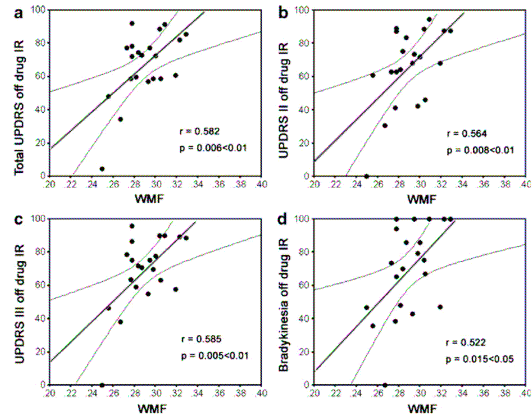
①MPRAGE 法による定量的 3 次元 MRI 画像を、SPM5 ソフトウェアを使用することにより、大脳各分画、すなわち灰白質(GM)、白質(WM)、および髄液(CSF) に分別し定量することが可能であった(図②)。

図② (発表論文⑤より転載)



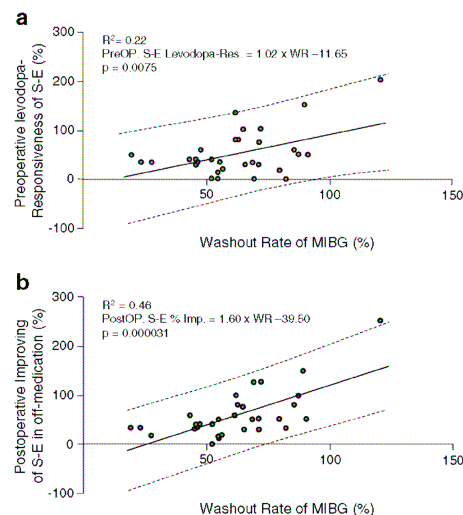
大脳各分画とパーキンソン症状術後改善率の関係を検討した結果、大脳白質量と DBS 後の運動症状改善率との強い相関関係が明らかとなった。図③は、パーキンソン病の評価スケールである Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS) の総計 (a), part II (b), part III (c), そして寡動(d) のスコアの術後改善率が、白質分画(WMF)と有意に相関していることを示すグラフである。

この所見は、運動回路の各コンポーネントを結ぶ軸索およびミエリンの量的保存が DBS の効果発現に重要であることを示唆するものである。



図③ (発表論文⑤より転載)

②¹²³I-MIBG 心筋シンチグラフィのパラメータとして、心臓 (heart)/ 縦隔 (mediastinum) 比 (H/M) の早期 (early phase; E) と遅延期 (delayed phase; D) および排出率 (washout rate; WR) を検討した結果、Schwab-England 日常生活動作 (ADL) scale (S-E) によって評価した術後 ADL 改善率と WR に有意な相関関係があることが明らかとなった (図④)。すなわち、図④-b に示す如く、WR と術後 S-E 改善率の相関は $p=0.000031$ と有意である。また図④-a に示す如く、WR は術前 S-E のレボドパ反応性とも有意 ($p=0.0075$) な関係を示す。これは心筋におけるノルアドレナリン代謝 (心筋交感神経終末におけるノルアドレナリン保持能力) が、大脳基底核特に線条体におけるドパミン保持能力と相関していることを示唆するものである。



図④ (発表論文④より転載)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計10件)

- ① Yamada K, Sakurama T, Soyama N, Kuratsu J, GPi-pallidal stimulation for Lance-Adams syndrome, *Neurology*, 査読有, 76, 2011, 1270-1272
- ② 山田和慶、長谷川 雄、倉津純一、不随意運動症に対する定位脳手術とその治療ターゲット②、*脳神経外科速報*、査読無、21、2011、64-71
- ③ 山田和慶、長谷川 雄、倉津純一、不随意運動症に対する定位脳手術とその治療ターゲット①、*脳神経外科速報*、査読無、20、2010、1405-1411
- ④ Yamada K, Shiraishi S, Hamasaki T, Kuratsu J, Cardiac ¹²³I-MIBG scintigraphy as an outcome-predicting tool for subthalamic nucleus stimulation in Parkinson's disease, *Acta Neurochir. (Wien)*, 査読有, 152, 2010, 2063-2068
- ⑤ Hamasaki T, Yamada K, Hirai T, Kuratsu J. White matter volume in Parkinson disease -A predictive factor for response to subthalamic stimulation-, *Acta Neurochir (Wien)*, 査読有, 152, 2010, 997-1006
- ⑥ Hamasaki K, Yamada K, Hamasaki T, Kuratsu J, GPi-pallidal stimulation to treat generalized dystonia in Cockayne syndrome, *Mov Disord*, 査読有, 25, 2010, 656-658
- ⑦ Yamada K, Hamasaki T, Kuratsu J, Subthalamic nucleus stimulation applied in the earlier vs. advanced stage of Parkinson's disease -Retrospective evaluation of postoperative independence in pursuing daily activities-, *Parkinsonism Relat Disord*, 査読有, 15, 2009, 746-751
- ⑧ Hamasaki, T., Yamada, K. Kuratsu J, Hemidystonia secondary to thalamic hemorrhage treated with GPi stimulation, *Mov Disord*, 査読有, 23, 2008, 1762-1766
- ⑨ Yamada K, Goto S, Hamasaki T, Kuratsu J, Bilateral subthalamic nucleus stimulation for levodopa-unresponsive axial symptoms in Parkinson's disease, *Acta Neurochir (Wien)*, 査読有, 150, 2008, 15-22
- ⑩ Yamada K, Harada M, Inoue N, Yoshida S, Morioka M, Kuratsu J, Concurrent hemichorea and migrainous aura -A perfusion study on the basal ganglia using xenon-computed tomography, *Mov Disord*, 査読有, 23, 2008, 425-429

[学会発表] (計9件)

- ① 山田和慶: 慢性難治性疼痛に対する機能神経外科治療の長期予後評価における PainVSION の意義. 第50回日本定位・機能神経外科学会、2011年1月22日、広島、ANA クラウンプラザホテル広島
- ② 山田和慶、倉津純一: 高齢パーキンソン症例に対する両側視床下核刺激術の効果と問題点. 第69回日本脳神経外科学会総会、2010年10月29日、福岡、マリンメッセ福岡
- ③ 山田和慶、倉津純一: 心筋 ¹²³I-MIBG シンチグラフィはパーキンソン病における視床下核刺激術の治療効果を予測する. 第49回日本定位・機能神経外科学会、2010年1月23日、大阪、千里ライフサイエンスセンター
- ④ 櫻間智孝、山田和慶、倉津純一: 虚血後ミオクローヌス(Lance-Adams 症候群)に対する淡蒼球内節刺激術. 第49回日本定位・機能神経外科学会、2010年1月23日、大阪、千里ライフサイエンスセンター
- ⑤ 山田和慶、倉津純一: 両側淡蒼球内節凝固術治療歴のあるパーキンソン病症例に対する両側視床下核刺激術. 第68回日本脳神経外科学会総会、2009年10月16日、東京、京王プラザホテル
- ⑥ 山田和慶、倉津純一: 視床痛に対する内包後脚刺激術の長期効果. 第48回日本定位・機能神経外科学会、2009年1月25日、東京
- ⑦ 浜崎 禎、山田和慶、倉津純一: パーキンソン病における脳白質量と視床下核刺激術の効果の関連性-Voxel based morphometry による解析-. 第48回日本定位・機能神経外科学会、2009年1月25日、東京、東京ステーションコンファレンス
- ⑧ 濱崎清利、山田和慶、倉津純一: Cockayne 症候群に伴う全身性ジストニアに対する両側淡蒼球内節刺激術. 第48回日本定位・機能神経外科学会、2009年1月24日、東京、東京ステーションコンファレンス
- ⑨ 山田和慶、倉津純一: パーキンソン病における振戦は視床下核刺激術後のADLに影響するか? 第67回日本脳神経外科学会総会、2008年10月2日、盛岡、岩手県民会館

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉津 純一 (KURATSU JUN-ICHI)
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号: 20145296

(2) 研究分担者

森岡 基浩 (MORIOKA MOTOHIRO)
熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授
研究者番号: 20295140
山田 和慶 (YAMADA KAZUMICHI)
熊本大学・医学部附属病院・特任准教授
研究者番号: 00398215