

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09344

研究課題名(和文)特発性正常圧水頭症モデルを用いたGlymphatic systemの解析

研究課題名(英文)Analysis of Glymphatic system in ideopathic normal pressure hydrocephalus rat

研究代表者

菊田 健一郎(Kikuta, Kenichiro)

福井大学・学術研究院医学系部門・教授

研究者番号：90332725

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文): 230-250gのSD雌ラットに0.2%イソフルラン吸入麻酔で全身麻酔をかけ、定位脳装置で頭部を固定しBregmaから0.8mm右外側、1.6mm後方の部位にburr holeを作成し、30ゲージ針で3.7mmの深度まで穿刺し、30%kaolin懸濁液30 μ Lを脳室内投与してラットiNPHモデルを作成した。5週間で水頭症が発生し大槽内投与モデルが約2ヶ月で死亡するのに対し長期生存が可能であった。モリス水迷路試験及びBeams試験によりラットiNPHモデルはコントロールラットと比べ有意な学習、記憶障害が生じ、有意に多い落下回数を認め歩行障害が出現することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化社会を迎え、treatable dementiaであるiNPHの病態解明は、豊かな高齢者社会のために重要と考えられる。本研究は、iNPHを的確にmimickする水頭症モデルが開発されたことにより、今後の病態解明につながると考えられ、極めて意義が高い研究と言える。

研究成果の概要(英文): Under general anesthesia with inhalation of 0.2% isoflurane, the head of 230-250g-weighted male SD rat was fixed with stereotactic equipment and a burr-hole was made at 0.8mm lateral, 1.6mm posterior to Bregma. 30 gauge needle was inserted to the brain through the burr hole to reach 3.7mm depth. After that, 30 μ L of 30% kaolin solution with 60 minute sonication was injected slowly. Hydrocephalus could be induced at 5 weeks after operation. While conventional hydrocephalus model induced by intra cisterna magna injection of kaolin died around 2 months after surgery, our model could survive much longer. Morris water maze test and Beams test revealed our iNPH model rat showed significant learning and memory disturbance and gait disturbance.

研究分野：脳神経外科

キーワード：正常圧水頭症 ラット モデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 本邦では高齢化にともない認知症が著しく増加しており、2012年には462万人であった認知症の患者数が2025年には730万人に達する見込みである(厚生労働省統計)。認知症は脳内に認知症関連蛋白が沈着することが原因と考えられており、アルツハイマー病ではアミロイド蛋白とタウ蛋白が、レビー小体型ではシヌクレインが、前頭側頭型ではタウ、TDP-43、FUSが沈着する。正常圧水頭症(normal pressure hydrocephalus: NPH)とは髄液循環の停滞により脳室が拡大する認知症疾患である。中でも高齢者に多く原因が特定されない特発性正常圧水頭症(idiopathic NPH: iNPH)は高齢化により他の認知症同様に増加傾向にある。iNPHは「シャント術」という髄液を腹腔に流す新しい経路を作成する手術により症状が劇的に改善し「手術で治せる認知症」として注目されているが、その発症機序は不明であった。

(2) 近年脳内の髄液循環は脳室-髄液腔のみならず、血管周囲腔と脳実質の間のGlymphatic systemを介しても循環していることが明らかになっているが(Nedergaard M et al: Science.2013;340(6140):1529-30)。MRIやPET、髄液などを用いた臨床研究によりiNPH患者における脳内にもアミロイド蛋白やタウ蛋白などの認知症関連蛋白が蓄積、Glymphatic systemの障害を示唆する微小出血の増加などが報告されている。しかし臨床研究では「iNPHにおける認知症関連蛋白の役割やGlymphatic systemとの変化」についての詳細な分子機構を解明するには限界があった。

2. 研究の目的

本研究の目的は「iNPHにおける認知症関連蛋白の役割とGlymphatic systemの機能変化」の詳細について、ラットおよびマウスにおいて正常圧水頭症モデルを作成して免疫組織学的、放射線学的解析を行い解明することである。本研究では従来のkaolin大槽内投与モデルではなく、長期生存可能なkaolin脳室内投与モデルを用いる点が独創的であった。

3. 研究の方法

これまでにkaolinやSiliconeを大槽に注入するモデルや、TGF- β やFGF-2を脳室内投与するモデルが報告されてきたが、2015年にkaolinをマウス側脳室内に投与するモデルが報告された(Jong-Seok Yoon et al. Childs Nerv Syst 2015)。本モデルはこの論文以外に報告がなく再現が困難である可能性があるが再現を試みた。230-250gのSprague-Dawley(SD)ラットまたはWister Kyoto雌ラットを用いる。0.2%イソフルラン吸入麻酔で全身麻酔をかけラットの頭部を定位脳装置で固定し頭頂部に皮膚切開を行いBregma周囲の骨を露出。ラットではBregmaから0.8mm右外側、1.6mm後方の部位にドリルにてburr holeを作成した。Burr holeより30ゲージ針で3.7mmの深度まで穿刺し、50 μ Lシリンジを用いてiNPHモデル群では30%kaolin懸濁液30 μ Lを、Control群では生理食塩水30 μ Lを脳室内投与した。Burr holeをレジンで閉鎖し皮膚を縫合して手技を終了した。側脳室内投与モデルを安定して作成するにはkaolinの60分間超音波破碎することが必要であった。

(2) モリス水迷路試験：iNPHモデルにおける学習および記憶能力をモリス水迷路試験によって測定した。直径1.5m深さ1mの桶に45cmの深さまで20Lの水を張り、直径10cm高さ30cmのプラットホームを一ヶ所設定する。プラットホームの対側の水上で、iNPHラットまたはControlラットを水中に解放し、泳いでプラットホームに到達するまでの時間を計測し3回繰り返し、最初のタイムに対する変化率を測定した。

Beams試験：運動機能をBeams試験により測定した。幅1cm長さ1mの橋を作成し、ラットを渡らせて渡りきるまでに何回落下するかを測定する。歩行中は後方から強い蛍光灯を当てラットが後方に戻らないようにした。

4. 研究成果

(1) 側脳室内投与モデルは水頭症発症に5週間を要した(図1)。生存率は大槽内投与モデルが約2ヶ月で死亡するのに対し、側脳室内投与モデルはゆっくりと水頭症が生じ、長期生存が可能であった(図2)。また側脳室内投与モデルはcontrolと比して体重増加が有意に低かった(図3)。

(2) iNPHラットの記憶機能、運動機能

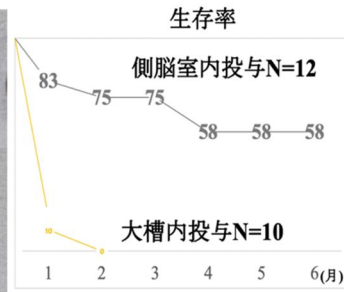
モリス水迷路試験：iNPHラットはControlラットに比して有意な学習、記憶障害を認めた(図4)。

Beams試験：iNPHラットはControlラットに比して有意に多い落下回数を認め歩行障害が出現した(図5)。

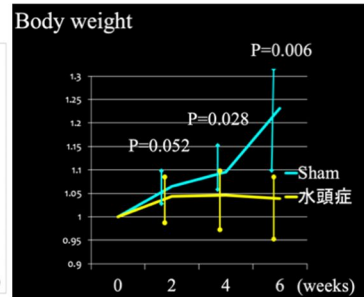
(図 1)
iNPH (5weeks)



(図 2)

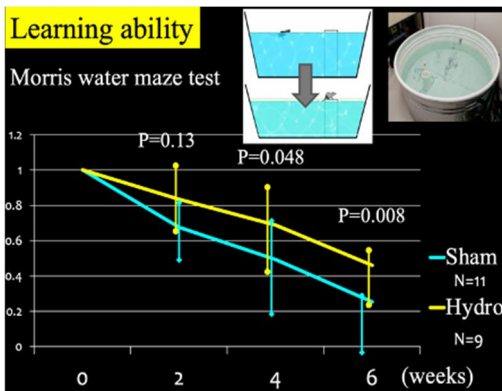


(図 3)

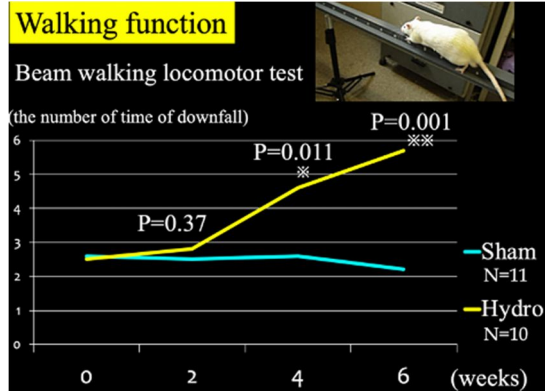


- (図 1) 側脳室内投与モデルは水頭症発生に 5 週間を要した
 (図 2) 大槽内投与モデルが約 2 ヶ月で死亡し、側脳室内投与モデルは長期生存が可能
 (図 3) 側脳室内投与モデルは control と比して体重増加が有意に少なかった。

(図 4)



(図 5)



- (図 4) モリス水迷路試験において iNPH ラットは Control ラットに比して有意な学習、記憶障害を認めた。
 (図 5) Beams 試験におい iNPH ラットは Control ラットに比して有意に多い落下回数を認めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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