

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16006

研究課題名（和文）脳梗塞の慢性期神経脱落における自己免疫性活性化T細胞および頸部リンパ節の役割

研究課題名（英文）Roles of activated T lymphocytes and cervical lymph nodes in chronic neurodegeneration in ischemic stroke

研究代表者

泉尾 直孝 (Izuo, Naotaka)

富山大学・学術研究部薬学・和漢系・助教

研究者番号：50722261

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）：脳梗塞は血管の狭窄閉塞により、その支配領域の神経細胞が壊死する疾患である。本研究では、認知症や片麻痺などの脳梗塞の後遺症の原因となる慢性期二次性神経脱落における、急性期の炎症応答の関与を検証するため、末梢リンパ球の脳内浸潤経路である頸部リンパ節の脳梗塞における役割を検討した。脳梗塞モデルマウスにおける頸部リンパ節の外科的除去は、急性期では線条体内のリンパ球数増加の抑制を伴い運動機能障害を軽減したが、慢性期では認知機能低下の回復を遅延した。頸部リンパ節を経由して脳内浸潤する末梢リンパ球の脳梗塞病態における重要性が示唆された。本研究成果は、脳梗塞の新しい治療法開発に基礎的知見を提供するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳梗塞に対する薬物治療法は十分に確立されていない。本研究では、末梢リンパ球とその脳内浸潤経路である頸部リンパ節に着目し、脳梗塞病態における重要性について、モデルマウスを用いて解析したところ、これらの要因は、急性期においては病態促進的に、慢性期においては病態抑制的に機能することが明らかとなった。このことから、末梢から頸部リンパ節を介して脳内に伝達される炎症シグナルは、脳梗塞病態に重要な役割を有し、その制御は脳梗塞に対する新しい治療法の開発につながる知見を提供する。

研究成果の概要（英文）：Cerebral ischemic stroke is triggered by the occlusion of cerebral blood vessels. In this study, to examine the involvement of inflammatory responses in the acute phase in the neurodegeneration in the chronic phase, which causes dementia, we investigated the role of cervical lymph nodes, an infiltrating pathway of peripheral lymphocytes into the brain, in the ischemic stroke. Surgical removal of cervical lymph nodes from a mouse model of cerebral ischemic stroke reduced motor dysfunction in the acute phase with the suppression of the increase in the lymphocyte counts in the striatum, while delayed recovery of cognitive decline in the chronic phase. These results suggest the importance of peripheral lymphocytes infiltrating into the brain via cervical lymph nodes in the pathogenesis of cerebral infarction. This study provides basic evidence for the development of new treatment for cerebral ischemic stroke.

研究分野：神経薬理学

キーワード：脳梗塞 炎症反応 頸部リンパ節 末梢リンパ球 行動試験 モデルマウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞は、脳血管障害の大半を占め、要介護認定要因となる主要な疾患である。片麻痺やふらつき、言語障害といった症状が現れる急性期を経て、慢性的な身体障害や認知機能障害が生じる。脳梗塞では、脳動脈の狭窄や閉塞を引き金にその支配領域への血流が低下し、酸素や栄養素の欠乏により神経細胞が障害され、梗塞巣が形成される。現在の薬物治療は血栓溶解療法が主であるがその効果は限定的であり、新しい薬物治療法の開発が望まれている。

脳梗塞病態では末梢免疫細胞の脳実質内浸潤が認められ、免疫不全マウスを用いた研究などによりその病理学的役割について明らかになってきている。また慢性期においては梗塞巣から離れた脳領域において神経変性が認められるが、この神経変性領域においてリンパ球数の増加が認められ、脳梗塞慢性期の神経脱落における末梢リンパ球の関与が示唆されている。近年、脳内のリンパ組織の存在とその機能が明らかとなり、頸部リンパ節を介した脳と末梢免疫が機能的に繋がっていることが明らかとなってきた。そこで本研究では、頸部リンパ節から髄膜リンパ管を経由して脳実質内に浸潤する末梢 T 細胞の脳梗塞病態における役割について明らかにする。

2. 研究の目的

本研究では、頸部リンパ節から髄膜リンパ管を経由して脳実質内に浸潤する末梢 T 細胞の脳梗塞病態における役割を明らかにするため、脳梗塞モデルマウスに対して頸部リンパ節の外科的除去術 (Excision of cervical lymph nodes: CLNE) を施したときの病態や症状の変化について解析した。

3. 研究の方法

脳梗塞モデルマウスは、8-9 週齢の雄性 C57BL/6J マウスに対し、イソフルラン麻酔下で総頸動脈からフィラメントを挿入し、コーティングした先端を中大脳動脈 (MCA) に到達させることで閉塞させる、一過性中大脳動脈閉塞術 (transient MCA Occlusion; tMCAO) により作製した。フィラメントは梗塞開始から 1 時間後に抜去した。すべての頸部リンパ節 (parotid lymph nodes, submandibular lymph nodes, deep cervical lymph nodes) は、実体顕微鏡下で tMCAO 処置直前に摘出した。梗塞巣は 2,3,5-triphenyltetrazoliumchloride (TTC) 染色により可視化し、その体積を評価した。運動機能は運動協調性について、ビームバランス試験を用いて評価した。認知機能は、新規物体認識試験を用いて評価した。CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞は組織免疫化学染色を用いて評価した。

4. 研究成果

髄膜リンパ管を介した脳と頸部リンパ節の連結を可視化するため、5% Evans blue 溶液を脳室内投与したところ、30 分後から deep cervical lymph nodes の染色が認められ、また 90 分後から parotid lymph nodes, submandibular lymph nodes の染色が認められた (Figure 1)。このことから、脳と頸部リンパ節が直接的に連結していることが明らかとなった。

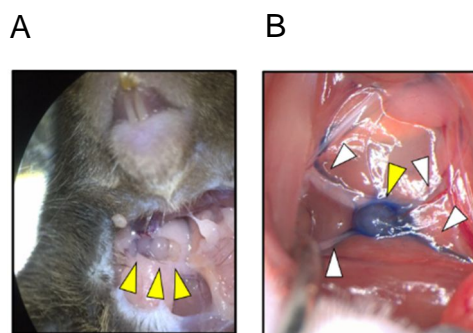


Figure 1. 頸部リンパ節の同定。
5% Evans blue 溶液を脳室内投与したときの (A) submandibular lymph nodes および (B) deep cervical lymph nodes の染色像。黄色の矢じりは頸部リンパ節を差し、白の矢じりは髄膜リンパ管を差し。

CLNE が脳梗塞の急性期病態に与える影響について検討した。まず、梗塞巣体積について評価したところ、tMCAO の 1 日後、3 日後における梗塞巣体積に対して頸部リンパ節の除去は影響を与えなかった (Figure 2)。次に、ビームバランス試験により運動協調性を評価したところ、CLNE は tMCAO の 3 日後における運動協調性の顕著な低下を有意に抑制した (Figure 3)。この運動協調性低下の抑制メカニズムを明らかにするため、脳実質内の CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞の数について解析した。CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞のいずれにおいても tMCAO により認められる線条体内の細胞数の増加は、CLNE により強力に抑制された。以上の結果より、頸部リンパ節を介して脳内浸潤する CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞が脳梗塞による運動機能障害を媒介していることが示唆される。

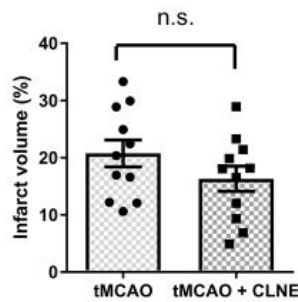


Figure 2. CLNE の梗塞巣体積への影響。CLNE は tMCAO による梗塞巣の体積に影響を与えなかった。

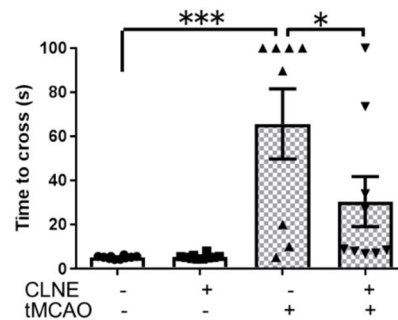


Figure 3. CLNE による tMCAO 誘導運動機能不全の軽減。術後 3 日目において、tMCAO による運動協調性の障害は CLNE により優位に抑制された。

CLNE が脳梗塞の慢性期病態に与える影響について検討した。tMCAO 群は、術後 4 週間に実施した新規物体認識試験において認知機能障害を示したが、11 週間後においては認知機能障害を示さなかった。一方、CLNE + tMCAO 群は、術後 4 週間および 11 週間のいずれにおいても認知機能障害を示した。脳容積を MRI を用いて評価したところ、tMCAO 群では、術後 6 週間から 10 週間において脳容積減少の回復が認められたが、CLNE + tMCAO 群では脳容積減少の回復は認められなかった (Figure 4)。以上のことから、頸部リンパ節を介して脳内浸潤するリンパ球が脳梗塞慢性期における認知機能や脳容積の回復に関与していることが示唆される。

本研究において、CLNE は tMCAO の術後急性期において保護的に作用する一方、慢性期においては病態回復を抑制する作用を示した。頸部リンパ節を介して脳内浸潤するリンパ球は、脳梗塞病態の急性期においては病態促進的に働き、慢性期においては神経機能の回復を促す機能有することが示唆される。本研究は、頸部リンパ節を基軸とした末梢リンパ球の機能調節が脳梗塞に対する新しい治療戦略となりうることを示している。またそのためには、脳梗塞病態のステージごとにおいて機能する免疫細胞の性質や役割に関するさらなる解析が必要であると考えられる。

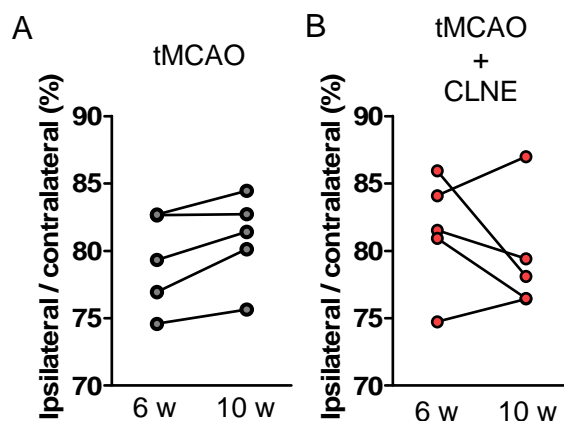


Figure 4. CLNE による tMCAO 慢性期の脳容積に対する影響。tMCAO 群では術後 6 週間から 10 週間において脳容積の回復が認められたが、tMCAO + CLNE 群では脳容積の回復は認められなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Izuo Naotaka, Nitta Atsumi	4. 巻 11
2. 論文標題 New Insights Regarding Diagnosis and Medication for Schizophrenia Based on Neuronal Synapse?Microglia Interaction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Personalized Medicine	6. 最初と最後の頁 371 ~ 371
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jpm11050371	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 Izuo Naotaka, Shimizu Takahiko, Murakami Kazuma, Irie Kazuhiro	4. 巻 141
2. 論文標題 Development of a Novel Alzheimer's Disease Model Based on the Theory of the Toxic-conformer of Amyloid	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 843 ~ 849
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/yakushi.20-00251-5	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 Nitta Atsumi, Izuo Naotaka, Hamatani Kohei, Inagaki Ryo, Kusui Yuka, Fu Kequan, Asano Takashi, Torii Youta, Habuchi Chikako, Sekiguchi Hiroataka, Iritani Shuji, Muramatsu Shin-ichi, Ozaki Norio, Miyamoto Yoshiaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Schizophrenia-Like Behavioral Impairments in Mice with Suppressed Expression of Piccolo in the Medial Prefrontal Cortex	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Personalized Medicine	6. 最初と最後の頁 607 ~ 607
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jpm11070607	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 Murakami Kazuma, Izuo Naotaka, Bitan Gal	4. 巻 298
2. 論文標題 Aptamers targeting amyloidogenic proteins and their emerging role in neurodegenerative diseases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101478 ~ 101478
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.101478	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 該当する

1. 著者名 Murakami Kazuma, Sakaguchi Yoshiki, Taniwa Kota, Izuo Naotaka, Hanaki Mizuho, Kawase Taiji, Hirose Kenji, Shimizu Takahiko, Irie Kazuhiro	4. 巻 3
2. 論文標題 Lysine-targeting inhibition of amyloid oligomerization by a green perilla-derived metastable chalcone <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 RSC Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 1380 ~ 1396
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d2cb00194b	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 Maki Takahito, Sawahata Masahito, Akutsu Ichiro, Amaike Shohei, Hiramatsu Genki, Uta Daisuke, Izuo Naotaka, Shimizu Takahiko, Irie Kazuhiro, Kume Toshiaki	4. 巻 23
2. 論文標題 APP Knock-In Mice Produce E22P-A Exhibiting an Alzheimer's Disease-like Phenotype with Dysregulation of Hypoxia-Inducible Factor Expression	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 13259 ~ 13259
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms232113259	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 Tokutake Tomohiro, Asano Takashi, Miyanishi Hajime, Nakaya Shigetoshi, Izuo Naotaka, Nitta Atsumi	4. 巻 47
2. 論文標題 Cannabinoid Type 1 Receptors in the Basolateral Amygdala Regulate ACPA-Induced Place Preference and Anxiolytic-Like Behaviors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neurochemical Research	6. 最初と最後の頁 2899 ~ 2908
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11064-022-03708-8	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 Kusui Yuka, Izuo Naotaka, Uno Kyosuke, Ge Bin, Muramatsu Shin-ichi, Nitta Atsumi	4. 巻 47
2. 論文標題 Knockdown of Piccolo in the Nucleus Accumbens Suppresses Methamphetamine-Induced Hyperlocomotion and Conditioned Place Preference in Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neurochemical Research	6. 最初と最後の頁 2856 ~ 2864
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11064-022-03680-3	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 Chino Kakeru, Izuo Naotaka, Noike Hiroshi, Uno Kyosuke, Kuboyama Tomoharu, Tohda Chihiro, Muramatsu Shin-Ichi, Nitta Atsumi	4. 巻 47
2. 論文標題 Shati/Nat81 Overexpression Improves Cognitive Decline by Upregulating Neuronal Trophic Factor in Alzheimer's Disease Model Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neurochemical Research	6. 最初と最後の頁 2805 ~ 2814
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11064-022-03649-2	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 Miyanishi Hajime, Kitazawa Ayumu, Izuo Naotaka, Muramatsu Shin-ichi, Nitta Atsumi	4. 巻 47
2. 論文標題 N-Acetyl Transferase, Shati/Nat81, in the Dorsal Hippocampus Suppresses Aging-induced Impairment of Cognitive Function in Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neurochemical Research	6. 最初と最後の頁 2703 ~ 2714
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11064-022-03594-0	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19件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Akira Takahashi, Naotaka Izuo, Takashi Asano, Atsumi Nitta
2. 発表標題 Attenuation by cervical lymph nodes excision against motor deficits in the mice model with ischemic cerebral stroke
3. 学会等名 AsCNP2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋 晃、泉尾直孝、浅野昂志、新田淳美
2. 発表標題 Suppressive effects of cervical lymph nodes excision on pathology of ischemic cerebral stroke
3. 学会等名 第95回日本薬理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 泉尾 直孝
2. 発表標題 再発見された脳内リンパ系の機能と脳疾患における役割
3. 学会等名 日本薬学会第142年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tomohiro Tokutake, Takashi Asano, Shigetoshi Nakaya, Naotaka Izuo, Atsumi Nitta.
2. 発表標題 Key roles of CB1 receptors in the amygdala: ACPA induced place preference
3. 学会等名 AsCNP2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takashi Asano, Kazuki Tokoro, Tomoya Horita, Naotaka Izuo, Shin-ichi Muramatsu, Atsumi Nitta
2. 発表標題 A novel bipolar mice model by Teneurin-4 reduction in the prefrontal cortex
3. 学会等名 AsCNP2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 徳竹伯洸, 浅野昂志, 泉尾直孝, 新田淳美
2. 発表標題 マウス前頭前皮質 CB1受容体の認知記憶への関与
3. 学会等名 2021年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 徳竹伯洸, 浅野昂志, 中家茂俊, 泉尾直孝, 新田淳美
2. 発表標題 ACPA誘発場所嗜好性に対する扁桃体CB1受容体の関与
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第133回例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉森祐一朗, 浅野昂志, 泉尾直孝, 村松慎一, 新田淳美
2. 発表標題 Decreased expression of Teneurin-4 in mouse hippocampus induces depressive-like behavior
3. 学会等名 第95回日本薬理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 徳竹伯洸, 浅野昂志, 泉尾直孝, 新田淳美
2. 発表標題 Involvement of mouse prefrontal cortex CB1 receptor in cognitive memory
3. 学会等名 第95回日本薬理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 玉谷隆典, 泉尾直孝, 中島卓海, 新田淳美
2. 発表標題 Suppressive effects of glatiramer acetate on the addiction induced by methamphetamine via upregulation of osteopontin in mice
3. 学会等名 第95回日本薬理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 徳原伶香、泉尾直孝、楠井優香、浅野昂志、新田淳美
2. 発表標題 Cognitive dysfunction and hippocampal synaptic impairment induced by methamphetamine locally injection into the nucleus accumbens
3. 学会等名 第95回日本薬理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 楠井優香、宇野恭介、泉尾直孝、村松慎一、新田淳美
2. 発表標題 覚せい剤メタンフェタミンのマウス行動的变化に対するプレシナプスタンパク質Piccolo の作用
3. 学会等名 第43回日本生物学的精神医学会・第51回日本神経精神薬理学会 合同年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高村 雄策、泉尾 直孝、久米 利明、入江一浩、小松 生明
2. 発表標題 次世代型ADモデルAppNL-P-F/NL-P-F KIマウスにおける心理行動異常と脳内変動
3. 学会等名 第72回西日本生理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Izuo N, Takahashi A, Matsuo Y, Nitta A
2. 発表標題 Removal of cervical lymph nodes suppresses motor dysfunction in mice with cerebral ischemic stroke
3. 学会等名 33rd CINP World Congress of Neuropsychopharmacology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kusui Y, Izuo N, Tokuhara R, Nitta A
2. 発表標題 The cognitive impairment and the activation of hippocampal microglia induced by the methamphetamine-mediated excessive dopamine in the nucleus accumbens of mice
3. 学会等名 33rd CINP World Congress of Neuropsychopharmacology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tokutake T, Asano T, Izuo N, Nitta A
2. 発表標題 CB1 receptors in the mice prefrontal cortex regulate spatial cognitive function
3. 学会等名 33rd CINP World Congress of Neuropsychopharmacology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 楠井優香, 徳原伶香, 泉尾直孝, 新田淳
2. 発表標題 覚醒剤メタンフェタミンによる記憶障害とメカニズム解明
3. 学会等名 2022年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浅野昂志, 竹本弘樹, 徳竹伯洸, 堀田朋弥, 泉尾直孝, 望月貴年, 新田淳美
2. 発表標題 マウス大麻離脱時における睡眠の変化
3. 学会等名 2022年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉森祐一朗, 浅野昂志, 所一輝, 泉尾直孝, 村松慎一, 新田淳美
2. 発表標題 マウス海馬におけるTeneur in-4のうつ様行動への関与
3. 学会等名 第44回日本生物学的精神医学会年会・第52回日本神経精神薬理学会年会・第32回日本臨床精神神経薬理学会年会・第6回日本精神薬学会年会・4学会合同年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

富山大学薬学部薬物治療学研究室（所属研究室）のHP http://www.pha.u-toyama.ac.jp/yakuchi/top.html?msclkid=2793f29db7f311ecb1d7956292314862 富山大学薬学部薬物治療学研究室（所属研究室）のHP http://www.pha.u-toyama.ac.jp/yakuchi/top.html 富山大学研究者総覧 https://evaweb.u-toyama.ac.jp/html/100001423_ja.html?k=izuoz#
--

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