

令和 5 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K19446

研究課題名（和文）交連線維の神経活動操作による脳梗塞後の新規治療法開発に向けた研究

研究課題名（英文）The role of commissural fibers in the recovery after ischemic stroke

研究代表者

中西 徹（Nakanishi, Toru）

大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教（常勤）

研究者番号：00848492

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）：脳梗塞後の炎症は、梗塞巣周囲の神経細胞に細胞死を誘導し、梗塞巣の拡大を引き起こす。したがって、脳梗塞後の炎症制御メカニズムは明らかにすることは、有効な治療法を開発する上で重要である。本研究では、脳梗塞後の梗塞巣拡大に、非梗塞側からの交連線維が果たす役割を検証した。脳梗塞モデルマウスを作製後、非梗塞半球の神経活動を人為的に抑制した結果、梗塞巣のサイズに変化は見られなかった。今後は、脳梗塞モデルマウスの作製方法や、神経活動の操作時期等について、条件検討を行っていく必要があると考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今後、非梗塞半球や交連線維の神経活動の操作によって、脳梗塞後の炎症を抑制できることが明らかになれば、非梗塞側半球が脳梗塞後の機能回復に関与するメカニズムの一端を解明することができると考える。また、非梗塞側半球への有効な経頭蓋磁気刺激方法の開発など、脳梗塞後の新たなリハビリテーション戦略の確立に向けた科学的根拠となることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Inflammation after ischemic stroke induces cell death in neurons around the infarct core, leading to expansion of the infarct area. Therefore, it is important to clarify the regulatory mechanism of inflammation after ischemic stroke in order to develop effective therapies. In this study, I examined the role of commissural fibers from the non-infarcted hemisphere in the expansion of infarct area. Using the mouse model of ischemic stroke, I artificially suppressed neural activity in the non-infarcted hemisphere and found no change in the size of the infarcted area. In the future, it will be necessary to examine conditions for the creation of the ischemic stroke model mice and the timing of manipulation of neural activity.

研究分野：リハビリテーション

キーワード：脳梗塞 交連線維

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞は我が国における脳血管障害の約 8 割を占め、寝たきりの主な原因の一つとなっている。脳梗塞の治療法は急性期の血栓溶解療法などに限られ、亜急性期以降に有効な治療法が極めて少ない。また、脳梗塞後の運動麻痺に対してはリハビリテーションが用いられ一定の成果を上げているものの、その効果は不十分であることが多い。したがって、脳梗塞後の予後を改善するためには、亜急性期以降に有効な治療法を確立することが必要である。

そこで、本研究では脳梗塞後の炎症によって生じる二次的な神経細胞死に着目した。脳梗塞後、梗塞巣では虚血による不可逆的な神経細胞死が起こる。壊死した神経細胞はダメージ関連分子パターンと呼ばれる因子を放出し、免疫細胞の脳内への浸潤を促す。脳内に浸潤した免疫細胞は炎症性サイトカインを分泌することで、梗塞巣周囲 (ペナンプラ) の神経細胞を傷害し二次的な神経細胞死を引き起こす。炎症反応は一週間程度持続し、梗塞巣の拡大に寄与することから、脳梗塞後の炎症を制御し二次的な神経傷害を防ぐことは亜急性期以降の有効な治療戦略となりうる。

先行研究によって、脳梗塞後に免疫細胞が脳内に浸潤し炎症性サイトカインを分泌する分子メカニズムが明らかとなってきた (参考文献 1, 2)。その一方で、炎症の発生を抑制する内在性のメカニズムについては不明な点が多い。近年、脳梁形成不全を呈したマウスに脳梗塞を起こすと、通常のマウスよりも梗塞巣が拡大するという報告がなされた (参考文献 3)。このことから、脳梁を通過する交連線維が梗塞巣の拡大を抑制している可能性があるが、その具体的なメカニズムは不明である。したがって、本研究では交連線維がペナンプラの神経細胞のサイトカイン分泌を抑えることで脳梗塞後の炎症を制御し、二次的な神経細胞死を抑制している可能性を検証した。

2. 研究の目的

脳梗塞後のペナンプラで生じる二次的な神経細胞死に、非梗塞側からの交連線維を介した入力が果たす役割を明らかにすること。

3. 研究の方法

(1) 脳梗塞モデルマウスの作製

Photothrombosis 法によって、マウス (雄性、C57BL6J) の片側大脳皮質運動野周囲に梗塞巣を作製する。具体的には、光感受性色素であるローズベンガルを静脈内投与した後、緑色光を照射し、照射部位のみに血栓を作成することで、脳梗塞を誘導した。

(2) 交連線維特異的な DREADD (Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drugs) の発現誘導方法の確立

二種類のアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを大脳皮質の両側にそれぞれ注入することで、交連線維特異的に DREADD の発現を誘導した。具体的には、片側の大脳皮質に逆行性に感染する AAVretro-CMV-Cre-GFP を注入するとともに、対側の大脳皮質に AAV1-hSyn-DIO-hM4Di-mCherry を注入した。

(3) 大脳皮質における神経活動の抑制方法の確立

交連線維での神経活動操作に先立ち、交連線維を含む片側大脳皮質における神経細胞集団の活動を操作可能か検証した。具体的には、大脳皮質に Cre を発現する Emx1-Cre マウスに対して、AAV1-hSyn-DIO-hM4Di-mCherry を注入した。次に、新規 DREADD リガンドである Deschloroclozapine (DCZ) (参考文献 4) を投与した。その後、マウスを灌流固定し、作製した脳切片に対して、神経活動のマーカーである c-fos の免疫染色を行った。

(4) 対側大脳皮質の神経活動抑制による脳梗塞巣縮小効果の検証

上記 (3) の方法によって、片側大脳皮質に hM4Di の発現を誘導後、上記 (1) の方法によって、対側大脳皮質に脳梗塞を作製するとともに、DCZ の投与によって片側大脳皮質における神経活動を抑制した。その後、マウスを灌流固定し、作製した脳切片に対してニッスル染色を行い、梗塞巣のサイズを定量した。

4. 研究成果

上記の通り、Photothrombosis 法を実施後、TTC 染色によって大脳皮質運動野周囲に局限した脳梗塞が誘導されていることを確認した。

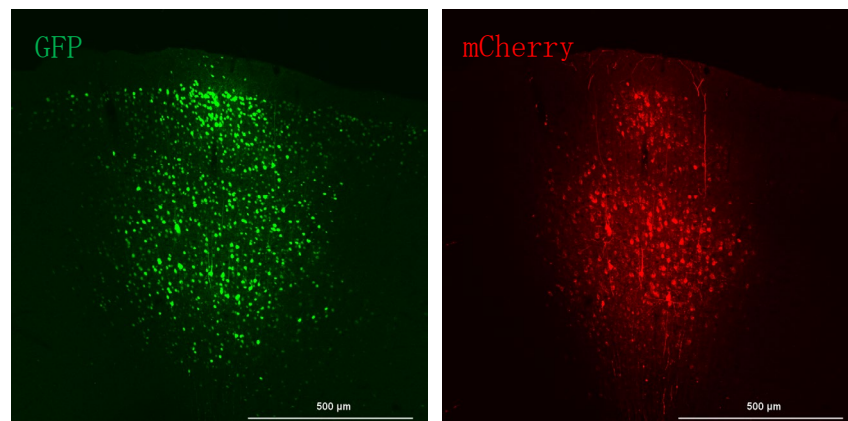
次に、AAV の二重感染について、逆行性 AAV ベクターの感染による GFP の発現を確認するとともに、Cre 依存的な hM4Di の発現が誘導されていることを mCherry の発現によって確認した (図 1)。

さらに、片側大脳皮質に hM4Di の発現を誘導後に、DCZ の投与によって神経活動が抑制されて

いるかを、mCherry 陽性細胞において c-fos の発現が低下している様子から確認した。

その後、非梗塞側大脳皮質の神経活動抑制群と非抑制群に対して、脳梗塞誘導後に採取した脳サンプルを用いたニッスル染色を行い、梗塞巣のサイズを比較した結果、神経活動抑制の有無による梗塞巣サイズの変化は観察されなかった。

図 1. AAV ベクターの二重感染による交連線維の標識



今後は、脳梗塞モデルマウスの作製方法や、神経活動の操作時期、梗塞巣サイズの評価方法等について、引き続き条件検討を行っていく必要があると考える。

<参考文献>

1. Nat Med. (2009) 15(8):946-50;
2. Nat Med. (2012) 18(6):911-7;
3. Stroke. (2011) 42(9):2584-8;
4. Nat Neurosci. (2020) 23(9):1157-1167

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