

令和 4 年 5 月 20 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：2020～2021

課題番号：20K23291

研究課題名(和文) 栄養因子ミッドカインの発現調節と運動療法の併用による新規の外傷性脳損傷治療の研究

研究課題名(英文) Novel Treatment of Traumatic Brain Injury by Combining Modulation of Trophic Factor Midkine Expression and Exercise Therapy

研究代表者

高田 聖也 (Takada, Seiya)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任助教

研究者番号：00878283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は神経栄養因子ミッドカインの発現を抑制する抗ミッドカインアプタマーを使用して外傷性脳損傷後の二次損傷を軽減できるかどうかを検討した。

ミッドカイン遺伝子の欠損やミッドカイン阻害剤の使用は局所炎症を軽減することが明らかとなっている。また、我々は以前にミッドカイン遺伝子の欠損が外傷性脳損傷後の二次損傷を軽減することを報告している。本研究において抗ミッドカインアプタマーは外傷性脳損傷後の脳損傷体積を有意に縮小することが示され、ミッドカイン遺伝子欠損マウスと同等の結果を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

外傷性脳損傷後の薬剤治療において、有効な方策を欠いているのが現状であるが、ミッドカインは新規の治療標的として大変魅力的である。ミッドカインは発生発達段階で一過性に発現が増加し、正常成体内ではほとんど発現しない。ミッドカイン遺伝子欠損マウスは明らかな発達遅延は観察されず、成体での異常行動も報告されていない。したがってミッドカインの発現抑制は副作用が小さいことが予想される。

研究成果の概要(英文)：This study examined whether anti-midkine aptamers, which suppress the expression of the neurotrophic factor midkine, reduce secondary damage after traumatic brain injury.

Deletion of the midkine gene and use of midkine inhibitors have been shown to reduce local inflammation. It has also been previously reported that deletion of the midkine gene reduces secondary injury after traumatic brain injury.

In the present study, anti-midkine aptamers were shown to significantly reduce the amount of brain injury after traumatic brain injury as much as in mice lacking the midkine gene.

研究分野：理学療法

キーワード：ミッドカイン 神経炎症 外傷性脳損傷

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

外傷性脳損傷は、誰にでも突発的に起こりうる脳血管障害であり、転倒事故の多い高齢者の本邦でも大きな問題となっている。二次損傷軽減のため外科的処置が行われるが効果は限定的であり、薬剤治療においても有効な方策を欠いているのが現状である。したがって、外傷性脳損傷の治療方法の確立は社会的に重要度の高い課題である。

神経栄養因子ミッドカイン(MK)はヘパリン結合性の成長因子である。研究代表者は以前に MK 遺伝子欠損マウスを使用して、MK 遺伝子の欠損が外傷性脳損傷後の二次損傷を軽減することを報告した。そのメカニズムは脳内免疫担当細胞のミクログリアの活性化を軽減することに加え、炎症性サイトカインを放出する M1 型ミクログリアの発現を抑制し、神経保護性サイトカインを放出する M2 型ミクログリアの発現を増加することであった。

アプタマーは特定の分子と特異的に結合する核酸分子やペプチドである。通常ランダム配列の巨大ライブラリ中から選び出してくるが、自然界にも存在しておりリボスイッチとして知られており、基礎から薬剤探索などの応用まで、幅広く研究されている。近年、抗 MK アプタマーに制御性 T 細胞の拡大を通じて実験的自己免疫性脳脊髄炎を軽減することが報告されている。

研究代表者は外傷性脳損傷後の二次損傷軽減に抗 MK アプタマーの使用が有効であると着想し実験に着手した。

2. 研究の目的

抗 MK アプタマーの使用が外傷性脳損傷の二次損傷軽減に有効であることを確認すること。

3. 研究の方法

(1)対象

10 週齢の雄の C57/BL6J マウスを 13 匹使用し、9 匹がモデル作成に成功した。9 匹(24.19 ± 0.86g)を無作為に MK aptamer 群(N=4)と Control 群(N=5)に分けた。動物はすべて日本 SLC 株式会社から購入した。

(2)外傷性脳損傷モデル

TBI の作成には Fluid percussion injury (FPI)モデルを採用した。マウスは、MK-A110 小動物用麻酔器(室町機械、東京)を用いて、1.5~2.0%のイソフルラン(ファイザー社、東京)で麻酔した。マウスは定位固定フレームに固定し、頭髪を除去して 70%エタノールで滅菌した。その後、頭皮の正中を切開して頭蓋骨を露出させ、右頭頂骨上で開頭した。さらに、硬膜を傷つけないように歯科用ドリルで円形の穴(直径 3.0mm)を開けた。手術部位はプレグマの後方 3.0mm、右方 3.0mm の位置とした。さらに、生理食塩水を入れたルアーロック(内径 3.0mm, Isis 社、大阪)を歯科用セメント(Provista 社, Morita 社, 大阪)で手術部位にしっかりと固定した。続いて、FPI デバイス(Dragonfly R & D INC. Model HPD-1700, USA)のチューブを、雄ルアーロックハブを接続した三方活栓に取り付けた。マウスに 2.0~3.0atm の水圧の衝撃を与えて、実験的に FPI を作成した。損傷後、頭蓋骨の穴内に出血と脳浮腫を確認され、呼吸停止や痙攣を呈するマウスを TBI モデルとして本研究に使用した。昏睡中のマウスの体重を測定し、覚醒するまでの時間を測定した。

(3)介入方法

外傷性脳損傷作成の直後、2 日後、4 日後、6 日後に生理食塩水で希釈した MK aptamer (150µg/g)

を腹腔内投与した。どちらの群も餌と水を自由摂取させた。

(4)組織採取

損傷 14 日後にペントバルビタールナトリウムで深く麻酔し、生理食塩水で心臓に灌流した。脳を取りだし、脳スライサーを使用して損傷中心部から前方及び後方の 2 つの組織ブロックを作成した。ブロックを 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で希釈した 4 の 4%パラホルムアルデヒドで一晩浸漬固定した。マイクロトームを使用して 4 μ mの冠状切片を作成し、形態学的観察に使用した。

(5)脳損傷体積測定

ScionImage ソフトウェア BETA4.0.3 (Scion Corp, Frederick, MD) を使用して、H E 染色した切片の脳脱落面積(mm²)を測定した。脱落面積を脳切片を切り出した間隔(200 μ m)で乗算して体積とし、脱落の見られたすべての切片の体積を加算して、総損傷体積(mm³)とした。

(6)統計学的解析

正規性を確認し、覚醒するまでの時間および脳損傷体積の比較に、Student の T 検定を実施した。データは平均 \pm 標準偏差、P <0.05 を示している。

4 . 研究成果

(1)覚醒時間

モデル作成の均一性の指標として、モデル作成からの覚醒時間を測定した。MK aptamer 群が 865.0 \pm 350.0sec、Control 群が 949.2 \pm 332.7sec であり、群間に有意な差はなかった(図 1)。したがってモデルの均一性は保たれていると考えられる。

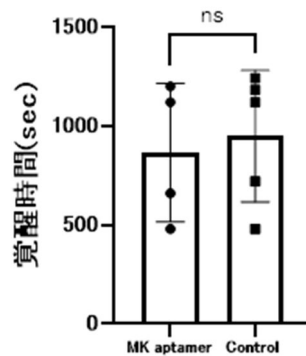


図. 1 モデル作成後の覚醒時間

(2)脳損傷体積

抗 MK アプタマーが外傷性脳損傷を軽減するかどうかを確かめるために脳損傷体積を測定した。Control 群と比較して MK aptamer 群は吻尾側への損傷の広がりが小さかった(図 2)。脳損傷体積は MK aptamer 群が 0.60 \pm 0.12mm³、Control 群が 1.33 \pm 0.48mm³であり、MK aptamer 群で有意に低下した (P = 0.022)(図 2)。この結果は抗 MK アプタマーの腹腔内投与が外傷性脳損傷の軽減に有効である可能性を示唆している。

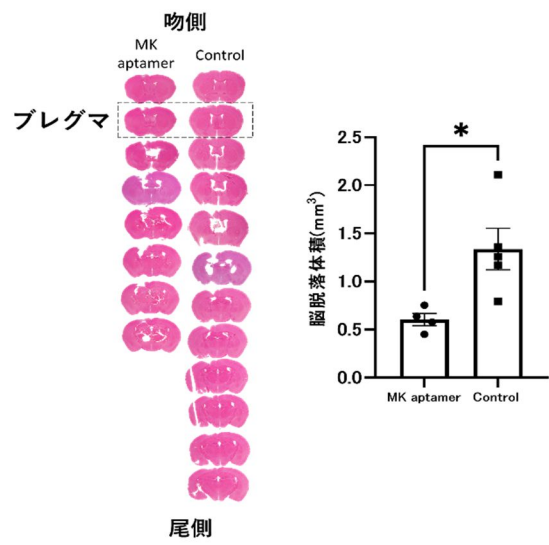


図. 2 脳脱落体積の比較

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Takada Seiya, Setoyama Kentaro, Norimatsu Kosuke, Otsuka Shotaro, Nakanishi Kazuki, Tani Akira, Nakakogawa Tomomi, Matsuzaki Ryoma, Matsuoka Teruki, Sakakima Harutoshi, Tancharoen Salunya, Maruyama Ikuro, Tanaka Eiichiro, Kikuchi Kiyoshi, Uchikado Hisaaki	4. 巻 23
2. 論文標題 E8002 Reduces Adhesion Formation and Improves Joint Mobility in a Rat Model of Knee Arthrobrosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1239 ~ 1239
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23031239	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 Otsuka Shotaro, Setoyama Kentaro, Takada Seiya, Nakanishi Kazuki, Terashi Takuto, Norimatsu Kosuke, Tani Akira, Sakakima Harutoshi, Maruyama Ikuro, Tancharoen Salunya, Tanaka Eiichiro, Kikuchi Kiyoshi	4. 巻 58
2. 論文標題 Preconditioning Exercise in Rats Attenuates Early Brain Injury Resulting from Subarachnoid Hemorrhage by Reducing Oxidative Stress, Inflammation, and Neuronal Apoptosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Neurobiology	6. 最初と最後の頁 5602 ~ 5617
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12035-021-02506-7	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 Otsuka Shotaro, Sakakima Harutoshi, Tani Akira, Nakanishi Kazuki, Takada Seiya, Norimatsu Kosuke, Maejima Hiroshi, Maruyama Ikuro	4. 巻 226
2. 論文標題 Effects of detraining on preconditioning exercise-induced neuroprotective potential after ischemic stroke in rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain Structure and Function	6. 最初と最後の頁 2169 ~ 2180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00429-021-02317-5	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 Nakanishi Kazuki, Sakakima Harutoshi, Norimatsu Kosuke, Otsuka Shotaro, Takada Seiya, Tani Akira, Kikuchi Kiyoshi	4. 巻 337
2. 論文標題 Effect of low-intensity motor balance and coordination exercise on cognitive functions, hippocampal A β deposition, neuronal loss, neuroinflammation, and oxidative stress in a mouse model of Alzheimer's disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental Neurology	6. 最初と最後の頁 113590 ~ 113590
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.expneurol.2020.113590	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 Kasamo Yuki, Kikuchi Kiyoshi, Yamakuchi Munekazu, Otsuka Shotaro, Takada Seiya, Kambe Yuki, Ito Takashi, Kawahara Ko-ichi, Arita Kazunori, Yoshimoto Koji, Maruyama Ikuro	4. 巻 22
2. 論文標題 1,5-Anhydro-D-fructose Protects against Rotenone-Induced Neuronal Damage In Vitro through Mitochondrial Biogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 9941 ~ 9941
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22189941	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 Ito Takashi, Totoki Takaaki, Takada Seiya, Otsuka Shotaro, Maruyama Ikuro	4. 巻 11
2. 論文標題 Potential roles of 1,5-anhydro-d-fructose in modulating gut microbiome in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-99052-y	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 2件)

1. 発表者名 Kazuki Nakanishi, Kosuke Norimatsu, Shotaro Otsuka, Seiya Takada, Akira Tani, Harutoshi Sakakima
2. 発表標題 Effect of low-intensity balance and coordination exercise on cognitive function, hippocampal A β deposition, neuronal loss, neuroinflammation, and oxidative stress in SAMP8
3. 学会等名 第44回日本神経科学学会 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akira Tani, Kazuki Nakanishi, Shotaro Otsuka, Kosuke Norimatsu, Seiya Takada, Teruki Matsuoka, Harutoshi Sakakima
2. 発表標題 Effect of low-intensity balance and coordination exercise on cognitive function, hippocampal A β deposition, neuronal loss, neuroinflammation, and oxidative stress in SAMP8
3. 学会等名 第44回日本神経科学学会 (国際学会)
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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