

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591851

研究課題名（和文） 非侵襲的脳機能再建の系統的戦略

研究課題名（英文） Systematic strategy for non-invasive neuro-reconstruction

研究代表者

藤木 稔 (FUJIKI MINORU)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：90231563

研究成果の概要（和文）：

致死的脳虚血に非致死的脳虚血を先行させると、その脳は遅発性神経細胞死から免れる（脳虚血耐性）。これは先行した非致死的脳虚血がストレス蛋白や神経保護的な成長因子を発現するためだと理解されているが、その詳細は不明である。近年、当研究室は、脳の非侵襲的刺激を先行させると、非致死的虚血同様に脳虚血耐性を獲得することを見いだした。すなわち、非虚血性の preconditioning による脳虚血耐性獲得の背景を検索することで虚血から「脳を守る」key を見だし、さらには脳虚血の治療応用へと発展させようとするものである。

研究成果の概要（英文）：

The present study demonstrates that repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) induces ischemic tolerance against delayed neuronal death (DND) of hippocampal neurons following an otherwise lethal ischemic insult.

Various regimens of rTMS were delivered to adult gerbils at various times prior to an episode of ischemia induced by transient (5min.) bilateral common carotid artery occlusion (BCCO). The extent of delayed neuronal death in the CA1 region of the hippocampus was assessed quantitatively 7 days after the transient ischemic episode.

We evaluated whether when rTMS delivered 2-5 days prior to BCCO, delayed neuronal death will be substantially attenuated as reported in ischemic tolerance. A similar degree of neuron sparing will be seen when stimulation was delivered 3, 4, or 5 days prior to BCCO. Effectiveness of rTMS was evaluated whether when stimulation was delivered at frequencies of 25 and 50 Hz.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

キーワード：脳虚血、神経細胞死、神経保護

1. 研究開始当初の背景

| 致死的脳虚血に非致死的脳虚血を先行させ

ると、その脳は遅発性神経細胞死から免れる(脳虚血耐性)。これは先行した非致死の脳虚血がストレス蛋白や神経保護的な成長因子を発現するためだと理解されている。当研究室は、脳の非侵襲的刺激を先行させると、非致死の虚血同様に脳虚血耐性を獲得することを見いだした。すなわち、非虚血性の preconditioning による脳虚血耐性獲得の背景を検索することで虚血から「脳を守る」key を見だし、さらには脳虚血の治療応用へと発展させようとするものである。このことを裏付ける実験事実として、非侵襲的大脳刺激で astrocyte が活性化され動物の脳内に神経成長因子 NGF, BDNF, VEGF を含む様々な遺伝子が発現すること、発現の条件は神経活動性依存性であること、発現は一過性でかつ神経損傷や痙攣発作は伴わないこと、安全性の確立された抗胃潰瘍薬などにも同様の神経保護効果を有することをも明らかにした。ニューロモデュレーションは脳虚血後神経機能再建の新機軸として、これら脳の可塑性に作用する因子誘導が鍵である。

2. 研究の目的

脳虚血動物モデルを対象に、脳虚血耐性獲得に最も有効な高頻度磁気刺激のパラメータと、その背景に発現される遺伝子を検索することにより脳虚血の病態を細胞・分子生物学的手法で解析、発現した遺伝子が損傷神経の修復・再構成に及ぼす影響を実験的に探る。

3. 研究の方法

脳梗塞動物モデルを対象に、脳虚血耐性獲得に最も有効な高頻度刺激 preconditioning のパラメータと、その背景に発現される遺伝子を検索する。神経細胞の活動性亢進のための conditioning には刺激条件; 周波数(5, 10, 25, 50, 100, 500Hz), 持続時間(8, 16, 32, 64, 128, 256 秒)及び刺激-虚血間隔の組み合わせ(.25, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 120 時間)を変化させ、sham コントロール(I)、5 分間虚血群(II)、磁気・電気刺激群(III)、磁気・電気刺激+5 分間虚血群(IV)(間隔 48 時間)の 4 群(各 n=10)を作成。それぞれ各群ごとに組織学的検索、分子生物学検索、行動・電気生理学的検索を行う。組織学的検索: 組織学的検索として HE; TUNEL 陽性細胞, VEGF, c-fos, P53 などの遺伝子発現, GFAP (reactive astrocyte) の免疫組織化学染色を行う。Homology 検索の結果に基づき、虚血、刺激、刺激+虚血・神経損傷によって新規に発現した遺伝子を同定する。

4. 研究成果

1) 脳梗塞動物の時間経過

虚血直後からの c-fos および各種細胞性反応は既報の結果に一致した。虚血直後から 2 時間で、脳梗塞部近傍に著しい c-fos, BDNF 遺伝子が発現し、以後漸減、c-fos は 2-4 時間、BDNF は 3-6 時間以内にコントロール値に帰した。Astrocytes や macrophages/microglia の活性は数日後から徐々に上昇し、1 週間でピーク。2-3 週で下降するものの、梗塞中央部や margin の活性は、4-8 週目以降も持続する。行動学的には、虚血直後に完全弛緩性麻痺、数日後には関節の屈伸~起立可能な動物も存在した(Tarlov score 2~3)。電気生理学的評価には motor evoked potentials; MEPs は行動学的改善に先行することはなく、やや遅れてコントロール値の 38~55%に改善した。

2) 神経虚血後磁気刺激の経時変化

組織学的評価 (GFAP 染色 (reactive astrocyte), Mac-1 染色 (macrophages/microglia) 及び神経栄養因子の遺伝子発現検索の結果、磁気刺激は梗塞中央部の c-fos 発現をわずかに増加させたが、持続時間は長くなく、虚血のみの発現の時間経過を大きく変えることはなかった。逆に梗塞動物の脳内 c-fos 発現は、虚血のみ、刺激のみの場合に比較して有意に大きかった ($p < .001$)。また、同様の手法で神経損傷の後、神経栄養因子 (Nerve growth factor; NGF) の遺伝子 (NGF mRNA) 発現を観察できた。梗塞そのものの大きさを抑制することはなかったが拘束後の運動機能回復は刺激群でより早い傾向であった。

脳梗塞動物モデルを対象に、運動機能障害の改善に最も有効な高頻度磁気刺激のパラメータと、その背景に発現される遺伝子を検索することにより脳梗塞の病態を細胞・分子生物学的手法で解析、発現した遺伝子が損傷神経の修復・再構成に及ぼす影響は臨床応用上重要なパラメータである。

基礎実験のレベルでは、損傷部位へ人工的に塗布した神経成長因子が損傷部位の再生のみならず、損傷から離れた部位の大脳神経細胞死をも抑制する事が報告されている。これらはいずれも、神経損傷で発現する遺伝子を外部から、移植などの方法で供給することによるもので、方法が侵襲的であるばかりでなく、移植片が胎児脳であることによる倫理的な問題や、移植片の分泌機能維持が持続的にできないなどの技術的な問題がある。われわれはこれまで、これと同様の効果を非侵襲的に、しかも自己の

microglia, astrocyte を高頻度磁気刺激により修飾することで供給できる可能性を検討してきた。神経損傷の後、神経組織の再生を促す遺伝子(NGFmRNA)発現を非侵襲的に、しかも持続的に自己の組織で修飾できれば、損傷部位の再構築のみならず、大脳の神経細胞死も同様に阻止でき、副作用なく良好な運動機能予後を期待できる。

本研究は、非侵襲的・高頻度磁気刺激が運動機能の再建を促す結果、有効な手段がないとされる脳梗塞後片麻痺の治療法に一石を投じることになる。さらに、これは、磁気刺激法があらゆる中枢神経損傷後の新しい治療法への開発・応用の可能性を示すことにもつながる非常に重要かつ画期的な研究となりうる。本研究のように非侵襲的刺激による遺伝子発現を治療に応用した基礎・臨床統合的研究は全く行われておらず、非常に独創的であり、臨床医学に密接した極めて重要な結果を提供するものと確信する。

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 34 件)

1. Murata K, Fujiki M, Ooba H, Kubo T, Morishige M, Abe T, Ishii K, Kobayashi H. Cognitive alteration after carotid revascularization is correlated with cortical GABA(B)-ergic modulations. Neurosci Lett. 査読有, 500:2011, 151-156

2. Fujiki M, Abe E, Nagai Y, Shiqi K, Kubo T, Ishii K, Abe T, Kobayashi H. Electroconvulsive seizure-induced VEGF is correlated with neuroprotective effects against cerebral infarction: Involvement of the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway. Exp Neurol. 査読有, 225:2010, 377-383

3. Abe E, Fujiki M, Nagai Y, Shiqi K, Kubo T, Ishii K, Abe T, Kobayashi H. The phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway mediates geranylgeranylacetone-induced neuroprotection against cerebral infarction in rats. Brain Res. 査読有, 1330:2010, 151-157

[学会発表] (計 88 件)

藤木 稔, 頸動脈ステント設置術前後の高

次脳機能変化は大脳皮質 GABAB-ergic 変化に相関する, 日本脳神経外科学会シンポジウム 2011. 10. 12, 横浜 ほか

[図書] (計 5 件)

藤木 稔, 前頭葉・頭頂葉: 手術計画に必要な機能検査, 片山容一編, 図説脳神経外科 新シリーズ, メジカルビュー社, 東京, 2010, pp98-105 ほか

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: 磁気刺激コイル

発明者: 藤木 稔

権利者: 大分大学

種類:

番号: 特願第 2011-139748 号

出願年月日: 平成 23 年 6 月 18 日

国内外の別: 国内

名称: 脳神経外科術中運動野同定・機能的ナビゲーションシステム

発明者: 藤木 稔

権利者: 大分大学

種類:

番号: 特願 2009-303696 号

出願年月日: 平成 21 年 10 月 25 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.oita-u.ac.jp/neurosurgery/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤木 稔 (FUJIKI MINORU)

大分大学・医学部・教授

研究者番号: 90231563

(2) 研究分担者

肥川 誉慎 (HIKAWA TAKAMITSU)

大分大学・医学部・講師

研究者番号：20238257

久保 毅 (KUBO TAKESHI)
大分大学・医学部・助教
研究者番号：80404375

大場 寛 (OOBA HIROSHI)
大分大学・医学部・助教
研究者番号：20398259

阿部 竜也 (ABE TATSUYA)
大分大学・医学部・准教授
研究者番号：20398259

(3)連携研究者
なし