

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670036

研究課題名(和文) 脳血管障害治療薬開発に資する蛍光イメージングを用いた新規薬効評価法の確立

研究課題名(英文) Establishment of hypoxia-induced brain ischemia-reperfusion model in zebrafish larvae

研究代表者

赤池 昭紀(Akaike, Akinori)

京都大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：80135558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：脳血管疾患は日本人の死因の上位に位置するが、その病態の解明ならびに治療薬の開発が十分であるとは言いがたく、予防・治療薬の開発が渴望されている。本研究では、ゼブラフィッシュを用いて脳血管障害治療薬開発に資する新規薬効評価法の開発を目指す。ゼブラフィッシュの稚魚に低酸素負荷-再酸素化を行うことで、脳における虚血-再灌流が可能であること、さらにそれに伴って脳において細胞死が惹起されることを明らかにし、本モデルが哺乳類の脳虚血-再灌流モデルと類似した性質を有していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Although cerebrovascular disease is one of the major causes of death in Japan, the understanding of pathology and development of the therapeutic agents for this disease have been craving. In this study, we aim to develop new drug evaluation methods that contribute to the development of therapeutic drugs using zebrafish. Hypoxia-reoxygenation treatment induced ischemia-reperfusion in the brain of zebrafish larvae. Cell death in both head and trunk was induced by hypoxia-reoxygenation treatment. These results suggest that hypoxia-reoxygenation induces ischemia-reperfusion and cell death in zebrafish brain.

研究分野：神経薬理学

キーワード：脳血管疾患 ゼブラフィッシュ 蛍光イメージング

1. 研究開始当初の背景

脳血管疾患は日本人の死因の上位に位置し、そのうちの大部分を脳梗塞が占めている。近年、死亡率は減少しているが、予後が不良で、後遺症が残る場合が多く見られる。また、脳梗塞においては虚血時に加え、血流の再灌流後の障害も病態形成に重要であることが知られており、後遺症との関連も示唆されている。このような社会的背景からその病態をより詳細に明らかにすること、さらに予防・治療薬の開発が渴望されている。

脳血管疾患の病態解明に資する疾患モデルとしては、これまでにラットやマウスなどのげっ歯類を用いて脳虚血モデルが多数確立されてきているが、これらの動物は体が大きいため脳全体における血管と実質細胞の損傷を同時にリアルタイムで観察する疾患モデルは未だ開発されていない。本研究では、ゼブラフィッシュを用いた新規実験系が開発することで、脳虚血時の脳血管内皮細胞と脳実質細胞の相互作用の解明がより前進すると期待できる。

これまでに申請者は、主にラット胎仔由来初代培養ニューロンを用いて脳疾患に有効な予防・治療薬の開発に資する検討を行い、セロフェンド酸などの神経保護作用を有する化合物を報告してきた(Kume et al. PNAS 2002)。さらに、その in vivo での有効性を検討する目的でラット中大脳動脈一過性閉塞モデルを用いて、脳血管障害に対しても障害抑制作用を有することを報告してきた(Nakamura et al. EJP 2008, Ioroi et al. Brain Res 2013)。しかし、脳内における神経保護を達成するには、神経細胞のみへの薬効だけでなく、薬物の動態や障害の伝搬などの観点から神経-血管ネットワーク損傷の抑制がより重要であると考え、神経-血管ネットワークの損傷を同時にリアルタイムに観察し、かつ薬効評価が可能な実験系の確立が必須であるとの着想に至った。

申請者は、これまでにゼブラフィッシュを用いたイメージング研究で低酸素を負荷することにより、体幹血流よりも脳血流の減少がより早く見られることを報告した(Sawahata et al. 18th JMZM, 2012)。さらにゼブラフィッシュを用いて脳血管の特定の部位の血流をレーザー照射により停止させる条件を得ており、本手法を血管系および神経系が蛍光標識されたトランスジェニックゼブラフィッシュに応用することで脳実質細胞と脳血管内皮細胞の両者の損傷のリアルタイム観察が可能になると考えている。

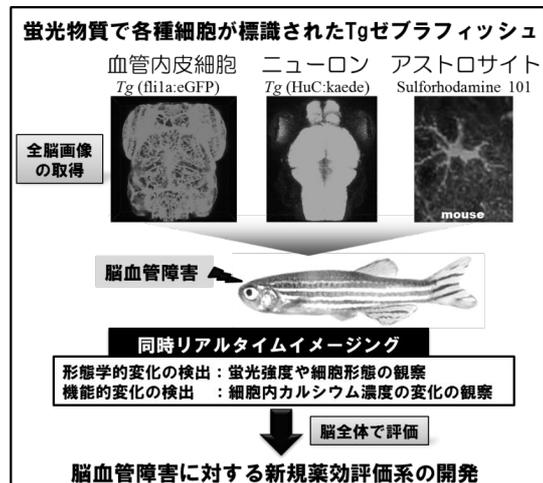
2. 研究の目的

脳梗塞などの脳血管疾患発症時には血管系と神経系の両方の細胞が損傷され、病態の進行を促進すると考えられる。脳血管疾患の病態解明に資する疾患モデルとしては、主にげっ歯類を用いて脳虚血モデルが多数確立

されているが、脳実質細胞および脳血管損傷を同時に観察した研究はほとんど行われていない。さらに、治療薬開発においても脳実質細胞(神経細胞、グリア細胞)のみをターゲットとした研究が大部分を占めている。本研究では、下記2項目を柱とした研究を実施する。

- (1) 脳血管-脳実質細胞の損傷を同時にリアルタイムに観察する新規実験系の開発
- (2) 新規実験系の薬効評価系としての有用性の解析

本研究の遂行により、従来の血管系の細胞・神経系の細胞のみを標的とした方法とは異なり、両者の相互作用を考慮した薬効評価が可能になり、新たな脳血管疾患の治療薬開発に貢献することが期待される。



3. 研究の方法

血管内皮細胞ならびに血球の可視化を実現するため、fli1a プロモーターを用いて血管内皮細胞に eGFP、gata1 プロモーターを用いて赤血球前駆細胞に mRFP を発現させたトランスジェニックゼブラフィッシュを用いた。

実験には受精後 4-5 日目の稚魚を用いた。窒素で 15 分間バブリングした飼育水中にゼブラフィッシュを入れることにより低酸素負荷を行った。また、観察時は窒素を還流したチャンバー内で低酸素状態を維持した。0.01%トリカイン/1%低融点アガロースまたは 2%低融点アガロースで稚魚を包埋した後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

細胞死は 0.01 mg/ml のアクリジンオレンジ含有飼育水中で 30 分間インキュベートすることにより検出し、染色法を用い、緑色の蛍光をもった細胞を細胞死陽性とした。

4. 研究成果

ゼブラフィッシュの稚魚の全身に低酸素負荷を行うことで、一定時間後に全身の血流が停止し、虚血状態が惹起された。臓器ごとの血流について検討する目的で、脳内の血管である Middle Mesencephalic Central Artery (MMCtA) と体幹部血管の Dorsal Aorta(DA) に着目して検討を行ったところ、MMCtA は DA

に先行して血流が停止した。これらの結果より、ゼブラフィッシュの稚魚へ低酸素負荷を行うことで体幹の血流を停止させずに、脳の血流を停止させることが可能であることを示した。次に、低酸素負荷後に、通常の飼育水に戻すことで再酸素化を行い、脳血流への影響を検討した。再酸素化を行うことで脳内血管の一部において再還流を行う事ができた。低酸素負荷によって、血流が停止した後、再酸素化を行い、さらにその 24 時間において細胞死が惹起されることが示唆された。次に、低酸素負荷が神経活動と血流に与える影響を同時に可視化するため、神経細胞に GCaMP、赤血球に mRFP を発現させた稚魚で経時的に観察を行った。すると、低酸素負荷による血流停止に先行して、GCaMP の輝度が上昇することが明らかとなった。また低酸素負荷・再酸素化後 24 時間において脳内で細胞死が観察された。

以上の結果より、ゼブラフィッシュの稚魚に低酸素負荷 再酸素化を行うことで、脳における虚血 再灌流が可能であること、さらにそれに伴って脳において細胞死が惹起されることを明らかにした。

次に、ゼブラフィッシュへの低酸素 - 再酸素処置が、脳虚血 - 再灌流モデルとしての妥当性を有するかについて、脳内のニューロン死およびニューロンの細胞内カルシウム濃度の変化を指標に検討を行った。ゼブラフィッシュの稚魚に低酸素負荷を行い、その後再酸素化を行うことにより、24 時間後の脳内においてニューロン死が誘発された。また、その過程におけるニューロン内のカルシウム濃度を測定したところ、ニューロン活動の変化が観察された。さらに、この低酸素によるニューロン死は低温において減少し、高温において促進された。以上の結果は、げっ歯類における報告と一致しており、本実験モデルが哺乳類の脳虚血 - 再灌流モデルと類似した性質を有していることを示唆するものである。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

Fujimura K, Niidome T, Shinozuka Y, Izumi Y, Kihara T, Sugimoto H, Akaike A, Kume, T.、Integrin-associated protein promotes neuronal differentiation of neural stem/progenitor cells. PLoS One、査読有、10、2015、e0116741
DOI:10.1371/journal.pone.0116741

Irooi T, Akao M, Iguchi M, Kato M, Kimura T, Izumi Y, Akaike A, Kume T, Serofendic Acid Protects Against Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury in Rats.、J Pharmacol Sci、査読有、126、201、274-280
DOI:10.1254/jphs.14139FP

赤池昭紀、知的創造サイクルの産学循環モデルの戦略的構築-東海地区創薬情報

コンソーシアムの取り組み-、日薬理誌、査読有、第143巻5号、2014、254-259

DOI:なし

Izumi Y, Ezumi M, Takada-Takatori Y, Akaike A, Kume T, Endogenous dopamine is involved in the herbicide paraquat-induced dopaminergic cell death.、Toxicol Sci、査読有、139、2014、466-478

DOI:10.1093/toxsci/kfu054

Nazari QA, Takada-Takatori Y, Hashimoto T, Imaizumi A, Izumi Y, Akaike A, Kume T, Potential protective effect of highly bioavailable curcumin on an oxidative stress model induced by microinjection of sodium nitroprusside in mice brain.、Food Funct、査読有、5、2014、984-989

DOI:10.1039/c4fo00009a.

Wakita S, Izumi Y, Nakai T, Adachi K, Takada-Takatori Y, Kume T, Akaike A, Staurosporine induces dopaminergic neurite outgrowth through AMP-activated protein kinase/mammalian target of rapamycin signaling pathway.、Neuropharmacology、査読有、77、2013、39-48

DOI:pii: S0028-3908(13)00419-X.
10.1016/j.neuropharm.

Irooi T, Taguchi K, Izumi Y, Takada-Takatori Y, Akaike A, Kume, T, Protective effect of serofendic acid, administered intravenously, on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats.、Brain Res、査読有、1532、2013、99-105

DOI: 10.1016/j.brainres.2013.08.013.

Nazari QA, Kume T, Izuo N, Takada-Takatori Y, Imaizumi A, Hashimoto T, Izumi Y, Akaike A, Neuroprotective effects of curcumin and highly bioavailable curcumin on oxidative stress induced by sodium nitroprusside in rat striatal cell culture.、Biol Pharm Bull、査読有、36、2013、1356-1362

DOI:

<http://dx.doi.org/10.1248/bpb.b13-00300>

Izuo N, Murakami K, Sato M, Iwasaki M, Izumi Y, Shimizu T, Akaike A, Irie K, Kume, T, Non-toxic conformer of amyloid β may suppress amyloid β -induced toxicity in rat primary neurons: implications for a novel therapeutic strategy for Alzheimer's disease.、Biochem Biophys Res Commun、査読有、438、2013、1-5

DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.05.106.

Nazari QA, Kume T, Takada-Takatori Y, Izumi Y, Akaike A, Protective Effect of Luteolin on an Oxidative-Stress Model Induced by Microinjection of Sodium Nitroprusside in Mice.、J Pharmacol Sci、査読有、122、2013、109 - 117

DOI: 10.1254/jphs.13019FP

[学会発表](計 23 件)

2015年3月27日 日本薬学会第135年会
神戸学院大学・兵庫医療大学(兵庫県)
低酸素負荷によるゼブラフィッシュ脳梗
塞モデルの確立

久米利明、澤幡雅仁、泉安彦、赤池昭紀
2015年3月27日 日本薬学会第135年会
神戸学院大学・兵庫医療大学(兵庫県)
SP 養成・PBL チュートリアル教育プロ
グラム及び高度医療人養成・レギュラト
リサイエンスプログラム

入江徹美、新田淳美、山下富義、栄田敏
之、高倉喜信、赤池昭紀

2015年3月20日 第88回日本薬理学会年
会 名古屋国際会議場(愛知県)

ドパミンニューロンによる線条体神経支
配におけるインテグリンの関与：神経投
射再生の可能性

泉安彦、神原知里、脇田誓子、中井利、
赤池昭紀、久米利明

2015年3月19日 第88回日本薬理学会年
会 名古屋国際会議場(愛知県)

シソ由来カルコンDDC の -synuclein
凝集抑制作用

近藤直人、泉安彦、赤池昭紀、久米利明

2015年3月18日 第88回日本薬理学会年
会 名古屋国際会議場(愛知県)(招待)

イントロダクション：創薬におけるオー
プンイノベーションの推進

赤池昭紀

2015年3月18日 第88回日本薬理学会年
会 名古屋国際会議場(愛知県)

低酸素負荷によって誘発されるゼブラフ
ィッシュの脳虚血再灌流障害

澤幡雅仁、武政翔大、川本雄士、泉安彦、
赤池昭紀、久米利明

2014年11月23日 第76回九州山口薬学大
会 長崎ブリックホール(長崎県)(招
待)

改訂された薬学教育モデル・コアカリキ
ュラム(新コアカリ)の基本方針と概要

赤池昭紀

2014年11月9日 日本病院薬剤師会東海
ブロック・日本薬学会東海支部合同学術
大会2014(第24回日本病院薬剤師会東海
ブロック学術大会・平成26年度日本薬学
会東海支部例会) 静岡県立大学(静岡
県)(招待)

シソ由来カルコン誘導体の細胞保護作用
赤池昭紀、久米利明、泉安彦

2014年10月24日 第126回日本薬理学会
近畿部会 和歌山県JAビル(和歌山県)

ドパミン神経突起はインテグリン 5を
介して線条体ニューロンに沿って伸長す
る

泉安彦、神原知里、脇田誓子、赤池昭紀、
久米利明

2014年10月5日 16th International
Society of Addiction Medicine Annual

Meeting. 2014 パシフィコ横浜会議セ
ンター(神奈川県)

Neuroprotective signaling pathway via
nicotinic receptors.

Kume, T. and Akaike, A.

2014年9月20日 the 20th Japanese
Medaka and Zebrafish Meeting, Tokyo,
Japan. 2014 慶応義塾大学薬学部(東京
都)

Hypoxia-induced brain
ischemia-reperfusion model in
zebrafish larvae.

Sawahata, M., Takemasa, S.,
Kawamoto, T., Izumi, Y., Akaike, A. and
Kume, T.

2014年9月13日 第37回日本神経科学大
会 Neuroscience2014 パシフィコ横浜
(神奈川県)

中脳細胞に発現するインテグリン 5が
ドパミンニューロンによる線条体神経支
配に重要である

神原知里、泉安彦、脇田誓子、足立佳奈
美、中井利恵、赤池昭紀、久米利明

2014年9月12日 第37回日本神経科学大
会 Neuroscience2014 パシフィコ横浜
(神奈川県)

V-1遺伝子によるアクチン重合依存的な
黒質線条体ドパミン生合成酵素群の統合
的新規発現制御機構

川畑伊知郎、延新来、大宅史織、森田淳
一、加藤茂樹、富岡佳久、田淵明子、福
地守、津田正明、一瀬 - 鷲見千穂、近藤
一直、泉安彦、久米利明、赤池昭紀、大
橋一正、水野健作、一瀬宏、小林和人、
山国 徹

2014年9月9日 新ヘルスケア産業参入支
援セミナー 名古屋医工連携インキュベ
ータ(愛知県)(招待)

iPS細胞網膜再生産業化支援プロジェク
ト

赤池昭紀

2014年8月30日 次世代を担う創薬・医療
薬理シンポジウム2014 近畿大学・東大
阪キャンパス(大阪府)

青じそ由来化合物DDC のA 誘発神経毒
性に対する保護作用

岩崎真実、泉安彦、村上一馬、入江一浩、
赤池昭紀、久米利明

2014年8月28日 生体機能と創薬シンポ
ジウム2014 近畿大学薬学部(大阪府)

ゼブラフィッシュを用いた低酸素負荷に
よる脳虚血・再灌流モデルの確立

澤幡雅仁、武政翔大、川本雄士、泉安彦、
赤池昭紀、久米利明

2014年7月15日 公益財団法人喫煙科学
研究財団 第29回平成25年度助成研究発
表会 京王プラザホテル(東京都)

ニューロン保護・新生におけるニコチン
受容体シグナルの役割の解明

赤池昭紀、久米利明、泉安彦、高鳥悠記

2014年6月20日 第125回日本薬理学会
近畿部会 岡山コンベンションセンター
(岡山県)

化合物ライブラリーからのNrf2-ARE経路
活性化物質の探索

片岡春恵、泉安彦、赤池昭紀、久米利明
2014年3月28日 日本薬学会第134年会
ホテル日航熊本、他(熊本)

中脳ドパミンニューロンによる *in vitro*
線条体神経支配における中脳選択的イン
テグリン 5ノックダウンの影響

泉安彦、神原知里、脇田誓子、中井利恵、
足立佳奈美、赤池昭紀、久米利明

2013年9月21日 19th Japanese Medaka
and Zebrafish Meeting Sendai City
Information & Industry Plaza, AER
building 5F Sendai

Different effects of acetylcholinesterase
inhibitors on the locomotor activity in
zebrafish larvae.

Sawahata, M., Taguchi, K., Izumi, Y., Akaike,
A. and Kume, T.

212013年6月21日 Neuro2013 第36回日本神
経科学大会 第56回日本神経化学会大会

第23回日本神経回路学会大会 合同大会
国立京都国際会館(京都)

ドパミンニューロンによる線条体ニュー
ロンの神経支配におけるインテグリン 5
1の関与

泉安彦、脇田誓子、神原知里、中井利恵、
久米利明、赤池昭紀

222013年6月20日 Neuro2013 第36回日本神
経科学大会 第56回日本神経化学会
大会

第23回日本神経回路学会大会 合同大会
国立京都国際会館(京都)

ニコチン受容体刺激のドーパミン神経保
護に関するオートファジーの関与の検討

竹内啓喜、泉安彦、澤田秀幸、赤池昭紀、
下濱俊、高橋良輔

23 2013年5月8日 日本薬学会東海支部特別
講演会 名古屋市立大学(名古屋)(招待)

眼薬理学-網膜の保護と再生-
赤池昭紀

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤池 昭紀 (AKAIKE, Akinori)

京都大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号： 80135558

(2) 研究分担者

泉 安彦 (IZUMI, Yasuhiko)

京都大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号： 60456837