

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：82502

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861028

研究課題名(和文)マウスの慢性低灌流による神経機能と酸素代謝への影響に関する研究

研究課題名(英文)Chronic effects of cerebral hypoperfusion on neural density and function using misery perfusion animal model

研究代表者

田桑 弘之(Takuwa, Hiroyuki)

国立研究開発法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・研究員

研究者番号：40508347

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：研究の第一段階として、片側の総頸動脈結紮による慢性低灌流モデルマウスの立ち上げを行い、二光子顕微鏡による脳血管構造の経時変化を測定した。慢性低灌流下において、細動脈および毛細血管での顕著な血管拡張が観察された。さらに細動脈においてCO₂吸入負荷時の脳血管反応性に伴う血管拡張率を測定し、慢性低灌流後の血管拡張率と比較した結果、両者に負の相関関係があることが示された。次に、[¹¹C]flumazenil-PETおよびMRIにより神経脱落及び脳萎縮を評価したが、それぞれ有意な変化はなかった。一方で、慢性低灌流後1ヶ月において脳賦活時の神経機能低下を示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the effects of chronic cerebral hypoperfusion on brain induced by a unilateral common carotid artery occlusion (UCCA0). As the first step of this study, we developed a misery perfusion mouse model using UCCA0 and measured autoregulatory vasodilation with two-photon microscopy. The diameter of arterioles and capillaries during the resting state were increased 7 days after UCCA0. After UCCA0, autoregulatory vasodilation of arterioles during normocapnia was negatively correlated with a vasodilation during hypercapnia. The second step of this study was to investigate the chronic effects of cerebral hypoperfusion on neuronal density and functional hyperemia. Neuronal density evaluated 28 days after UCCA0 using [¹¹C]flumazenil-PET and histology indicated no neurologic deficit in brain. Functional hyperemia induced by sensory stimulation was assessed using laser-Doppler flowmetry and became worse 28 days after UCCA0.

研究分野：神経生理学 核医学

キーワード：慢性低灌流 脳卒中 モデル動物 二光子励起レーザー顕微鏡 小動物PET

1. 研究開始当初の背景

脳主幹動脈狭窄・閉塞に伴う血行力学的虚血は、主に PET、SPECT 検査により調べられており、脳血流量低下、脳血液量増加、酸素摂取率増加を伴う「Misery perfusion」と呼ばれる状況を引き起こす。この時、PET、SPECT 検査において慢性低灌流における酸素代謝量は維持されるが、PET、SPECT 検査では測定不可能なミクロなレベルにおいても神経活動とそれに伴う酸素代謝が維持されているかは不明である。近年、慢性低灌流モデル動物による実験で、術後の白質病変やアストロサイトなどの活性化と学習機能障害が報告されている。それらの研究報告は、慢性低灌流下の脳内の局所的な神経・酸素代謝に障害が生じている可能性を示唆するが、神経生理学的な検証は十分には行われていない。

2. 研究の目的

本研究は、慢性低灌流下の脳内のミクロレベルでの影響を明らかにすることを目的とした。研究の第一段階として、慢性低灌流モデルマウスの立ち上げを行った。特に慢性低灌流下での脳血管ネットワーク構造および神経細胞機能などの微細環境で生じている疾患症状を二光子励起レーザー顕微鏡等により評価した。これにより、長期的な灌流圧の低下が脳血管構造の変化および神経脱落、神経機能障害などへの影響を調査した。

3. 研究の方法

慢性低灌流を再現するために、片側総頸動脈の永久結紮を行った。生体光イメージングでの評価のために、マウスの頭部に頭

蓋窓（頭蓋骨に直径 3 mm の穴をあけ、穴の上にスライドガラスを設置する）を右左の大脳半球に各 1 つ（健側と患側）設置した。この頭蓋窓は、脳組織を 3 月間以上安定してイメージング可能な測定環境を保持できる。総頸動脈結紮前後で健側と患側より安静時の脳血流、神経活動を測定し、左右の比を求める。同様の方法で、感覚刺激による脳賦活時の測定も行った。動物用 PET (^{11}C Flumazenil (FMZ) PET) を用いて神経細胞分布密度を測定した。MRI による脳萎縮の評価や免疫染色法による神経細胞分布の評価も行った。これらの評価系を元に、長期間の灌流圧の低下により神経細胞数および神経活動量が維持されるのか、または徐々に低下していくのか、その経時的変化を明らかにすることで、慢性低灌流の病態メカニズムを明らかにする。

4. 研究成果

ヒトの SPECT 検査において Misery perfusion であることを示すために、循環予備能の指標としての CO_2 吸入負荷脳血流上昇率が測定されているが、これは循環予備能と脳血管反応性は同じ血管部位が拡張する事を前提としている。我々は、片側総頸動脈を結紮したマウスの脳内の動脈、毛細血管、静脈の血管径を二光子励起レーザー顕微鏡（二光子顕微鏡）により直接可視化し（図 1）、実際の循環予備能としての血管拡張部位と CO_2 吸入負荷時の血管拡張部位が一致する事を明らかにし、Misery perfusion における CO_2 吸入負荷による血管反応性が循環予備能を反映していることを示した（図 2）。

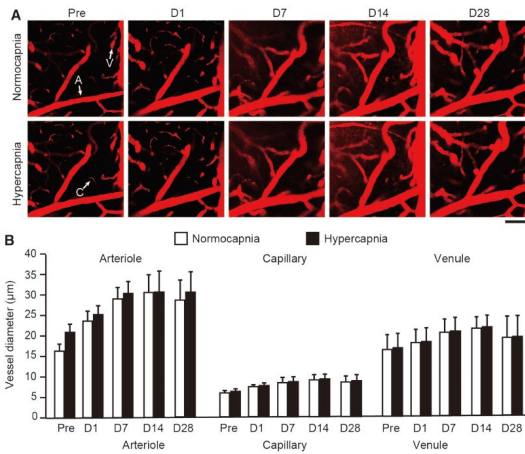


図1 慢性低灌流と Hypercapnia の処置前後での脳血管拡張を示す画像 (A) と血管径 (B) (Tajima et al., 2014 JCBFM)

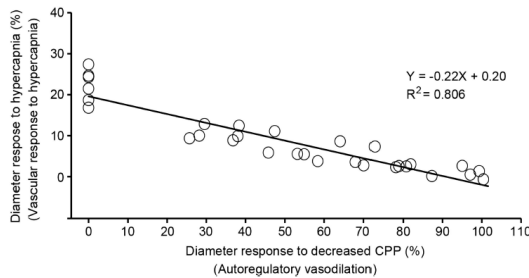


図2 慢性低灌流と Hypercapnia の処置前後での脳血管拡張率の比較 (Tajima et al., 2014 JCBFM)。

次に、慢性低灌流モデルマウスを用いて $[^{11}\text{C}]$ FMZ-PET によるベンゾジアゼピン受容体 (BZR) 密度変化の測定を行い、神経細胞分布密度の変化を評価した。その結果、神経脱落 (BZR 密度の低下) は認められなかった (図3)。MRI による脳体積測定においても、脳萎縮は見られなかった。

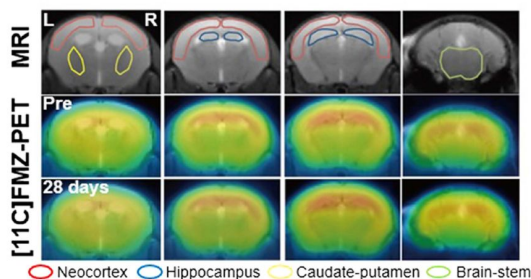


図3 $[^{11}\text{C}]$ Flumazenil (FMZ) PET (Nishino et al., 2016 Scientific reports)。

慢性低灌流による脳機能への影響を評価するために、片側総頸動脈結紮前と術後 1、7、14、28 日においてレーザー Doppler 血流計 (LDF) による賦活時の脳血流変化率を評価した。LDF による賦活時の脳血流変化率は患側で術後低く、脳血管反応性が低下した (図4)。

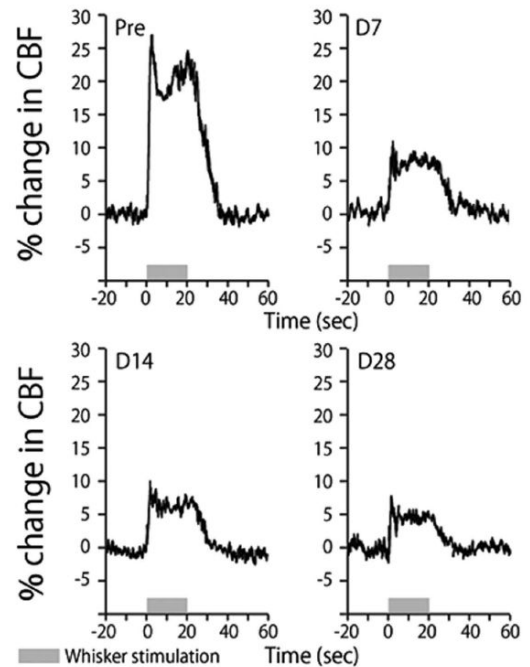


図4 慢性低灌流後に見られる賦活脳血管反応性 (LDF で測定) の低下 (Nishino et al., 2016 Scientific reports)。

これらの結果から、慢性低灌流モデルマウスにおいて BZR 結合の結果より神経細胞は維持されているが、LDF の結果より脳神経機能の低下することが示された。

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 6件)

Nishino A, Tajima T, Takuwa H (責任著者), Masamoto K, Taniguchi J, Wakizaka H, Kokuryo D, Urushihata U,

Aoki I, Kanno I, Tomita Y, Suzuki N, Ikoma Y, Hiroshi I, (2016) Long-term effects of cerebral hypoperfusion on neural density and function using animal model of misery perfusion. Sci Rep. 6:25072 査読有

Takuwa H (責任著者), Maeda J, Ikoma Y, Tokunaga M, Wakizaka H, Uchida S, Kanno I, Taniguchi J, Ito H, Higuchi M. [11C]Raclopride binding in the striatum of minimally restrained and free-walking awake mice in a positron emission tomography study. Synapse. 2015 Dec;69(12):600-6. 査読有

Nishino A, **Takuwa H (責任著者)**, Urushihata T, Ito H, Ikoma Y, Matsuura T (2015) Vasodilation Mechanism of Cerebral Microvessels Induced by Neural Activation under High Baseline Cerebral Blood Flow Level Results from Hypercapnia in Awake Mice. Microcirculation. Nov;22(8) 査読有

Takuwa H, Matsuura T, Nishino A, Sakata K, Tajima Y, Ito H, (2014) Development of new optical imaging systems of oxygen metabolism and simultaneous measurement in hemodynamic changes using awake mice. J Neurosci Methods. 237:9-15.

Tajima Y, **Takuwa H**, Kokuryo D, Kawaguchi H, Seki C, Masamoto K, Ikoma Y, Taniguchi J, Aoki I, Tomita Y, Suzuki N, Kanno I, Saeki N, Ito H.(2014) Changes in cortical microvasculature during misery perfusion measured by two-photon

laser scanning microscopy.J Cereb Blood Flow Metab. 34:1363-1372.

Sekiguchi Y, **Takuwa H**, Kawaguchi H, Kikuchi T, Okada E, Kanno I, Ito H, Tomita Y, Itoh Y, Suzuki N, Sudo R, Tanishita K, Masamoto K.(2014) Pial arteries respond earlier than penetrating arterioles to neural activation in the somatosensory cortex in awake mice exposed to chronic hypoxia: an additional mechanism to proximal integration signaling? J Cereb Blood Flow Metab. 34:1761-70.

[学会発表](計4件)

田桑弘之(招待講演)「PET技術と生体光イメージング技術の融合と脳疾患研究」JAEA放射光科学シンポジウム2016年2月

田桑弘之、田島洋佑、川口拓之、谷口順子、正本和人、菅野巖、伊藤浩、「Diameter change of cerebral blood vessel in crossed cerebellar diaschisis measured by two-photon microscopy in awake mice」Brain '15 & BrainPET '15、Vancouver、Canada、2015年6月

田桑弘之(招待講演)「覚醒マウスの脳機能におけるマルチモダルイメージング Multi-modal imaging of brain functions for awake mice.」日本光学会年次学術講演会(OPJ2014)、東京、2014年11月

田桑弘之、西野明日香、松浦哲也、坂田和美、田島洋佑、伊藤浩「Newly optical imaging systems of change in oxygen metabolism and hemodynamic using awake mice brain」、Neuroscience 2014、横浜、2014年9月

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

田桑弘之(Hiroyuki Takuwa)

放射線医学総合研究所 分子イメージング研究センター 研究員

研究者番号：40508347

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：