

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861150

研究課題名(和文)脳梗塞の予後進展に及ぼす性差及びオキシトシンの影響

研究課題名(英文)Expression of oxytocin receptor in a rat stroke model

研究代表者

杉本 香奈 (Sugimoto, Kana)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：00581034

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、脳梗塞の病態進行に及ぼすオキシトシンの効果を検討するために、脳梗塞モデルラットを用いて脳梗塞後におけるオキシトシン受容体(OXTR)の発現変化を解析した。ラットの脳を、施術6時間～7日後に摘出し、梗塞巣、その周辺領域、正常領域を回収し、OXTR mRNAの発現量を解析した。その結果、施術1日後の梗塞巣周辺領域においてOXTR mRNAの発現が上昇した。更に、これらの発現上昇は前頭葉の梗塞巣周辺領域で著しく高いことが分かった。以上より、OXTRは脳梗塞後特定の期間に梗塞巣周辺領域で発現が亢進することが分かった。これらの結果をもとに、オキシトシンを脳梗塞の治療に結びつける予定である。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we evaluated the spatial and time-dependent changes of oxytocin receptor (OXTR) expression on a transient middle cerebral artery occlusion model of rats. Tissues from the cerebral cortex representing the three regions: the ischemic core, the peri-infarct tissue and the contralateral cortex were dissected out at 0.25-7 days postreperfusion (dpr). OXTR mRNA expression peaked at 1 dpr in the peri-infarct tissue. Additionally, in situ hybridization analyses of rat ischemic brain at 1 dpr showed upregulation of OXTR mRNAs in the right cerebrum without ischemic core, especially in the cingulate cortex, piriform cortex and anterior olfactory area. One-dpr expression of OXTR mRNA in this study may be critical for better prognosis following stroke to rescue damaged cells in this region during the subacute phase, leading to be the most effective for neural damage to treat oxytocin within 1 day of stroke onset.

研究分野：医歯薬学

キーワード：脳梗塞 オキシトシン受容体 オキシトシン

1. 研究開始当初の背景

オキシトシンは視床下部で合成され、下垂体後葉に輸送後、血液中に分泌される。妊娠や出産・授乳にともなう女性の変化と関連して性特異的に作動するホルモンとして知られてきた。最近では男性にも普遍的に存在していることが判明している。一方、脳内に直接分泌(投射)されたオキシトシンは、オキシトシン受容体(OXTR)を発現するニューロンに働きかける。

多目的コホート研究で、ソーシャルサポートが低い男性患者では脳梗塞後の死亡率が増加することが明らかになった(Ikeda et al. Stroke, 2008)。また、ソーシャルサポートにより、有意に脳内オキシトシン濃度が増加すると報告された(Karelina et al. Stroke, 2011)。オキシトシンが心臓や肝臓の虚血モデルにおいて組織のダメージを軽減するという報告がされている(Houshmand et al. Peptides, 2009; Dusunceli et al. Peptides, 2008)。

以上より、脳梗塞の発症率の違いやその予後においてオキシトシンが関与する可能性はある。しかしながら、オキシトシンの脳梗塞に及ぼす影響の分子機構については明らかにされていない。

2. 研究の目的

オキシトシンが脳梗塞の発症率および病態進行に及ぼす影響の分子メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

(1) 一過性中大脳動脈閉塞術 (tMCAO)

動物実験は大阪大学医学部動物実験のガイドラインに沿って実施した。7-8 週齢の雄 Wistar ラットの中大脳動脈を 90 分間遮断し、その後再灌流することにより、脳梗塞モデルラットを作成した。

(2) リアルタイム PCR

tMCAO 後 0-7 日目に脳を摘出し、2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) 染色を用いて梗塞巣・梗塞巣周辺の半球・反対側の正常領域を判別した。各領域を採取し、cDNA 合成を行った。その後、リアルタイム PCR を用いて OXTR mRNA の発現量を測定した。

(3) *in situ* hybridization

tMCAO 後の翌日に脳を摘出し、ドライアイスを用いて急速凍結を行った。凍結切片を作成し、digoxigenin (DIG)-labeled RNA probe と反応させた。その後、オールインワン蛍光顕

微鏡を用いて観察した。

(4) 統計処理

統計処理は InStat3 ソフトウェアを用いて、one-way analysis of variance (ANOVA) と Tukey's post hoc test で評価した。

4. 研究成果

(1) 脳梗塞発症後におけるオキシトシン受容体の発現変動

tMCAO の 6 時間、1-7 日後に脳を摘出し、前頭極から 4-6 mm 後方の位置で脳をスライスし、TTC 染色を行った。その後、梗塞巣(core)・梗塞巣周辺の半球(peri)・反対側の正常領域(contra)をそれぞれ採取し、OXTR mRNA の発現変動を測定した。その結果、tMCAO 翌日の梗塞巣周辺領域で OXTR mRNA の発現が有意に増加していることがわかった(図 1)。

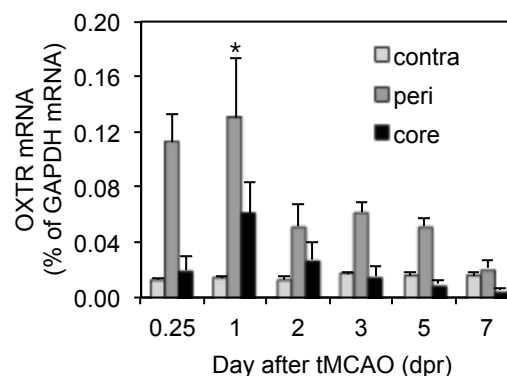


図 1. 脳梗塞発症後における OXTR mRNA の発現変動
core は梗塞巣、peri は梗塞巣周辺の半球、contra は反対側の正常領域を示す。OXTR mRNA が tMCAO 後翌日の梗塞巣周辺領域で増加していた。

* $p < 0.05$ vs. 7 dpr. (n=3)

(2) 脳梗塞発症翌日におけるオキシトシン受容体の空間的発現変動

OXTR mRNA の発現上昇が認められた tMCAO 翌日の脳を摘出し、前頭極から 3 mm ずつ大脳をスライスした。TTC 染色を用いて梗塞巣・梗塞巣周辺の半球・反対側の正常領域をそれぞれ採取し、OXTR mRNA の発現分布を測定した。その結果、前頭極から 0-3 mm の梗塞巣周辺領域において OXTR mRNA の発現が非常に高いことがわかった(図 2)。

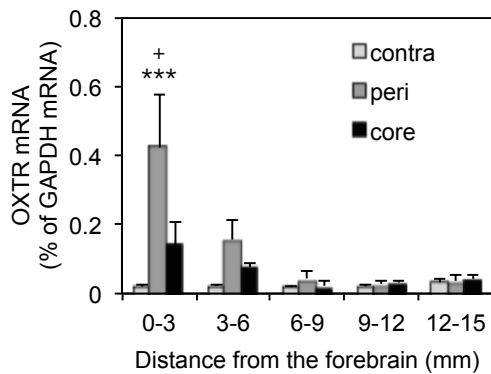


図2. 脳梗塞発症翌日におけるOXTR mRNAの発現分布
前頭極から0-3 mmの梗塞巣周辺領域でOXTR mRNAの発現が高かった。
+ $p < 0.05$ vs. 3-6 mm. *** $p < 0.001$ vs. 6-9, 9-12 and 12-15 mm. (n=3)

(3) 脳梗塞発症翌日におけるオキシトシン受容体の空間的発現変動

OXTR mRNAの発現上昇が認められたtMCAO翌日の脳を摘出し、ドライアイスを用いて急速凍結した。その後、DIG-labeled antisense RNA probeと反応させた。その結果、前頭の梗塞巣周辺の半球、特に帯状皮質や梨状葉皮質においてOXTR mRNAの発現が高いことがわかった(図3)。一方、DIG-labeled sense RNA probeではOXTR mRNAは検出されなかった。

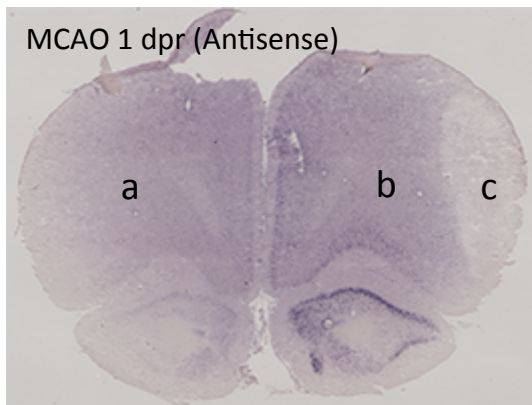


図3. *In situ* hybridizationを用いた脳梗塞発症翌日におけるOXTR mRNAの発現分布解析
前頭の梗塞巣周辺領域、特に帯状皮質や梨状葉皮質での発現が高かった。(a)は正常領域、(b)は梗塞巣周辺領域、(c)は梗塞巣。

以上の結果から、脳梗塞発症翌日の前頭の梗塞巣周辺領域においてオキシトシン受容体が多く発現していることがわかった。そのため、脳梗塞発症翌日までにオキシトシンを投与することにより、オキシトシンの神経保護作用が得られる可能性が示唆された。

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3件)

① Hiromi Higaki, Mohammed Emamussalehin Choudhury, Chisato Kawamoto, Keisuke Miyamoto, Afsana Islam, Yurika Ishii, Kazuya Miyanishi, Haruna Takeda, Naoto Seo, Kana Sugimoto, Hisaaki Takahashi, Hajime Yano, Junya Tanaka, The hypnotic bromovalerylurea ameliorates 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic neuron loss while suppressing expression of interferon regulatory factors by microglia, *Neurochemistry International*, 査読有, vol 99, 2016, 158-68
DOI:10.1016/j.neuint.2016.06.013

② Ryutaro Nishioka, Kana Sugimoto, Hitomi Aono, Ayano Mise, Mohammed E. Choudhury, Kazuya Miyanishi, Afsana Islam, Takahiro Fujita, Haruna Takeda, Hisaaki Takahashi, Hajime Yano, Junya Tanaka, Treadmill exercise ameliorates ischemia-induced brain edema while suppressing Na(+)/H(+) exchanger 1 expression, *Experimental Neurology*, 査読有, vol.277, 2016, 150-61
DOI:10.1016/j.expneurol.2015.12.016

③ Shirabe Matsumoto, Junya Tanaka, Hajime Yano, Hisaaki Takahashi, Kana Sugimoto, Shiro Ohue, Akihiro Inoue, Hitomi Aono, Akari Kusakawa, Hideaki Watanabe, Yoshiaki Kumon, Takanori Ohnishi, CD200+ and CD200- macrophages accumulated in ischemic lesions of rat brain: the two populations cannot be classified as either M1 or M2 macrophages, *Journal of Neuroimmunology*, 査読有, vol.282, 2015, 7-20
DOI:10.1016/j.jneuroim.2015.03.013

[学会発表] (計2件)

① Kana Sugimoto, Yuki Mori, Hidekazu Tanaka, Yuichiro Hirata, Yu Kamakura, Makiko Takahashi, Ryuichi Katada, Hiroshi Matsumoto, Expression of oxytocin receptor in ischemic lesions of rat brain: one protective mechanism of oxytocin for injured neurons, 第94回日本生理学会大会, 2017年3月28-30日, 浜松

- ② Kana Sugimoto, Yuki Mori, Hidekazu Tanaka, Yuichiro Hirata, Yu Kamakura, Ryuichi Katada, Hiroshi Matsumoto, Expression of oxytocin receptors in the peri-infarct tissue of rat brain: protection of oxytocin for injured neurons, 第 39 回日本神経科学大会, 2016 年 7 月 20-22 日, 横浜

[その他]

ホームページ等

<http://www.legal.med.osaka-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉本 香奈 (SUGIMOTO, Kana)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：00581034

(2) 連携研究者

森 勇樹 (MORI, Yuki)
大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任助教
研究者番号：26860996
(平成 27 年度より連携研究者)

田中 潤也 (TANAKA, Junya)
愛媛大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：70217040

松本 博志 (MATSUMOTO, Hiroshi)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：60263092