

令和元年5月16日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04844

研究課題名(和文) 遠隔虚血コンディショニングを応用した脳梗塞急性期治療手段の確立

研究課題名(英文) Remote limb ischemic conditioning for cerebral infarction

研究代表者

北川 一夫 (Kitagawa, Kazuo)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：70301257

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではマウス脳虚血モデルを用いて、MRIで撮影される超早期病変のサイズと脳表面軟膜動脈吻合血管サイズとの関係を明らかにした。すなわち側副血行が発達しているほどMRI早期虚血病変のサイズが縮小していた。また中大脳動脈閉塞中の下肢遠隔虚血負荷の反復は側副血行発達を促進し、再灌流24時間の脳梗塞サイズを縮小した。脳虚血重症度を規定する要因として脳軟膜動脈吻合発達程度の重要性が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳梗塞急性期治療は、アルテプラゼの普及、血栓回収療法の進歩で格段の進歩を遂げている。本研究は虚血性脳損傷に対する脳保護戦略を側副血行発達の観点からとらえ、その手法として遠隔虚血負荷を取り入れようとしている研究課題である。本手法が臨床的に確立されれば後遺症に苦しむ脳卒中患者を少なくできることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We have clarified close association between development of collateral vessels and early ischemic lesion size in MRI-DWI in murine focal cerebral ischemia model. As one of potential strategies, we focused on remote ischemic conditioning (RIC) in order to enhance collateral circulation. RIC during occlusion of middle cerebral artery enlarged the size of collateral vessels, and finally diminish infarct size 24 hours later after recirculation. We still need to find the most effective RIC strategy to show the brain protection, but RIC could be a potential therapeutic strategy for acute cerebral ischemia.

研究分野：脳神経内科学

キーワード：脳虚血 側副血行 遠隔虚血負荷

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳卒中は我が国の死因の第4位であり毎年12万人以上の方がなくなっている国民病であるが、その7割以上は虚血性脳卒中、脳梗塞である。脳梗塞急性期の治療手段としては血栓溶解療法、血管内治療が普及しつつあるが、適応患者は脳梗塞全体の5 - 10%程度とされ、またその有効性も限定的であり、あらたな治療手段の開発が望まれている。神経血管ユニット保護、抗炎症効果、細胞治療など脳保護を目指した取り組みが各種行われているが、主幹動脈閉塞に伴う側副血行発達を標的とした治療手段は開発されていない。

2. 研究の目的

本研究は、当該臓器すなわち心臓や脳以外の臓器、たとえば四肢に虚血負荷を加えて、心臓や脳に対する保護作用を有することが示されている遠隔虚血プレコンディショニング (RIC) を脳梗塞超急性期の側副血行発達促進手段として活用することを目指した研究である。

3. 研究の方法

1) マウス中大脳動脈閉塞モデルにおける脳MRI各強調画像でみられる早期虚血病変と脳軟膜動脈吻合発達の関係

成熟 C57BL/6 マウスを用いて左総頸動脈を結紮 (CCA0) し、7 または 14 日後に 7-0 ナイロン糸を挿入し 45 分間中大脳動脈 (MCA) を閉塞後再灌流した。MCA 閉塞 45 分後に小動物用 1T-MRI を用いて拡散強調画像を撮像後、墨汁ガラテックス混和液を左心室より注入し脳軟膜吻合血管径を計測した。対照群は前処置なしに MCA を閉塞した群 (Control 群) および左総頸動脈を露出する偽手術 14 日後に MCA を閉塞した群 (Sham-D14 群) とした。術中は体温を 37 °C に保ち MCA 閉塞中の脳皮質血流をレーザー Doppler 血流計でモニターした。

2) マウス中大脳動脈閉塞モデルにおける遠隔虚血負荷の脳梗塞縮小効果、脳軟膜動脈吻合発達に及ぼす影響

成熟 C57BL/6 マウスを用いて、イソフルレン吸入麻酔下に 6-0 ナイロン糸を総頸動脈より挿入、45 分間中大脳動脈を閉塞したのち再灌流し、24 時間後に神経症状を観察ののち脳を摘出し TTC 染色で脳梗塞体積を算出した。神経症状は既報に基づき 0 (症状無し) から 5 (死亡) の 6 段階で評価した。中大脳動脈閉塞、再灌流中の脳皮質血流をレーザー Doppler 血流計でモニターした。遠隔虚血負荷は両側下肢を鼠径部でポリエチレンチューブを用いて 5 分間駆血、5 分間解放を 4 回反復することにより行った。遠隔虚血負荷は脳虚血 24 時間前、脳虚血直前、脳虚血中、脳虚血再灌流直後に各々 10 匹ずつ行った。対照群では虚血中に両側下肢周囲にポリエチレンチューブを巻いた。なお虚血中、再開通 1 時間の体温を 37 °C に保った。

また別の動物を用いて対照群と脳虚血中遠隔虚血負荷群で、中大脳動脈閉塞 4 5 分直後に墨汁ガラテックス混和液を左心室より注入し脳軟膜吻合血管径を計測した。

4. 研究成果

1) マウス中大脳動脈閉塞モデルにおける脳MRI各強調画像でみられる早期虚血病変と脳軟膜動脈吻合発達の関係

中大脳動脈閉塞時の残存血流は、Control 群、CCA0-D7 群、CCA0-D14 群、Sham-D14 群において 26.2 ± 3.0 、 36.7 ± 11.1 、 46.8 ± 11.3 、 21.4 ± 5.1 で Control 群、Sham-D14 群に対し CCA0-D7、D14 群で有意に保持されていた。各群の ADC map 体積 (mm^3) は 71.2 ± 8.5 、 27.1 ± 13.5 、 9.2 ± 6.5 、 68.9 ± 12.0 で Control 群、Sham-D14 群に対し CCA0-D7、D14 群で有意に縮小しており残存血流との間に有意な関連がみられた ($r=0.74$, $P<0.01$)。脳軟膜吻合血管径 (μm) は 24.7 ± 0.8 、 31.1 ± 2.0 、 38.0 ± 7.1 、 24.8 ± 2.0 で Control 群、Sham-D14 群に対し CCA0-D7、D14 群で拡大しており、残存血流との間に有意な関連がみられた ($r=0.70$, $P<0.01$)。また、脳軟膜吻合血管径は ADC map 体積との間に有意な関連がみられた ($r=0.84$, $P<0.01$)。

2) マウス中大脳動脈閉塞モデルにおける遠隔虚血負荷の脳梗塞縮小効果、脳軟膜動脈吻合発達に及ぼす影響

各群の虚血中の残存血流は 16-22% で群間に有意な差は見られなかった。24 時間後の神経症状は、対照群、24 時間前、直前、虚血中、再灌流後の各群においてそれぞれ中央値 (25-75% 区間) が 2 (2-3.25)、2 (2-3)、3 (2-3)、1.5 (1-3)、2 (2-2.5) で有意な差は見られなかった。梗塞体積は各群においてそれぞれ $58.8 \pm 10.1 \text{mm}^3$ 、 $54.8 \pm 19.4 \text{mm}^3$ 、 $69.3 \pm 10.8 \text{mm}^3$ 、 $38.0 \pm 22.1 \text{mm}^3$ 、 $64.5 \pm 13.5 \text{mm}^3$ であり、対照群に比し、虚血中遠隔虚血負荷を加えた群は有意に小さく、一方虚血直前に遠隔虚血負荷を加えた群は梗塞体積が大きくなる傾向が観察された。また対照群に比し中大脳動脈閉塞中に脳軟膜動脈吻合血管径を観察すると、対照群 $24.4 \pm 2.1 \mu\text{m}$ に比し塩化虚血負荷群で $32.9 \pm 2.4 \mu\text{m}$ と有意に拡大していた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Saito M, Ishizuka K, Hoshino T, Toi S, Kitagawa K. Leptomeningeal anastomosis and early ischemic lesions on diffusion-weighted imaging in male murine focal cerebral ischemia. *J Neurosci Res*. 2019 Apr 21. doi: 10.1002/jnr.24403. [Epub ahead of print]
2. Kitagawa K, Saitoh M, Ishizuka K, Shimizu S. Remote Limb Ischemic Conditioning during Cerebral Ischemia Reduces Infarct Size through Enhanced Collateral Circulation in Murine Focal Cerebral Ischemia. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2018 Apr;27(4):831-838.

〔学会発表〕(計 5 件)

北川一夫、齋藤萌子、石塚健太郎。一過性中大脳動脈閉塞モデルにおける遠隔虚血コンディショニングの効果。第 59 回日本脳循環代謝学会学術集会。2016 年 11 月 11 - 12 日 徳島

齋藤萌子 石塚健太郎 北川一夫 一過性中大脳動脈閉塞モデルにおける慢性低灌流負荷の効果。第 60 回日本脳循環代謝学会学術集会。2017 年 11 月 3 - 4 日 大阪

齋藤萌子 石塚健太郎 北川一夫 中大脳動脈永久閉塞モデルにおける遠隔虚血コンディショニングの効果。第 60 回日本脳循環代謝学会学術集会。2017 年 11 月 3 - 4 日 大阪

齋藤萌子 北川一夫 マウス中大脳動脈閉塞モデルにおける MRI 拡散強調画像での早期虚血病変と脳軟膜側副血行発達程度の関係。第 44 回日本脳卒中学会学術集会。2019 年 3 月 21 日 23 日 東京

石塚健太郎 北川一夫 マウス中大脳動脈再灌流モデルの脳虚血領域における MRI 画像および組織学的所見の経時的変化。第 44 回日本脳卒中学会学術集会。2019 年 3 月 21 日 23 日 東京

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：柴田 亮行

ローマ字氏名：Shibata Noriyuki

所属研究機関名：東京女子医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：90226176

研究分担者氏名：清水 優子

ローマ字氏名：Shimizu Yuko

所属研究機関名：東京女子医科大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：20246507

研究分担者氏名：飯嶋 睦

ローマ字氏名：Iijima Mutsumi

所属研究機関名：東京女子医科大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：90232115

研究分担者氏名：遠井 素乃

ローマ字氏名：Toi Sono

所属研究機関名：東京女子医科大学

部局名：医学部

職名：准講師

研究者番号（8桁）：50408465

研究分担者氏名：星野 岳郎

ローマ字氏名：Hoshino Takao

所属研究機関名：東京女子医科大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：30724679

(2)研究協力者

研究協力者氏名：齋藤 萌子

ローマ字氏名：Saito Moeko

研究協力者氏名：石塚 健太郎

ローマ字氏名：Ishizuka Kentaro

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。