

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09316

研究課題名(和文)脳梗塞におけるアストロサイトに注目した脳組織保護・認知症予防・再生療法の新規開発

研究課題名(英文)Development of new therapy of brain protection, dementia prevention and neuroregeneration focusing on astrocytes in cerebral infarction

研究代表者

出口 健太郎 (Deguchi, Kentaro)

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：80467753

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では脳梗塞の低酸素および酸化ストレスにおけるアストロサイトの役割に注目し、マウス局所脳虚血モデルを用い解析した。大脳組織切片の免疫染色にて、低酸素ストレスマーカーであるHIF1 $\alpha$ 発現は脳梗塞発症12時間後に脳梗塞巣周辺にて顕著に増加し、抗酸化ストレス作用のあるGSH発現は脳梗塞発症72時間後に最大だった。in vivo imagingと免疫染色において酸化ストレスマーカーであるNrf2発現は24時間後がピークであり、ニューロンとアストロサイトでNrf2は発現していた。以上より、脳梗塞病態には低酸素ストレスがまず関わり、次いで酸化ストレスが関わり、アストロサイトの関与があることが判明した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on the role of astrocytes in hypoxia and oxidative stress of cerebral infarction, and analyzed it using mouse focal cerebral ischemia model. Immunohistochemistry of cerebral tissue sections showed remarkable increased expression of HIF1 $\alpha$ , a hypoxic stress marker, around the cerebral infarction lesions 12 hours after the cerebral infarction, and the highest expression of GSH, antioxidant stress marker, 72 hours after the onset of cerebral infarction. In vivo imaging and on immunohistochemical analyses, the expression of Nrf2, an oxidative stress marker, peaked after 24 hours, and Nrf2 was expressed in both neurons and astrocytes. This study suggested that hypoxic stress was first involved in cerebral infarction, then oxidative stress was involved, in which astrocyte acted mainly.

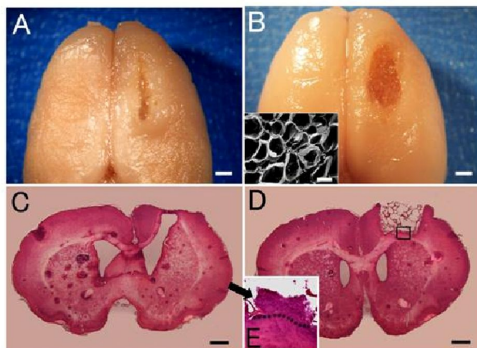
研究分野：医歯薬学

キーワード：脳血管障害 低酸素ストレス 酸化ストレス アストロサイト

1. 研究開始当初の背景

近年、成人脳においても、種々の障害の後に神経細胞の再生が生じることが明らかになってきた。このことは脳梗塞をはじめとする神経疾患の治療に途を開くものとして注目を集めている。しかし、中枢神経組織では障害後に神経組織再生を阻害する様々な因子が発現するため、臨床においては脳梗塞後に脳組織は脱落し、多くの患者が高度の機能障害を後遺しているのが現状である。したがって、これらの疾病の再生治療のためには、何らかの scaffold (足場) を急性壊死巣に留置することが必要となる。

我々はこの点に着目し、bFGF と EGF といった栄養因子を付加した多孔質新規生体材料ゼラチン - GPSM (3-glycidoxypropyl trimethoxysilane) が、神経細胞が障害された領域に生着するための scaffold (足場) となり得るかどうかを検討し、アストロサイトを主体とした脳組織が新生することを確認し報告した (Deguchi K. et al. 2006)。



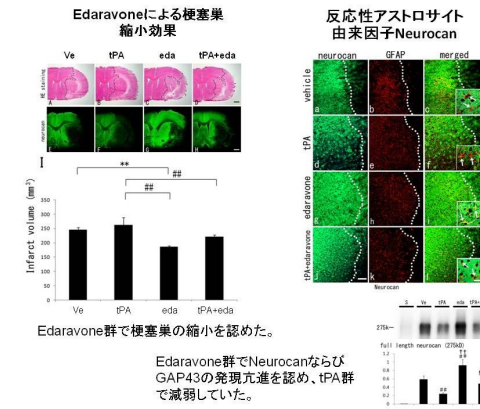
脳欠損部位での scaffold 埋入後の変化

- A: 脳欠損のみ
- B: 脳欠損部位に scaffold 埋入後
- C: 脳欠損のみの冠状断
- D: scaffold 埋入後の冠状断
- E: scaffold 内に認められた新生組織

しかし、新生組織は量的に限られており、神経細胞をその組織内に見つけることはできなかった。組織再生のためには、新生組織を産生ならびに維持する血管の再構築ならびに、新生組織周囲の正常組織とシナプス形成を介して構造的に結合する一連の流れを、急性期から慢性期にかけて連続して進める検討が必要であると考えられた。

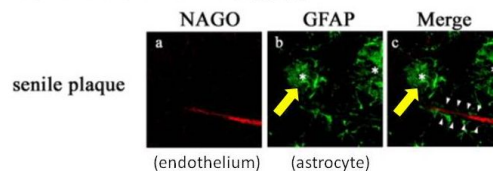
次に我々は、血液脳関門の構造 (NVU: Neurovascular unit) 維持および神経再生に関する軸索伸長関連因子の発現において、アストロサイトの役割が極めて重要であることを報告した。臨床で血行再建療法に用いられている tissue plasminogen activator (tPA) は、アストロサイトを障害することにより NVU の血管内皮やペリサイト (血管周囲細胞) からの解離を促し、軸索伸長関連因子や、神経栄養因子の発現を阻害すること、一方で、フリーラジカルスカベンジャーの edaravone はアストロサイトを保護することにより、血管内皮やペリサイトからの解離を

抑制し、軸索伸長関連因子や、神経栄養因子の発現を促進することを明らかとした (Deguchi K et al. 2012, Deguchi K et al. 2014)。



また、アルツハイマーモデルマウスにおいて、老人斑の近傍の NVU は、血管内皮からアストロサイトが解離し構造が破綻している所見が有意に目立つこと (Kurata T, Ohta Y et al. 2011)、さらに、脳梗塞モデルラットを長期に経過観察すると、アミロイド、リン酸化タウが脳内に沈着し、経時的に増加することを明らかとした。(Kurata T, Deguchi K et al. 2014)

APPトランスジェニックマウスの老人斑と Neurovascular unit の関係



アルツハイマーモデルマウス (APPトランスジェニックマウス) では、矢頭 (△) が示すように、血管内皮からアストロサイトの足突起が乖離している NVU の部位に矢印 (↑) が示す老人斑が多く認められる。

2. 研究の目的

本研究では、急性期から慢性期の脳梗塞病変において、アストロサイトに作用する薬物介入を通じて、有効な脳組織保護療法、アルツハイマー病理の促進予防治療、脳組織再生療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

11-13 週齢の OKD48 マウスの頸動脈よりナイロン糸を挿入し、中大脳動脈起始部を閉塞する (middle cerebral artery occlusion: MCAO) マウス局所脳虚血モデルを作成した。このモデルにおいては、閉塞側の中大脳動脈灌流領域の大脳皮質および基底核に梗塞巣が形成される。

OKD48 マウスは酸化ストレスが発現すると内在性抗酸化ストレスマーカーである Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) の発現が増加することでルシフェ

ラーゼ発光する遺伝子組み換えマウスであり、in vivo イメージングで脳虚血による酸化ストレスを観察することが可能である。

マウスの頸動脈よりナイロン糸を挿入し、45分間中大脳動脈起始部を閉塞し、閉塞側の中大脳動脈領域の大脳皮質と基底核に脳梗塞巣の作成を行い、脳虚血12時間後、24時間後、72時間後、7日後の大脳凍結切片を作成した。

脳梗塞巣の体積確認のため大脳凍結切片のNissl染色を行った。次に脳梗塞周辺のアストロサイトの病態関与を解析するため、免疫染色により、低酸素ストレスマーカーであるhypoxia-inducible factor-1 (HIF1)、抗酸化ストレス作用のあるGlutathione (GSH)の発現変化を解析した。

さらに脳梗塞における酸化ストレス発現の解析のためにin vivo imagingによる酸化ストレスマーカーであるNrf2発現観察を行った。発現解析にはIVISを用い、観察15分前にD-Luciferinを投与することで、Nrf2の発現をルシフェラーゼ発光として解析することが可能である。さらにNrf2発現変化を組織学的に解析するために、大脳凍結切片を用い、Nrf2の免疫染色を行った。さらに細胞の種類によるNrf2発現を確認するために、ニューロンのマーカーであるNeuronal nuclei (NeuN)、アストロサイトのマーカーであるGlial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)にたいする面積染色も行った。

#### 4. 研究成果

まず、11-13週齢のOKD48マウスの頸動脈よりナイロン糸を挿入し、中大脳動脈起始部を閉塞するマウス局所脳虚血モデル(MCAOモデルマウス)作成を行い、閉塞側の中大脳動脈灌流領域の大脳皮質および基底核に梗塞巣が安定して形成されるかを確認した。ナイロン糸による45分間中大脳動脈閉塞後にナイロン糸を引き抜き再灌流させ、脳虚血12時間後、24時間後、72時間後、7日後の大脳凍結切片をNissl染色したところ、野生型マウスと比較して、脳梗塞巣の大きさに変化がなかった。よって、OKD48マウスにおけるMCAOモデルを確立した。

次にOKD48マウスMCAOモデルの大脳凍結切片に対する免疫染色により、低酸素ストレスマーカーであるHIF1、抗酸化ストレス作用のあるGSH発現解析を行ったところ、HIF1

発現は脳梗塞発症12時間後に脳梗塞巣周辺にて顕著に増加し、24時間後に最大となり、以後低下傾向となった。一方、GSH発現は脳梗塞発症12時間後より脳梗塞巣周辺にて増加傾向となり、72時間後に最大となり、以後低下傾向となった。以上より、脳梗塞病態には低酸素ストレスがまず関わり、次いで酸化ストレスが関わるということが判明した。このような脳梗塞発症後の時間経過によるHIF1とGSH発現変化の詳細な解析の報告はわずかであり、かつ低酸素ストレスと酸化ストレスの

時間経過による発現の比較を行った報告は今までなされていない。今後の新規脳梗塞治療開発に繋がりうる、世界的にみて非常にインパクトのある成果であり、論文報告を行った(Li Q, Ohta Y, et al. 2016)。

最後にin vivo imagingによる酸化ストレスのマーカーであるNrf2発現解析を、同じOKD48マウスMCAOモデルに対して行ったところ、Nrf2発現は脳梗塞発症24時間後がピークであった。in vivo imagingによるNrf2発現のピークについては、OKD48マウスMCAOモデルの大脳凍結切片に対する免疫染色によるNrf2発現解析でも確認された。さらに免疫染色による組織学的解析で、Nrf2とニューロンのマーカーであるNeuN、またはアストロサイトのマーカーであるGFAPと二重染色を行ったところ、ニューロンとアストロサイトの両者においてNrf2は発現していた。この研究成果は、in vivo imagingと組織解析を組み合わせた非常にユニークな研究からうまれており、将来的に新規の脳梗塞画像検査につながる画期的な成果と言えます、論文報告を行った(Nakano Y, Ohta Y, et al. 2017)。

以上より、脳梗塞病態には低酸素ストレスがまず関わり、次いで酸化ストレスが関わるが、そこにアストロサイトが深く関与していることが判明した。

#### 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7件)

Nakano Y, Yamashita T, Li Q, Sato K, Ohta Y, Morihara R, Hishikawa N, Abe K. Time-dependent change of in vivo optical imaging of oxidative stress in a mouse stroke model. J Neurosci Res. 査読有.95. 2017. 2030-2039. DOI: 10.1002/jnr.24047.

Kusaki M, Ohta Y, Inufusa H, Yamashita T, Morihara R, Nakano Y, Liu X, Shang J, Tian F, Fukui Y, Sato K, Takemoto M, Hishikawa N, Abe K. Neuroprotective Effects of a Novel Antioxidant Mixture Twendee X in Mouse Stroke Model. J Stroke Cerebrovasc Dis. 査読有.26.2017. 1191-1196. DOI:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2017.01.003.

Li Q, Ohta Y, Yamashita T, Shang J, Deguchi K, Feng T, Sato K, Hishikawa N, Nakano Y, Abe K. Dynamic mislocalizations of nuclear pore complex proteins after focal cerebral ischemia in rat. J Neurosci Res. 査読有. 95. 2017. 1745-1759. DOI: 10.1002/jnr.24005.

Morihara R, Yamashita T, Kono S, Shang J, Nakano Y, Sato K, Hishikawa N, Ohta

Y, Heitmeier S, Perzborn E, Abe K. Reduction of intracerebral hemorrhage by rivaroxaban after tPA thrombolysis is associated with downregulation of PAR-1 and PAR-2. J Neurosci Res. 査読有 . 95. 2017. 1818-1828. DOI: 10.1002/jnr.24013.

Morihara R, Yamashita T, Deguchi K, Tsunoda K, Manabe Y, Takahashi Y, Yunoki T, Sato K, Nakano Y, Kono S, Ohta Y, Hishikawa N, Abe K. Successful Delayed Aortic Surgery for a Patient with Ischemic Stroke Secondary to Aortic Dissection. Intern Med. 査読有. 56.2017.2343-2346.DOI:10.2169/internalmicine.8438-16.

Li Q, Nakano Y, Shang J, Ohta Y, Sato K, Takemoto M, Hishikawa N, Yamashita T, Abe K. Temporal Profiles of Stress Protein Inductions after Focal Transient Ischemia in Mice Brain. J Stroke Cerebrovasc Dis. 査読有 .25. 2016. 2344-2351.DOI:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.05.031.

Omote Y, Deguchi K, Kurata T, Yamashita T, Sato K, Hishikawa N, Abe K. Telmisartan promotes potential glucose homeostasis in stroke-resistant spontaneously hypertensive rats via peroxisome proliferator-activated receptor activation. Curr Neurovasc Res. 査読有.12. 2015. 91-7.

〔学会発表〕(計7件)

Morihara R, Yamashita T, Kono S, Shang J, Nakano Y, Sato K, Hishikawa N, Ohta Y, Heitmeier S, Perzborn E, Abe K. Reduction of intracerebral hemorrhage by rivaroxaban after tPA thrombolysis is associated with downregulation of PAR-1 and PAR-2. XXIII World Congress of Neurology. 2017.9.16-21. Kyoto, Japan.

森原隆太、河野祥一郎、佐藤恒太、太田康之、菱川望、山下徹、出口健太郎、真邊泰宏、高尾芳樹、柏原健一、桐山英樹、阿部康二、tPA4.5時間時代の急性期脳梗塞治療、第17回日本抗加齢医学会総会、2017年6月2-4日、東京

森原隆太、山下徹、河野祥一郎、商敬偉、中野由美子、佐藤恒太、菱川望、太田康之、阿部康二、血栓溶解療法後の頭蓋内出血に対するリパーロキサパンのPARを介した抑制効果、第8回日本脳血管・認知症学術大会、2017年8月5日、東京  
高橋義秋、山下徹、森原隆太、中野由美子、商敬偉、佐藤恒太、武本麻美、菱川望、太田康之、阿部康二、前方、後方循環別に比較した症状悪化を伴う Branch

atheromatous disease (BAD) の特徴、第15回日本臨床医療福祉学会、2017年9月1-2日、倉敷

角田慶一郎、山下徹、河野祥一郎、出口健太郎、倉田智子、真邊泰宏、高尾芳樹、河田幸波、柏原健一、井上智、桐山英樹、阿部康二、岡山大学関連病院における超高齢者超急性期脳梗塞に対するt-PA静注療法の臨床的検討、第7回日本認知症予防学会学術集会、2017年9月22-24日、岡山

Ohta Y, Tremblay C, Schneider JA, Bennett DA, Calon F, Julien JP, Abe K. The pathological role of TDP-43 and NF-kb in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. AAIC2016. 2016.7.24-28. Toronto, Canada.

福井裕介、菱川望、佐藤恒太、河野祥一郎、太田康之、山下徹、出口健太郎、阿部康二、高血圧ラット(SHR-SR)におけるテルミサルタンの抗酸化ストレス作用とシヌクレイン蓄積に対する効果の検討、第34回日本認知症学会学術総会、2015年10月2-4日、青森

〔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

出口 健太郎 (Deguchi Kentaro)  
岡山大学・医学部・客員研究員  
研究者番号：80467753

(2) 研究分担者

太田 康之 (Ohta Yasuyuki)  
岡山大学・大学病院神経内科・講師  
研究者番号：20746854

菱川 望 (Hishikawa Nozomi)

岡山大学・大学病院神経内科・助教  
研究者番号：90378175

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし