

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15646

研究課題名(和文) 脳神経系疾患に潜む皮質拡延性抑制の局所脳冷却による制御

研究課題名(英文) Protective effects of Focal brain cooling on cortical spreading depolarization in rats

研究代表者

鈴木 倫保 (SUZUKI, Michiyasu)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：80196873

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：皮質拡延性抑制(Cortical Spreading Depression; CSD)は大脳皮質上をゆっくりと伝搬する神経細胞の脱分極の波であり、病態の悪化と密接に関わっている。脳を直接的に冷却することでてんかんの異常脳波抑制する技術である局所脳冷却をCSDに適用しその抑制効果を調べた。その結果、15度の冷却によりCSDの発生頻度は有意に低下した。また、CSDによって上昇する脳血流も冷却によって抑制を受けたが、この効果はeNOSの発現率の低下によるものであった。以上の結果より、局所脳冷却はてんかん性異常脳波だけではなくCSDをも抑制しうることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：In neurological disorders, Cortical Spreading Depolarization (CSD) plays a fundamental role as a pathophysiological mechanism in brain damage. Focal brain cooling (FBC) reduces neuronal damage and promotes recovery in models of epilepsy, cerebral ischemia, and trauma. Based on the above, we assume that FBC can inhibit generation and propagation of CSD. In the non-cooling group, KCl predominantly exhibited repetitive spreading events. In the cooling group, FBC increased the duration of all KCl-induced events thereby the frequency of these developments was gradually reduced. Moreover, eNOS was decreased in the cooled brain region compared with the non-cooled contralateral hemisphere. The results obtained show that FBC has an impact on the suppression of CSD and CSD-related events and eNOS expression.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：皮質拡延性抑制 皮質拡延性脱分極 局所脳冷却 ラット 脳波 脳血流 脳温 eNOS

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系疾患に対する外科的治療法は、最大の治療効果を引き出すべく、術前・術後ともにバイタル・脳神経系のモニタリングや定期的な CT・MRI 画像による観察が必要である。しかしながら、各種疾患により引き起こされる病態は、突発的な現象として確認される事もあり、モニタリングや経過観察だけでは十分に対応できない場合がある。その顕著な例が、「難治性のてんかん発作」や「脳血管攣縮」である。脳梗塞や頭部外傷では、疾患部位が機能を失う一方で、その周辺領域はペナンプラが存在する。このような、突然の病態発生前や細胞死を免れている状況、いわゆる「グレイゾーン」において、脳はあるシグナルを発生させる。これが、「皮質拡延性抑制(Cortical Spreading Depression; CSD)」、大脳皮質上を約 2 mm/分というゆっくりとした速度で伝搬する脱分極の波である(Leao, J Neurophysiol. 1994)。CSD は強い脱分極を引き起こすため、薬物治療ですらも、その制御は困難さを生じていた。

脳の冷却は、病態脳に対する脳保護効果がある。全身低体温療法が重症頭部外傷患者に対して有効であることを発端とし、冷却を脳だけに適用することが局所脳冷却である。古くは頭部外傷に対する研究がなされていたが(Fay, J Neurosurg 1959)、近年では、てんかん発作に対する効果が報告され(Yang, AnnNeurol 2001)、申請者も、薬物誘発てんかん性異常脳波が約 20 の焦点領域の冷却で抑制されることを明らかにした(Imoto, J Neurosurg 2006, Fujii, Epilepsia 2012, 特許第 3843054)。さらに、脳梗塞急性期治療(He, BrainRes 2013)や慢性疼痛(Fujioka, NeuroscRes2010)に対する有効性も確認し、局所脳冷却が神経疾患全般の治療法になりうることを見出した。しかしこれらの知見では、局所脳冷却が様々な疾患治療に有効である理由を十分に説明できなかった。そこで申請者は、局所脳冷却が CSD を制御し、多岐にわたる治療効果を引き出していると考え、本研究を開始するに至った。

2. 研究の目的

本研究のテーマは、片頭痛から頭部外傷までの多岐に渡る中枢神経系の疾患で見られる「皮質拡延性抑制(Cortical Spreading Depression; CSD)」を局所脳冷却によって制御できるか否かをを確認することである。CSD は大脳皮質上をゆっくりと伝搬する神経細胞の脱分極の波であり、病態の悪化と密接に関わっている。CSD は病態発現の前兆として発現するため、CSD 自体を制御することができれば、病態の悪化を未然に防ぐことができる可能性がある。その方法の 1 つとして、申請者が研究を続けてきた、脳の一部を直接的に冷却する技術である「局所脳冷却」を用いる。局所脳冷却は、CSD を起こす疾患であるてんかんや脳梗塞に対して治療効果が

あるが、これら治療効果は局所脳冷却が異常脳波や脳循環代謝だけでなく CSD をも制御することで引き出されている可能性がある。

3. 研究の方法

本研究では、ラットを用い実験的に誘発された CSD を、脳波、脳血流、脳温度を同時計測することで、大脳皮質で起きる神経活動の脱分極の波を正確に捉える方法を採用した。そして、この捕捉された CSD が、局所脳冷却によって、いかなる影響を受けるかを調べた。さらに、実験後の摘出脳より大脳皮質 eNOS のリン酸化レベルを定量することで、局所脳冷却の有無によってニューロン、アストロサイト、脳血管の相互作用メカニズムである神経血管ユニットへの影響を調べた。

(1) CSD 誘発と冷却

CSD の誘発には KCl 溶液を用い、Ayataらの実験手法に基づき実施した(Ayata Ann Neurol 2006)。1M の KCl を染込ませた直径 2mm の綿球を準備し、硬膜を切開した脳表に KCl 綿球を設置した。15 分毎に 5 μ l の KCl を綿球に滴下し状態維持し、7 回の滴下を実施後、8 回目に Washout を実施した。実験は冷却群と非冷却群に分けて実施した。冷却群は、CSD を滴下する前より冷却を開始し、Washout と共に冷却も終了した。

(2) 冷却水灌流による局所脳冷却

ラットの頭部を開頭し、脳表に銀/塩化銀電極と微小熱電対を 5mm の距離を取り一対ずつ設置し、薄く引き伸ばしたパラフィルムで脳表に固定した。開頭し露出した脳表部分に合うサイズ・湾曲のガラスカバーを被せ、脳表とガラスカバーとの間を 37 の人工脳脊髄液にて灌流した。脳血流の非侵襲的計測のために、レーザースペックル計測用のカメラと赤外線レーザー投光器を用いた。冷却を実施する際は、冷却された人工脳脊髄液が脳表を灌流するように送液経路を切り替えた。各種センサで得られた CSD 関連信号については、CSD の発生回数や異常脳波の振幅・持続時間について解析を実施した。

(3) 血管拡張因子の解析

CSD 誘発前後のラット摘出脳を用いて、大脳皮質におけるリン酸化 eNOS レベルをウェスタンブロットにより解析し、CSD による脳血流上昇の NO の関与を評価した。

4. 研究成果

脳表に KCl を滴下することによって安定して CSD を誘発することができた。また、発生した CSD は、AC 脳波、DC 脳波、脳血流のいずれにおいても観測する事ができたが、脳温については変動を確認できなかった(図 1 上)。

この状況下で、冷却水で脳表を灌流し約 15 度まで脳表の温度を降下させたところ、

CSD の発生頻度が急激に低下した。波形の変動は非常にゆっくりとなった(図1下)。また冷却を停止した後、一定時間経過した後に再度 KCl の滴下を実施したが、非冷却群と比較しても CSD の発生頻度は有意に低かった。

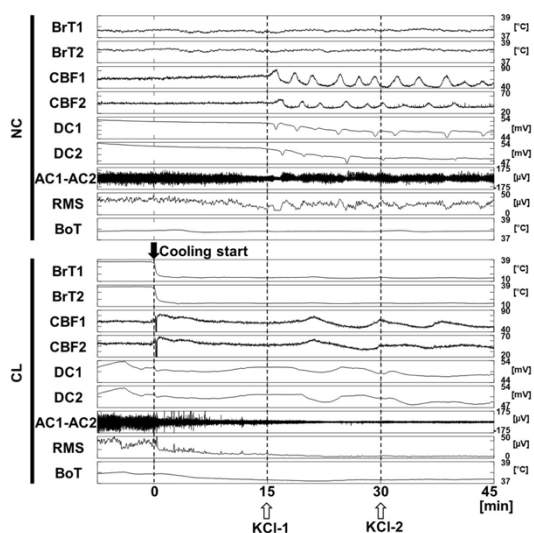


図1 KCl による CSD の発生と冷却による CSD の抑制

続いて、冷却による eNOS への影響を調べたところ、冷却によって、eNOS の発現量が抑制されることを確認できたが、eNOS のリン酸化を抑制するような影響は見られなかった(図2)。

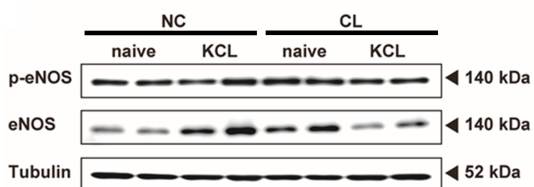


図2 冷却による eNOS への影響

以上の結果より、CSD は 15 という温度域には発生しにくくなることがわかった。

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1件)

Kazutaka Sugimoto, Satoshi Shirao, Hiroyasu Koizumi, Takao Inoue, Fumiaki Oka, Yuichi Maruta, Eiichi Suehiro, Hirokazu Sadahiro, Takayuki Oku, Hiroshi Yoneda, Hideyuki Ishihara, Sadahiro Nomura, Michiyasu Suzuki, Continuous Monitoring of Spreading Depolarization and Cerebrovascular Autoregulation after Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage, 査読有,

Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases, 25(10), 2016 e171-177
doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.07.007

[学会発表](計5件)

杉本至健、石原秀行、岡史朗、井上貴雄、野村貞宏、Jens P. Dreier、Cenk Aayata、鈴木倫保、くも膜下出血と Cortical Spreading Depolarization (CSD)、Stroke2018、2018年

杉本至健、白尾敏之、井上貴雄、岡史朗、山根亜希子、篠山瑞也、末廣栄一、米田浩、石原秀行、鈴木倫保、くも膜下出血後の遅発性脳虚血および Spreading depolarization に対するシロスタゾールの抑制効果、STROKE2017、2017年

杉本至健、白尾敏之、山根亜希子、井上貴雄、小泉博靖、米田浩、森尚昌、西本拓真、岡崎光希、岡史明、篠山瑞也、末廣栄一、石原秀行、野村貞宏、鈴木倫保、くも膜下出血周術期に出現する Cortical Spreading Depolarization 広汎性脱分極と頭痛、日本脳神経外科学会第75回学術総会、2016年

Yuya Hirayama, Takao Inoue, Hiroyuki Kida, Kazutaka Sugimoto, Satoshi Shirao, Hirochika Imoto, Sadahiro Nomura, Michiyasu Suzuki, The effect of focal brain cooling on KCl-induced repetitive cortical spreading depression in rats, Neuroscience2016, 2016年

平山祐哉、井上貴雄、木田裕之、杉本至健、白尾敏之、井本浩哉、野村貞宏、鈴木倫保、持続的な局所脳冷却による塩化カリウム誘発皮質拡張性抑制の制御効果、第39回日本神経科学大会、2016年

[図書](計0件)

なし

[産業財産権]

出願状況(計0件)

なし

取得状況(計1件)

名称: 硬膜下センサ
発明者: 鈴木倫保、野村貞宏、丸田雄一、井上貴雄、山川俊貴、庭山雅嗣
権利者: 山口大学、静岡大学
種類: 特許
番号: 特許第6296606号
取得: 平成30年3月2日

国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 倫保 (SUZUKI, Michiyasu)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：80196873

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

井上 貴雄 (INOUE, Takao)
山口大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：80513225

平山 祐哉 (HIRAYAMA, Yuya)
山口大学・大学院医学系研究科・学術研究員
研究者番号：20749824

(4) 研究協力者

杉本 至健 (SUGIMOTO, Kazutaka)