

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2022

課題番号：17K11102

研究課題名（和文）実験的脳梗塞モデルを用いた神経保護作用と中枢痛（視床痛）改善の検討

研究課題名（英文）Research on neuroprotection against cerebral ischemia using mouse MCAO model

研究代表者

清水 雄（Shimizu, Takeru）

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：70436278

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：TRPM2チャネルの活性を抑制するサーチュイン2抑制剤であるAGK2を用いた。Sirt2抑制による神経保護効果を検討するため、実験的脳梗塞モデルである中大脳動脈塞栓をマウスで行った。AGK2は雄マウスにおいては神経保護作用を示したものの、メスマウスにおいては示さなかった。脳梗塞後の視床痛の治療の検討を計画していたが、顕著な視床痛が継続することはわれわれのモデルの中では観察できなかった。そのため、最初に坐骨神経結紮モデルで神経因性疼痛を作成して検討した。クロトリマゾールを皮下に投与するモデルを使用したが、疼痛軽減は最初の1週間目でのみ認められるだけだった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在までに、脳卒中のうち80%を占める虚血性脳梗塞に有効性が示されている治療法はtPAのみである。これまでに多大な資金をもとにした世界中の研究においても、有効な治療法・神経保護法はみつけられていない。特に、薬剤による神経保護効果はほぼ認められていない。しかし、今回の研究から、脳損傷後に投与したSirt2阻害剤は、実験的MCAOモデルで、オスマウスにおいて部分的脳虚血から脳梗塞巣を減少させることがわかった。このことは、限られた時間ではあるかもしれないが、脳梗塞発症後にも薬剤による治療が可能であることを示唆するものと考えられ、治療モデルを提示できたと考えられる。

研究成果の概要（英文）：We hypothesized that Sirt2 inhibition protects against ischemic stroke through reduced activation of TRPM2. In this study, we tested this hypothesis by using the Sirt2 inhibitor AGK-2. Male animals received AGK2 had smaller infarct volume compared to male animals received vehicle. AGK2 did not show neuroprotection in female animals. These data indicate that Sirt2 inhibition protects against ischemic stroke in male animals, likely through reduced TRPM2 activation.

研究分野：脳神経保護

キーワード：神経保護 MCAO

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳卒中は、死因や長期障害をもたらす主な原因である。脳血管疾患での死亡者は12万人を超えており、死因の第4位であるが、この疾患が原因での救急搬送は33万人、治療受診患者は137万人にのぼり、寝たきりの原因の30%、および介護が必要な患者の1位である。年間の医療費の全体の約3%を占めるため、脳卒中の治療法の開発には急務を要する。しかし、現在までに、脳卒中のうち80%を占める虚血性脳梗塞に有効性が示されている治療法は tPA のみである。これまでに多大な資金をもとにした世界中の研究においても、有効な治療法・神経保護法はみつけられていない。

虚血に陥った際、神経細胞には興奮性毒性、酸化ストレス、アポトーシス、壊死等様々な経路で障害をもたらされる。その際に共通する変化は細胞内への大量のカルシウムイオンの流入である。それ故に、これまで研究者は NMDA 受容体を含めカルシウム流入経路を中心にしてきた。しかし、これらの阻害は、実験モデルでは有効であったものの、臨床試験では無効であった。それゆえに現在では、その他のカルシウムイオンチャンネルに焦点を絞って研究が進められている。その一つが transient receptor potential (TRP)スーパーファミリーの一つである TRPM2 チャンネルである。今までに研究代表者は、TRPM2 チャンネルを阻害することにより中大脳動脈閉塞 (MCAO) モデルを用いた脳梗塞をオスマウスにおいては軽減させることに成功していた。

2. 研究の目的

今回は間接的に TRPM2 チャンネルを抑制するサーチュイン2 (Sirt2)阻害剤である AGK2 を用いて、その神経保護効果を検討することを目的とした。

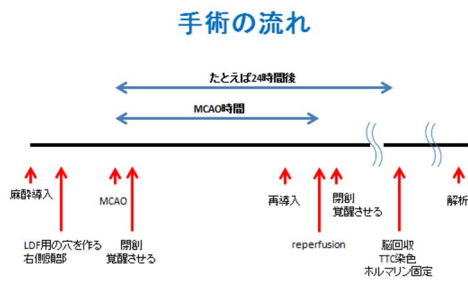
3. 研究の方法

MCAO に対する AGK2 の効果

野生型 C57Bl/6 のオスとメスをイソフルランによる麻酔後、MCAO を行った。脳虚血時間を60分とし、再灌流後に AGK2 10 mcg/kg またはコントロールとして生食を IV 投与した。4日後に脳を採取し、2,3,5-Triphenyl tetrazolium chloride (TTC)を用いて染色し、Image Jを用いて脳梗塞容積等を求めた。

その結果、オスでは AGK2 は神経保護効果を示したものの、メスではその効果はなかった。これは、TRPM2 チャンネル阻害剤を用いた時と同様であった。

以下に実験の流れを示す。

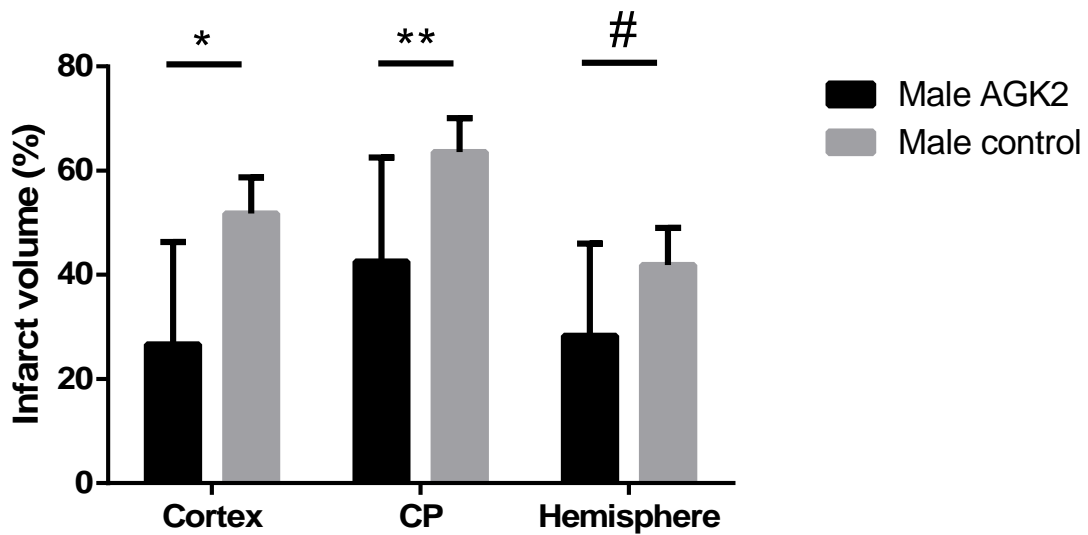


脳梗塞後の神経因性疼痛の検討

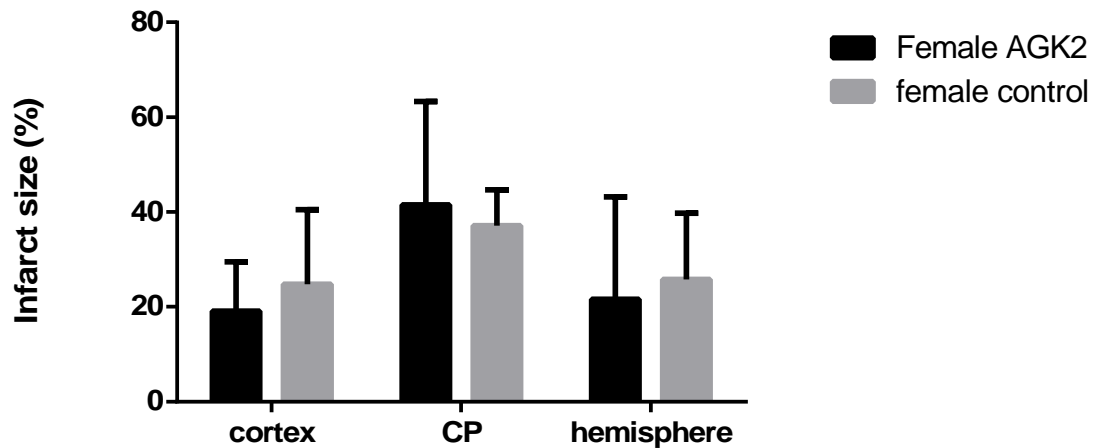
神経因性疼痛に TRPM2 チャンネルが関与しているという報告もある。今回使用する薬剤についてもその効果が期待できるので、脳梗塞後視床痛への影響を検討した。

4. 研究成果

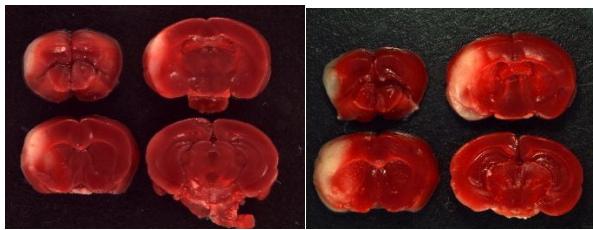
オスマウスにおいて AGK2 は脳梗塞巣を減少させた



メスマウスにおいては AGK2 は神経保護効果はなかった



TTC 染色後の代表的な写真を示す



AGK2

コントロール

脳梗塞後の神経因性疼痛の検討

MCAO 直後には、神経因性疼痛様の反応を示すマウスは多かった。しかし、1 日以上経過した段階で疼痛が残存しているマウスはなかった。脳梗塞後の視床痛を直接検討するのは困難と考えた。そこで、坐骨神経を損傷させたモデルを用いて検討することとした。この研究では、結紮モデルではなく、なるべく障害の程度が均一になるように、カフモデルを用いた。また、クロトリマゾールの投与方法を検討した。クロトリマゾールを溶解し、IV できるようにするのは困難である。従来は、アルコールに溶解後、コーン油に混ぜ、SC する。しかし、今回はなるべくアベイラビリティを上げるために、ポリエチレングリコールに溶解した後に IP した。当初は IP 後に全滅することも多かったが、至適後に検討を行った。神経損傷後にクロトリマゾールを IP し、von Frey フィラメントを用いて、疼痛の閾値を調べた。しかし、クロトリマゾール群とコントロール群とで有意差はなかった。

脳を採取し、TRPM2 チャンネルの発現の変化の検討を試みた。しかし、抗体の入手が困難であったため、期限までに処理を行うことができなかった。

Sirt2 受容体阻害剤は実験的 MCAO モデルでのオスマウスにおいて神経保護効果を示した。しかし、メスマウスにおいてはなかった。神経因性疼痛モデルで、TRPM2 チャンネルを阻害しても、その効果は認められなかった。組織的な解析が必要であると同時に、さらに他の薬剤等を用いた検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------