

平成 21 年 6 月 3 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18390427

研究課題名 (和文) 脳梗塞時における睡眠・覚醒サイクル異常の解明
－オレキシン動態からその機序に迫る－研究課題名 (英文) Analysis of sleep-wake disturbance after brain infarction
- contribution of dysfunctional orexin cells -

研究代表者

福田 悟 (FUKUDA SATORU)

帝京大学・医学部・麻酔科・教授

研究者番号：30116751

研究成果の概要：

脳梗塞後の睡眠・覚醒障害の原因を検討した。ラット視床下部虚血・再灌流モデルにおいて明らかな睡眠期の延長が見られ、オレキシン細胞の減少を来した。また、オレキシン細胞は線条体細胞に比べアポトーシスで細胞死に至ることが極めて少なく、殆どがネクローシスにより細胞死に至ることがわかった。虚血・再灌流後、核内から放出される High mobility group-1 box (HMGB1) 蛋白は脳壊死部周囲ペナンプラ領域に存在し、脳室内投与 HMGB1 は睡眠時間の増大を来したことから、脳梗塞時の睡眠・覚醒障害に少なくとも HMGB1 が関与することが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	11,600,000	3,480,000	1,5080,000
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
年度			
総計	15,700,000	4,710,000	20,410,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：脳虚血、視床下部、オレキシン、睡眠・覚醒サイクル、ラット、脳波、筋電図

1. 研究開始当初の背景

脳血管障害は癌、心疾患と共に日本の死亡率の上位を占めている。脳血管障害の中でも、脳梗塞や脳出血による脳神経細胞障害は重大な障害をもたらす、患者の日常生活を脅かす。また、脳血管障害の患者の 20-40%は睡眠・覚醒障害を来することが知られており、脳血管障害を来した患者にとっては大きな問題となっている。

脳神経細胞が脳梗塞等で虚血に陥り、再び血流が再開されると、脳神経細胞は重大な障害を被ることはよく知られている。脳神経細胞が障害されると細胞膜は破壊され、従来核

のクロマチン(核に存在するDNAとタンパク質の複合体)を安定化しているHigh mobility group-1 box (HMGB1)蛋白が細胞外に放出される。HMGB1 蛋白は主としてネクローシス細胞から細胞外に放出され、このHMGB1 蛋白は、脳虚血早期に放出されることが報告されている。ところで、サイトカインは正常睡眠において睡眠を誘発する作用をもっている。HMGB1 蛋白にはサイトカイン誘発作用も知られており、この蛋白が脳虚血・再灌流時の睡眠・覚醒障害の原因の一部を担っているのではないかとこの仮説を立て本研究を行った。

2. 研究の目的

1. ラット中大脳動脈および視床下部動脈閉塞モデルの作成
2. ラット深部脳動脈閉塞・再灌流モデルを用い、睡眠・覚醒サイクルにどのような影響を及ぼすかを検討する。
3. ラット中大脳動脈閉塞モデルを用い、虚血・再灌流に脆弱である線条体と視床下部領域に存在するオレキシン細胞の虚血時間による影響を検討する。
4. ラット中大脳動脈閉塞モデルを用い、虚血・再灌流により線条体ならびに視床下部周辺に HMGB1 が虚血後の時間経過と共にどのように出現するかを検討する。
5. ラット脳室内に HMGB1 を投与し、睡眠・覚醒パターンにどのような影響を及ぼすかを検討する。

以上の実験結果を総合して、脳梗塞時における睡眠・覚醒サイクル異常を解明する。

3. 研究の方法

研究 1: ラット中大脳動脈および深部視床下部動脈閉塞モデルの作成

1) 中大脳動脈閉塞モデルの作成

230~250g の雄 Wistar ラットを用いた。イソフルラン 2%麻酔下、仰臥位にて左総頸動脈・外頸動脈、内頸動脈を露出した。次に、左総頸動脈・外頸動脈、蝶形骨動脈を結紮した。内頸動脈・外頸動脈分岐部より、シリコンコーティング 4-0 ナイロン糸を抵抗のあるところまで挿入し中大脳動脈閉塞モデルとした。(約 18~19 mm)

手術 48 時間後、4%パラホルムアルデヒドにて脳を灌流固定後摘出した。摘出脳をパラフィン固定し、6 μ m 脳冠状切片を作成した。線条体領域(Bregma -0.4~0.8mm)および視床下部領域 (Bregma-2.6~-3.1mm) 切片をヘマトキシリン・エオジン(Hematoxylin Eosin: HE)染色し、壊死が生じているかどうかを判定した。

2) 深部視床下部動脈閉塞モデルの作成

中大脳動脈閉塞モデルと同様に、230~250g の雄 Wistar ラットを用いた。麻酔方法ならびに手術方法は同様に行った。内頸動脈・外頸動脈分岐部より、シリコンコーティング 4-0 ナイロン糸を約 15~16 mm 挿入した。

手術 48 時間後、4%パラホルムアルデヒドにて脳を灌流固定後摘出した。摘出脳をパラフィン固定し、6 μ m 脳冠状切片を作成し、HE 染色にて壊死部を同定した。

研究 2: ラット深部視床下部動脈閉塞モデルを用いた睡眠・覚醒サイクルの検索

230~250g の雄ラットを 90 分脳虚血群と Sham 群の 2 群 (各 n=5) とした。2%イソフルラン麻酔下、脳波電極を頭蓋骨に、筋電図電極を項部筋に装着した。90 分脳虚血群では、

シリコンコーティングしたナイロン糸(4-0)を内頸・外頸動脈分岐部より 15-16 mm 挿入し、90 分後ナイロン糸を抜去した。Sham 群では同様の外科的操作を行ったが、ナイロン糸は挿入しなかった。術後 5-7 日後、恒温・恒湿チャンバー内 (25°C、60%) にて暗期 (18 時~6 時) と明期 (6 時から 17 時) での終日脳波・筋電図を記録した。脳波・筋電図は 4 秒ごとに解析し、覚醒期、レム睡眠期、ノンレム睡眠期の睡眠ステージを SleepSign® Ver.2.0 を用いて判定した

研究 3: ラット中大脳動脈閉塞モデルを作成し、虚血・再灌流に脆弱である線条体と視床下部領域に存在するオレキシン細胞の虚血時間による影響を検討する。

1) オレキシン細胞の虚血時間による影響を検討する。

中大脳動脈閉塞モデルを作成する。中大脳動脈閉塞時間により、実験群を Sham (0 分) 群、15 分虚血群、30 分虚血群、60 分虚血群、90 分虚血群の 5 群に分類した。

シリコンコーティング 4-0 ナイロン糸を抵抗のあるところまで約 18 mm 挿入し中大脳動脈閉塞モデルとした。

虚血時間によりナイロン糸を抜去した後、48 時間後にイソフルラン 4%の深麻酔下で、右房切開により脱血して左室に留置したカニューラから 4%パラホルムアルデヒドにて脳を灌流固定後摘出した。摘出脳をパラフィン固定し、6 μ m 脳冠状切片を作成し、HE 染色にて壊死部を同定した。

近接する切片を用いてオレキシン免疫組織染色を行い、障害側と健常側におけるオレキシン細胞数を比較した。

2) 線条体と視床下部領域細胞の Tunel 染色および Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)染色による検討

中大脳動脈閉塞モデルを作成し、虚血時間により Sham (0 分)、15 分虚血群、30 分虚血群、60 分虚血群、90 分虚血群に分けた。虚血 48 時間後にラットを深麻酔し、左室から生食 500 ml にて灌流後、4%パラホルムアルデヒドにて脳を灌流固定した。48 時間後に脳を摘出した理由は、DNA fragmentation は虚血 30 分後に上昇しはじめ、24-48 時間後に peak に達し、それが 4 週間継続するからである。脳をパラフィンにて固定した後、6 μ m 脳冠状切片作成 した。線条体領域 (Bregma -0.4~0.8mm)および視床下部領域 (Bregma-2.6~-3.1mm) 切片を作成し、Tunel 染色および PARP 染色を行った。400 倍にて 1 視野毎に全細胞数を数え、その中の Tunel または PARP 陽性細胞の数を数えた。6 視野全細胞数および Tunel または PARP 陽性細胞数を計測しその割合を求めた。視床下部では脳弓周囲を計測した。統計はノンパラメトリック検定である Kruskal-Wallis 検定

を用い、多重比較には Bonferoni の不等式を用いた。P<0.005 を有意とした。

3) オレキシン細胞のアポトーシス変化

方法は上記の如く中大脳動脈閉塞モデルを作成し、視床下部領域 (Bregma-2.6 ~ -3.1mm) の 6 μ m 切片を作成した。オレキシン細胞と Tunel 染色またはオレキシン細胞と PARP 染色の二重染色を行い、虚血時間によりオレキシン細胞がどの程度アポトーシスに陥りやすいかどうかを検討した。Tunel 陽性または PARP 陽性オレキシン細胞は健側のオレキシン細胞で除してその割合を求めた。統計はノンパラメトリック検定である Kruskal-Wallis 検定を用い、多重比較には Bonferoni の不等式を用いた。P<0.005 を有意とした。

研究 4 : 線条体ならびに視床下部周辺 HMGB1 の虚血時間による出現変化

脳虚血モデルはラット 2 時間中大脳動脈閉塞モデルを作成し、再灌流後の脳摘出までの時間により以下の 5 群に分けた。

- ① 再灌流 1 時間群
- ② 再灌流 4 時間群
- ③ 再灌流 10 時間群
- ④ 再灌流 22 時間群
- ⑤ 再灌流 70 時間群

実験終了後、4%イソフルラン麻酔下でラットを麻酔し左心室より 100 ml の生理食塩水、次に 4% パラホルムアルデヒド 0.1 M リン酸バッファー(pH 7.4)溶液(PBS) 500 ml にて灌流した後、脳を摘出しパラフィンにて包埋した。マイクロトームにて切片を 6 μ m に切り、HE 染色または HMGB1 の免疫組織染色を行った。切片は 0.01 M クエン酸 (pH 8.5-9.0) 溶液中にて 30 分間 80°C で処理し、非特異的反応を除去するために無脂肪乾燥ミルク (Block Ace、大日本製薬) にて 30 分間処理した。

切片はヒツジ抗 HMGB1 ポリクローナル抗体(1,000 倍希釈、Santa Cruz)にて 24 時間一次処理した後洗浄し、ラビット抗ヒツジ抗体 (1,000 倍希釈、Vector) にて 1 時間 2 次処理を行った。PBS にて切片を洗浄後、avidin 標識西洋わさびペルオキシダーゼ複合体で処理した。ペルオキシダーゼの部位を同定するために、0.05% diaminobenzidine と 0.02% 過酸化水素で処理し発色させた。最後に Mayer の hematoxylin (武藤化学) にて核染色を行った。

研究 5 ラット脳室内に HMGB1 を投与し、睡眠・覚醒パターンにどのような影響を及ぼすかの検討

体重 280-330 g の雄 Wistar ラットを用いた。実験 5-7 日前に 2%イソフルラン麻酔下でラットを定位脳固定装置に固定し、側脳室内にステンレスチューブを留置した。ステンレスチューブの先端位置は

Paxinos-Watson の脳地図で Bregma -0.8 mm、外側 1.5 mm、深さ 4.0 mm とした。また、脳波・筋電図電極を設置し、歯科用セメントにて脳室内ステンレス管とともに固定した。

実験当日、ラットを 2%イソフルラン麻酔下で眠らせ、側脳室内ステンレス管より HMGB1 1,000 ng/5 μ l または生理食塩水 5 μ l を 1.5 分かけて注入した。麻酔時間は 5 分以内で終了した。注入後、ラットを恒温・恒湿チャンバー内に置き、脳波・筋電図を連続記録した。脳波・筋電図は 256 points/秒にて記録した。脳波および筋電図解析には SleepSign® Ver.3 (キッセイコムテック)を用い、記録開始 30 分から 3 時間分を解析した。睡眠・覚醒サイクルは覚醒期、REM 期、non-REM 期に分類し、3 時間に占める割合を対照群と HMGB1 注入群とで比較検討した。統計は一元配置分散分析を用い、多重比較には Tukey 法を用い p<0.05 を有意とした。

4. 研究成果

研究 1

1) 中大脳動脈モデルにおける虚血・壊死部位の同定

Bregma -0.4 mm



大脳皮質、線条体、淡蒼球にかけて広範囲梗塞巣が見られた。

Bregma -0.8 mm



外側視索前野、腹外側視索前野、視索上核にかけて広範囲梗塞巣が見られた。

Bregma -2.8 mm



大脳皮質、視床下部外側野、内側扁桃核にかけて 広範囲梗塞巣が見られた。

2) 深部視床下部動脈閉塞モデルにおける虚血・壊死部位の同定

Bregma -2.6~3.1 mm

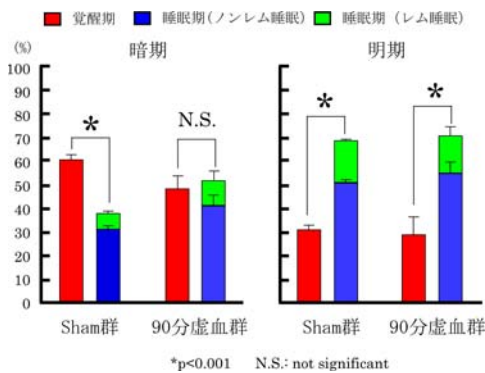


視床下部の脳弓 (fornix) 周囲部周辺 (:Pef) および線条体一部に壊死が見られた。

以上の結果より、中大脳動脈閉塞モデルおよび深部視床下部動脈閉塞モデルの作成が可能となった。

研究 2

齧歯類においては、暗期 (18 時~6 時) において覚醒している時間が睡眠時間を有意に上回る。すなわち、ラットは暗期において活動が活発である。一方、明期にはその活動を休止し、睡眠の時間が長い。今回、90 分虚血モデル群において、暗期における睡眠期の時間が覚醒期の時間と変わらなかった。このことは、90 分虚血により活動期における覚醒が障害されたと考えられる。



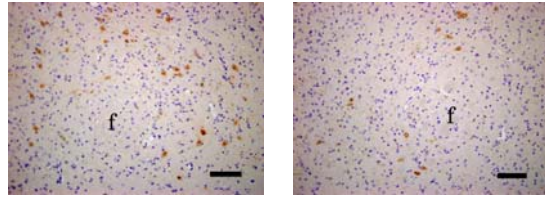
また、暗期における REM 睡眠時間ならびに non-REM 睡眠時間を Sham 群と 90 分虚血群を比較すると、いずれも有意ではなかった。以上の結果より、脳梗塞後には睡眠・覚醒サイクルの異常を来すことが明らかになった。

研究 3

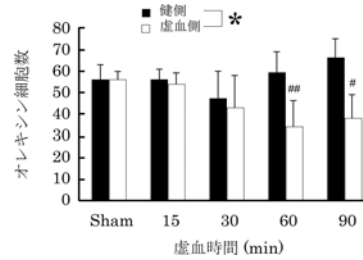
1) オレキシン細胞の虚血による影響

図 A 左は健側のオレキシン免疫組織染色によるオレキシンの脳弓周囲の分布 (f : fornix 脳弓) を示す。図 A 右は 90 分虚血側におけるオレキシンの脳弓周囲の分布を示す。(B) 虚血側で明らかなオレキシン細胞の減少が見られた。

(A)



(B)



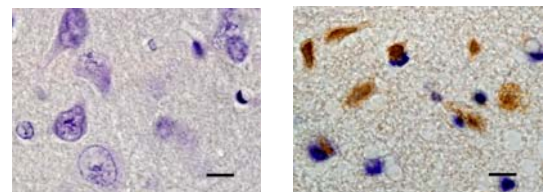
* $p < 0.001$ 二元配置分散分析にて 2 群間で有意。# $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ 対健側 一元配置分散分析の後、Dunnnett 法にて多重比較した。オレキシン細胞は虚血側において、60 分虚血から有意に減少した。

2) 線条体と視床下部領域細胞の Tunel 染色および PARP 染色による検討

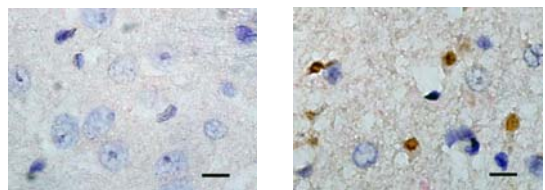
a) 線条体および視床下部における Tunel 染色

図 A 左は線条体健側の細胞を示す。図 A 右は 90 分虚血 48 時間後の Tunel 染色の典型例を示す。図 B 左は視床下部脳弓周囲部、図 B 右は 90 分虚血後の Tunel 染色を示す。

(A) 線条体



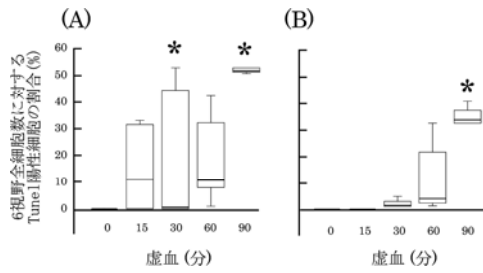
(B) 視床下部脳弓周囲部



図の右下にある線は 10 μm を表す。(x1000 倍)

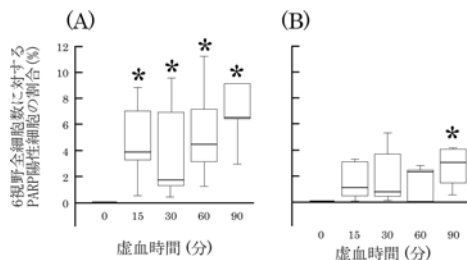
虚血 90 分群で線条体、視床下部脳弓周囲部に Tunel 陽性細胞が出現している。視床下部では虚血側はまだ健常細胞も存在している。

(C) 線条体および視床下部領域の虚血時間による Tunel 陽性細胞の出現



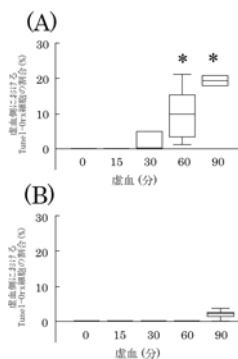
図カラム左側(A)は線条体、右側(B)は視床下部 Tunel 陽性細胞の全細胞数に対する虚血時間による割合をあらわす。カラム内の太線は中央値を示す。Tunel 染色を行ったところ、虚血を負荷しない群では Tunel 陽性細胞は全く見られないのに対し、線条体では 30 分で Tunel 陽性細胞が有意に出現したのに対し、視床下部領域では 90 分ではじめて Tunel 陽性細胞が出現した。

(D) 線条体および視床下部領域の虚血時間による PARP 陽性細胞の出現



図カラムの左(A)は線条体、右側(B)は視床下部 PARP 陽性細胞の全細胞数に対する割合を虚血時間による変化を示す。カラム内の太線は中央値を示す。PARP 染色を行ったところ、虚血を負荷しない群では PARP 陽性細胞は全く見られないのに対し、線条体では 15 分虚血から PARP 陽性細胞が有意に出現したのに対し、視床下部領域では 90 分ではじめて PARP 陽性細胞が出現した。以上の結果から、視床下部細胞は洗浄体細胞に比べてアポトーシスに陥りにくいことが判明した。

(E) オレキシン細胞と Tunel 染色およびオレキシン細胞と PARP 細胞の二重染色によるオレキシン細胞の虚血によるアポトーシス変化

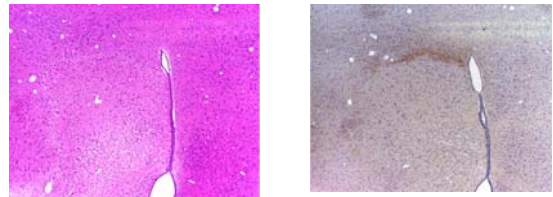


図(A)はオレキシンと Tunel 染色の二重染色陽性オレキシン細胞の虚血による変化、(B)はオレキシンと PARP 染色の二重染色陽性オレキシン細胞の虚血による変化をあらわす。オレキシン・Tunel 染色陽性細胞は虚血 60 分から有意に増加したが、オレキシン・PARP 染色陽性細胞はほとんどその増加はみられなかった。以上の結果から、オレキシン細胞は虚血に陥った場合、アポトーシスでの細胞死はほとんど見られないことが判明した。

研究 4 虚血・再灌流による線条体ならびに視床下部周辺の HMGB1 の虚血時間による出現変化

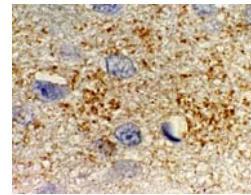
HMGB1 顆粒は虚血・再灌流後 1 時間で出現した。

(A)



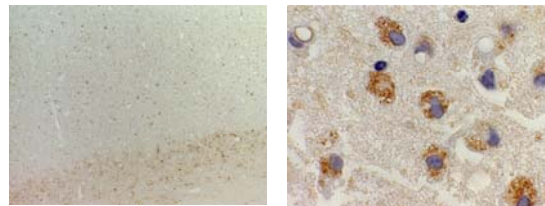
図(A)左は再灌流 4 時間後の脳摘出切片の HE 染色、右は HMGB1 免疫組織染色。切片は近接する視床下部領域。HMGB1 は視床下部領域の壊死部周辺、すなわちペナンプラ領域に集中して存在している。(x 200 倍)

(B)



(B)はペナンプラ領域の拡大図(1,000 倍)を示す。ペナンプラ周辺では、正常細胞と細胞質が空胞化し核が凝縮している細胞が混在し、その周辺に HMGB1 顆粒が見られる。

(C)



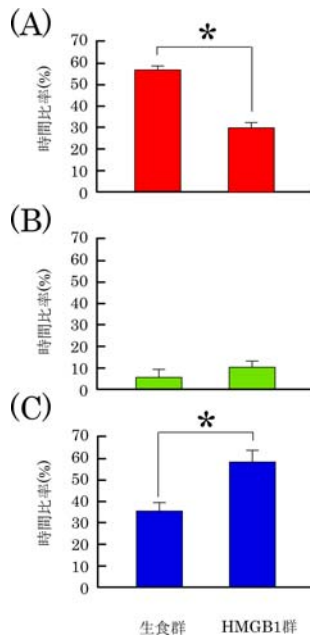
図(C)は再灌流後 70 時間後の HMGB1 免疫染色。図左(x 400 倍)はペナンプラと壊死部の図を示す。図(C)右(x 1,000 倍)は壊死部内で HMGB1 顆粒を含有する細胞が見られた。再灌流後 22 時間では見られなかったが、70 時間後では壊死部内に HMGB1 顆粒を含有する細胞が出現した。

以上の結果より、脳梗塞・再灌流モデルを用いた実験では、細胞崩壊とともに虚血・再

灌流後1時間でHMGB1顆粒が出現するのが確認され、特にペナンプラ領域にその集積がみられた。この結果は、ペナンプラ領域は脳虚血時に脳血流量がcriticalな部位であり、壊死部と健常部の境界領域であることからHMGB1がその後の炎症の発展の鍵を握ることが示唆された。

研究5 ラット脳室内投与 HMGB1 の睡眠・覚醒パターンに及ぼす影響

研究4の結果から、脳梗塞による虚血・再灌流時の脳内炎症の波及にHMGB1が大きな役割を果たしている事が示唆された。そこで、HMGB1がラットの睡眠・覚醒サイクルにどのような影響を及ぼすかについて検討した。



図はHMGB1または生理食塩水投与後3時間の覚醒期、REM睡眠期、non-REM睡眠期を比較検討した図である。(A)は覚醒期、(B)はREM睡眠期、(C)はnon-REM睡眠期を表す。

HMGB1を投与すると、生食群に比較して有意に覚醒期は短縮し、non-REM睡眠期は延長した。(p<0.001:1元配置分散分析)REM睡眠期は有意ではなかったが、やや延長する傾向が見られた。

以上の結果より、HMGB1は睡眠誘発作用を有することが明らかになり、脳梗塞後の睡眠・覚醒サイクル異常に少なくともHMGB1蛋白が関与することが示された。今後HMGB1による睡眠・覚醒サイクル異常のメカニズムの解明を行えば、脳血管障害による睡眠・覚醒障害の改善につながるものと考えられる。

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福田 悟、オレキシンの生体での多面性とその可能性、*麻酔*、56、2-8、2007. 査読有

②福田 悟、Zhu Z、森田茂穂、アセチルコリン覚醒システムにおけるオレキシンの役割—オレキシンのによる麻酔からの覚醒—、*麻酔*、56、19-29、2007. 査読有

③福田 悟、坂本英俊、蒲生早苗、小倉 舞、森田茂穂：自然睡眠・覚醒神経回路におけるオレキシンの役割—麻酔からの覚醒に関する神経ペプチド *Anesthesia 21 Century* 10: 1818-1826, 2008. (査読無し)

〔学会発表〕(計4件)

①小倉 舞、蒲生早苗、吉田淳子、福田 悟、森田茂穂、脳梗塞後の睡眠覚醒障害—ラット深部脳虚血モデルにおける検討—、日本麻酔科学会第54回学術集会、2007年5月31日 札幌

②坂本英俊、黒木佳奈子、桑名幸治、高橋隆一郎、福田 悟、森田茂穂、ラットの一過性脳虚血後において、脳のペナンプラ領域にHMGB1蛋白が早期に集積される、日本麻酔科学会第54回学術集会、2007年5月31日 札幌

③小倉 舞、蒲生早苗、坂本英俊、福田 悟、森田茂穂：ラット中大脳動脈閉塞・再灌流によるオレキシンの細胞壊死 日本麻酔科学会第56回学術集会 2008年6月12日 横浜

④ Ogura M、Fukuda S、Gamou S、Sakamoto H、Morita S、Sleep arousal disorder after hypothalamic infarction in rats. 2008 Annual Meeting of American Society of Anesthesiologists、2008年10月20日、Orlando, FL, USA

〔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〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 悟 (FUKUDA SATORU)
帝京大学・医学部・麻酔科・教授
研究者番号：30116751

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

①坂本 英俊 (SAKAMOTO HIDETOSHI)

帝京大学・医学部・麻酔科・講師
研究者番号：90349267

②森田 茂穂 (MORITA SHIGEHO)

帝京大学・医学部・麻酔科・教授
研究者番号：60143476