

平成 21 年 6 月 3 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18591619
 研究課題名（和文） 脳虚血後の環境要因が与える脳機能再生メカニズムの解明
 ：脳血流量と神経再生との関連
 研究課題名（英文） Gene expression and protein synthesis after transient focal ischemia
 under an enriched environment in rats
 研究代表者
 横田 千晶 (Chiaki YOKOTA)
 国立循環器病センター研究所・内科脳血管部門・医長
 研究者番号：80300979

研究成果の概要：

局所脳虚血ラットを、通常ケージで単独に飼育する群(Standard:S群)と運動器具が備えられた充実環境で飼育する群(Enrich:E群)に分けた。虚血前後と2、4週間後の神経・運動機能、脳における神経受容体機能（ベンゾジアゼピン受容体プローブ（^{123/125}IMZ）使用）、遺伝子、蛋白発現を両群で比較検討した。梗塞面積に両群で差はなかった。E群はS群に比べて、神経・運動機能は有意に改善、神経受容体機能は皮質梗塞周辺部において有意に高かった。梗塞周辺部の遺伝子発現は、E群がS群に比べbrain derived neurotrophic factor (BDNF)遺伝子発現が低下、BDNF蛋白は皮質の神経線維に発現しており、E群がS群に比し有意に発現が低下していた。BDNFは、環境刺激による脳神経機能回復に寄与している可能性がある。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,500,000	0	1,500,000
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	600,000	4,100,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科

キーワード：リハビリテーション、局所脳虚血、Enriched environment
Brain derived neurotrophic factor

1. 研究開始当初の背景

既に、局所脳虚血ラットを用いて、環境の充実が機能予後の改善をもたらすことが報告されている (Ohlsson AN, et al. 1995)。これに関連した脳組織の構造的変化として、非病巣側における神経樹状突起の発達 (Biernaskie J, et al. 2001) や虚血側海馬歯状回におけるアストロサイト/ニューロン比の増加 (Komitova M, et al. 2002) などが明らかにされた。関連遺伝子としては、glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)、brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Young D, et al. 1999)、insulin-like growth factor 1 (IGF-1, Trejo JL, et al. 2001)、vascular endothelial growth factor (VEGF, Fabel K, et al. 2003) などが挙げられている。その他、局所脳虚血ラットにおける環境の充実や運動は、側脳室周辺における神経幹/前駆細胞の増加と神経再生をひきおこしたという (Komitova M, et al. 2005)。一方、ヒト脳における内因性神経前駆細胞は極めて少なく、内因性神経前駆細胞のみでは脳梗塞後の十分な神経再生は不可能であるとの指摘もなされている (Roy NS, et al. 2000)。こうした研究より、脳卒中発症後の神経再生過程には、内因性神経幹/前駆細胞、種々の神経栄養因子が関連すると推察される。これらの発現や制御には、環境因子の他に、虚血の程度が重要な要因と考えられ、虚血発症後の脳血流量の評価は必須である。しかし、従来、この分野の研究においては、虚血後の脳血流変化についてはほとんど言及されていない。

2. 研究の目的

(1) 異なる環境下で飼育した一過性局所脳虚血ラットを用いて、環境の充実の有無による運動機能、脳血流分布、神経受容体分布、組織障害の程度、梗塞体積の差異を明らかにする。

(2) 環境の充実の有無による神経栄養因子などの組織修復過程に関与する遺伝子およびタンパク質の発現の差異を microarray analysis 等を用いて明らかにする。

(3) 運動機能、脳血流分布、神経受容体分布の変化を指標として、2) で明らかとなった、虚血後の機能回復関連遺伝子およびタンパク質に対して、経時的に RT-PCR, immunoblot 等を行い、その発現動態を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 動物モデル：ラットを用いた糸モデルによる中大脳動脈 1 時間閉塞再灌流モデルを用いる。

(2) グループ分け：局所脳虚血ラットは、虚血 24 時間後の神経スケール評価し、虚血 3 日後より、ランダムに割り付けにて、通常ケージで単独に飼育する群 (Standard:S 群) と運動器具が備えられた充実環境で飼育する群 (Enrich:E 群) に振り分ける。1 ケージには、S 群 1 匹、E 群 4~6 匹飼育する。

(3) ケージ：S 群：320 X 210 X 130mm、運動器具はない。E 群：610 X 460 X 460mm、ランニングホイール、トンネル、ボールなどを置き、これらの器具は週に 1~2 回の配置換えを行う。

(4) 神経、運動機能評価：虚血前、虚血後、環境群振り分け前、振り分け 2、4 週後。

① 神経学的スケール：Neurological

Severity Scores

② 運動機能 (inclined plane test : ICT) : 傾斜板上にラットを乗せ、姿勢保持が可能な角度を測定。3つの姿勢 (up-, left-, right-headed position) において、各々3回ずつ行う。

(5) バイオイメージングによる神経受容体機能評価 : 環境群振り分け2週後。

神経受容体機能 : ベンゾジアゼピン受容体プローブ ($^{123/125}\text{IMZ}$) を用いて動物用 SPECT/オートラジオグラフィ法により測定。

(6) 脳組織の分子生物学的検討 : 振り分け2, 4週後

① DNA microarray による E, S 群の遺伝子発現の違いの検討

② RT-PCR による①の確認

③免疫組織染色



E 群のケージ

4. 研究成果

(1) 神経、運動機能評価 : E, S 両群ともに環境刺激開始から2週間後の時点で、NSS, IPT において機能回復が認められたが、E 群では S 群に比べより有意な機能回復であった (NSS: $P < 0.01$, IPT: $P < 0.01$ [up-headed position], $P < 0.05$ [right-headed position])。

(2) 梗塞面積 : 2, 4 週いずれも両群で有意差はなかった。

(3) [^{125}I]IMZ を用いた in vitro ARG : 2 週

後の皮質梗塞周辺部における放射能の虚血側/正常側比を算出した結果、E 群では S 群に比べ、有意に高い [^{125}I]IMZ 結合能を認めた (1.20 倍 $P < 0.05$)。

(4) DNA microarray : E, S 両群の梗塞周辺皮質における遺伝子発現変化を評価した。両群の遺伝子発現比を算出したところ、E 群では S 群に比べ、brain-derived neurotrophic factor (BDNF), early growth response factor (Egr)-1, 2 遺伝子発現の低下傾向を認めた (BDNF: 0.72 倍, Egr-1: 0.76 倍, Egr-2: 0.67 倍)。さらに、これらの遺伝子発現変化を確認するため定量 RT-PCR を行ったところ、RT-PCR においても同様に発現低下が確認された (BDNF: 0.71 倍, Egr-1: 0.79 倍, Egr-2: 0.58 倍)。4 週後においても BDNF 遺伝子の発現が低下していたが Egr-1, Egr-2 遺伝子には変化が見られなかった。RT-PCR では BDNF およびその受容体の発現に有意差はなかった。

(5) 免疫組織染色の結果、BDNF 蛋白は皮質の神経線維に発現しており、E 群の梗塞周辺部皮質では S 群に比し有意に発現が低下していた。

(6) 考察

BDNF などの神経栄養因子は神経再生に促進的な役割を担う一方、その前駆体が神経細胞死を惹起したり、シナプスの長期抑制作用をもつことが指摘されている。これらの2つの働きは、前者に関しては mature 型の BDNF がその高親和性受容体である TrkB を介して引き起こす作用であり、後者に関しては、その前駆体である proBDNF が、その高親和性受容体である p75^{NTR} という受容体を介し、神経細胞のアポトーシスを引き起こすためと考えられている (Lu B. *et al.*, *Nat Rev Neurosci*, 6: 603-614, 2005)。Egr-1 についても、in vitro において、中枢由来の細胞の

アポトーシス誘導に Egr-1 が関与しているという報告がある (Copani A. *et al.*, *Neurochem Res*, 20: 611-616, 1995)。これらの報告から、BDNF, Egr-1 遺伝子の発現変化が機能回復に寄与する機序としては2つの可能性を考えた。1つめは、環境刺激によりこれらの遺伝子の発現が低下し、proBDNF, Egr-1 の発現量も低下して神経細胞のアポトーシスが抑制され、さらに虚血障害から生存した神経細胞のシナプス新生が亢進することで神経機能の回復に繋がる可能性、2つめは、mature BDNF, Egr-1 の発現が低下することで、虚血障害による梗塞周辺部の異常興奮が抑制されると同時に機能を失った神経細胞のターンオーバーを早め、シナプス新生が起りやすい環境を整える可能性がある。proBDNF はタンパク質への翻訳後に開裂を受けて mature BDNF となる。本研究において検討した DNA microarray, RT-PCR では、pro 型と mature 型を区別することができない。BDNF, Egr などの因子の発現変化が実際に機能回復に繋がるのか、また繋がるとすればどのようなメカニズムによるものなのかを解明するためには、BDNF 遺伝子の発現低下により、pro 型と mature 型のどちらが (相対的に) 減少しているのかを確認する必要がある。現在、Western blotting によって、pro 型と mature 型 BDNF 蛋白の検出を試みている。

以上より、核医学イメージングの手法を用いることで、環境刺激による脳神経機能の回復を局所的・定量的に評価できる可能性が示された。BDNF は、環境刺激による脳神経機能回復に寄与している可能性がある。

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1件)

1. Kuge Y, Katada Y, Simonaka S, Temma T, Kimura H, Kiyono Y, Yokota C, Minematsu K, Seki K, Tamaki N, Ohkura K, Saji H : Synthesis and evaluation of radioiodinated cyclooxygenase-2 inhibitors as potential SPECT tracers for cyclooxygenase-2 expression, *Nucl Med and Biology* 33:21-27, 2006

[学会発表] (計5件)

1. 生野雄二、横田千晶、久下裕司、井上裕康、小亀浩一、木戸慎介、原田晃名、堀田真理子、佐治英郎、峰松一夫 : Brain derived neurotrophic factor (BDNF) の発現低下は脳虚血後の環境刺激による神経機能回復に関係する : 第20回日本脳循環代謝学会総会 東京ドームホテル 東京都 2008年11月6-7日
2. Yokota C, Minematsu K, Tomii Y, Naganuma M, Ito A, Nagasawa H, Yamaguchi T : Low levels of plasma soluble receptor for advanced glycation end products are associated with severe neurological deficits at admission in acute stroke. The 4th Korean-Japanese Joint Stroke Conference, Fukuoka Japan Nov 21-23, 2008
3. Shono Y, Kuge Y, Yokota C, Harada A, Kido S, Kokame K, Inoue H, Hotta M, Saji H, Minematsu K : Decrease in brain derived neurotrophic factor expression is associated with functional recovery in an enriched environment after experimental

stroke. International Stroke Conference 2008, New Orleans, USA, Feb 20-22, 2008

4. Temma T, Kuge Y, Sano K, Obokata N, Kamihashi J, Kawashima H, Magata Y, Saji H : Evaluation of the effects of hypertension on cerebral metabolic functions after the onset of stroke in spontaneously hypertensive rats (SHR) 54th Annual Meeting of the Society of Nuclear Medicine, Washington DC, USA, June, 2007
5. Shono Y, Kuge Y, Yokota C, Kido S, Kokame K, Inoue H, Hotta M, Minematsu K, Saji H : Analysis of gene expression related to enrich environment after transient focal brain ischemia in rats. Brain '07 & BrainPET ' 07, Osaka, Japan, May 20-24, 2007

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横田 千晶

国立循環器病センター 研究所

内科脳血管部門・医長

80300979

(2) 研究分担者

久下 裕司

北海道大学

アイソトープ総合研究センター・教授

70321958

(3) 連携研究者

研究協力者

生野 雄二

聖マリア病院 脳血管内科
医師