

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07968

研究課題名(和文) 脳側副血行発達を標的とした遠隔虚血負荷による脳梗塞急性期治療手段の開発

研究課題名(英文) Collateral circulation as a therapeutic target of ischemic stroke

## 研究代表者

北川 一夫 (Kitagawa, Kazuo)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：70301257

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：遠隔虚血コンディショニング(RIC)は心臓と脳の保護戦略として注目されているがメカニズムは不明である。我々はRICが血管内皮機能を介して脳虚血時の側副血行路を発達させ、早期虚血病変と梗塞体積の両方を軽減すると想定し検証した。C57BL/6マウスを用いて左中大脳動脈(MCA)を露出させ永久閉塞した。RICは早期虚血性病変を縮小し脳軟膜動脈吻合血管径を拡大、梗塞体積を縮小した。RICは、eNOSとAktのリン酸化レベルを亢進させた。NOS阻害薬はRICによる早期虚血病変と梗塞体積縮小効果を消失させた。以上よりRICは、脳虚血時の側副血行を発達、早期虚血病変、梗塞体積を縮小する効果が示された。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

動物虚血モデルでの遠隔虚血コンディショニングの有効性がマウス中大脳動脈永久閉塞モデルで示され、さらにその機序として脳軟膜動脈吻合発達による虚血重症度の軽減が主であることが示された。ヒト脳梗塞症例において遠隔虚血コンディショニングを応用する際にその機序を踏まえプロトコルを組むことが重要と考えられ、本研究成果はヒト脳梗塞を対象とした臨床試験を実施するに際して有益な情報を与えると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that remote ischemic conditioning (RIC) enhances collateral circulation through endothelial activation and mitigates ischemic injury. Methods: We tested RIC and sham procedure 30 min after middle cerebral artery occlusion (MCAO) in mice. Immediately after RIC, early lesions on MRIDWI and pial collateral vessels were examined. The infarct volume was examined until 48 h after daily RIC. We assessed the phosphorylation level of eNOS and p-Akt in the ischemic hemisphere. Finally, the effects of NOS inhibitors were examined in mice treated with RIC after MCAO. Results: RIC diminished early ischemic lesions and enlarged pial collaterals after MCAO. RIC also mitigated infarct volume up to 48 h after MCAO. RIC upregulated the phosphorylation of eNOS and Akt. eNOS inhibitors abolished the beneficial effect of RIC. Conclusions: RIC could enhance pial collateral circulation and diminish infarct volume. Activation of endothelial function could underlie the beneficial effects of RIC.

研究分野：脳神経内科

キーワード：遠隔虚血コンディショニング 脳梗塞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

遠隔虚血コンディショニング(Remote ischemic conditioning:RIC)は、標的臓器から離れた遠隔組織(通常四肢)に虚血負荷を行い虚血侵襲から保護する戦略である。脳虚血に対する RIC の保護効果は実験的脳卒中モデルで報告されヒト脳梗塞患者を対象とした臨床研究も進行している。しかし RIC の治療標的があきらかではなく臨床試験のプロトコールも様々であり一貫した有益性が示されていない。研究開始時点で RIC による脳保護効果には神経刺激、液性因子および免疫調節の関与が想定されていた。

### 2. 研究の目的

本研究では RIC が脳虚血時の側副血行路を発達させ、早期虚血病変および梗塞体積を軽減するという仮説を証明することを目的とした。また、RIC の脳保護効果の機序として脳血管内皮機能改善を念頭に置き内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) の関与についても検討した。

### 3. 研究の方法

C57BL/6 雄マウスを用いて左中大脳動脈(MCA)を露出させ永久閉塞した。手術中の脳皮質血流(CBF)をレーザードプラ血流計でモニターした。RIC 群は、MCA 閉塞 30 分後から両側下肢鼠径部にマウス用カフを用いて 200mmHg の圧を負荷し 5 分間駆血、5 分間解放を 4 回反復した。対照として遠隔虚血負荷なし麻酔下で観察した群を Sham 群とした。実験 1:MCA 閉塞後 RIC または偽処置を行った直後に MRI を用いて拡散強調画像(DWI)を撮像し早期虚血病変を評価した。その後墨汁加ラテックス溶液を左心室より注入し脳軟膜動脈吻合血管を観察した。実験 2:MCA 閉塞後 RIC または偽処置を 1 日 1 回行い 24 時間後と 48 時間後に神経症状を観察後、脳を摘出し TTC 染色を用いて梗塞体積を評価した。実験 3:eNOS および Akt のリン酸化レベルをウエスタンブロッティング(WB)法により評価した。MCA 閉塞後 RIC または偽処置を行った直後に虚血性大脳皮質を摘出した。対照として RIC または偽処置を行った非虚血マウスを準備した。脳組織サンプルは大脳皮質の MCA 灌流中心部から採取した。実験 4:RIC の効果に対する一酸化窒素合成酵素(NOS)の関与を調べるために MCA 閉塞直後に生食または NOS 阻害剤である L-NIO または L-NAME を腹腔内投与した。RIC または偽処置後直後に DWI を撮像し 24 時間後に脳を摘出し TTC 染色より梗塞体積を評価した。

### 4. 研究成果

実験 1:虚血周辺部の CBF は MCA 閉塞直後では RIC 群、Sham 群で  $46.7 \pm 7.8\%$ 、 $47.9 \pm 5.7\%$  と同様に低下していたが Sham 群の偽処置後では CBF は  $47.3 \pm 9.0\%$  で低値のままだったのに対して、RIC 群では RIC 終了時に  $63.7 \pm 15.3\%$  に有意に増加していた。早期虚血病変は Sham 群では、線条体から皮質に拡大していたが、RIC 群ではコア領域に限定される傾向があった。ADC map 体積は Sham 群と RIC 群で  $46.5 \pm 4.3\text{mm}^3$ 、 $35.6 \pm 4.8\text{mm}^3$  で RIC 群で有意に縮小していた。軟髄膜吻合血管径は Sham 群と RIC 群で  $25.6 \pm 2.1 \mu\text{m}$ 、 $30.1 \pm 2.2 \mu\text{m}$  で RIC 群で有意に拡大していた。脳軟膜動脈吻合血管径は ADC map 体積と密接に相関していた。実験 2:MCA 閉塞 24 時間後、48 時間後の神経学的スコアは 2 群間で有意差はなかったが RIC 群で低い傾向があった。梗塞体積は 24 時間後で Sham 群と RIC 群で  $44.3 \pm 4.6\text{mm}^3$ 、 $32.4 \pm 5.3\text{mm}^3$  で RIC 群で有意に縮小していた。48 時間でも Sham 群と RIC 群で  $48.2 \pm 5.9\text{mm}^3$ 、 $35.6 \pm 8.6\text{mm}^3$  で RIC 群で有意に縮小していた。実験 3:eNOS と Akt のリン酸化発現レベルは非虚血に比べて MCA 閉塞で低下する傾向があった。MCA 閉塞の RIC 群は Sham 群に比べて e-NOS および Akt のリン酸化レベルが亢進していた。実験 4:生理食塩水投与群での Sham 群と RIC 群で早期虚血病変は  $47.0 \pm 5.2\text{mm}^3$ 、 $35.1 \pm 4.9\text{mm}^3$  で RIC 群で有意に縮小しており梗塞体積も  $46.6 \pm 5.2\text{mm}^3$ 、 $33.7 \pm 4.0\text{mm}^3$  で有意に縮小していた。L-NIO 投与群での Sham 群と RIC 群で早期虚血病変は  $48.2 \pm 4.0\text{mm}^3$ 、 $44.3 \pm 7.0\text{mm}^3$  で差はみられず、梗塞体積も  $48.5 \pm 6.0\text{mm}^3$ 、 $45.9 \pm 6.9\text{mm}^3$  で差はみられなかった。L-NAME 投与群でも Sham 群と RIC 群で早期虚血病変は  $43.9 \pm 3.5\text{mm}^3$ 、 $44.0 \pm 1.3\text{mm}^3$  で差はみられず、梗塞体積も  $42.6 \pm 5.9\text{mm}^3$ 、 $42.7 \pm 2.8\text{mm}^3$  で差はみられなかった。以上の結果より RIC による虚血病変縮小効果は NOS 阻害薬により消失することが示された。

RIC の臓器保護効果には液性因子、神経性因子など各種の関与が想定されているがその詳細や治

療標的が明らかではなかった。そのことがこれまでの臨床研究でのプロトコール作成を困難にして一貫した有効性も示すことができなかつた一因と考えられる。今回我々は RIC の標的として脳側副血行促進に着目しマウス中大脳動脈永久閉塞モデルで検証し脳側副血行促進、灌流領域周辺部脳血流増加、早期虚血病変サイズの縮小、梗塞体積の縮小を明らかにしさらに eNOS リン酸化、eNOS 機能の関与を WB 法、阻害剤を用いた研究で明らかにした。本研究結果はヒト脳梗塞で RIC を臨床応用する際に参考となる情報を提供したと考えている。

結論として RIC は、中大脳動脈閉塞時の側副血行路を発達させ、早期虚血病変および梗塞体積を縮小させる効果があることが示された。また RIC の脳保護作用には eNOS リン酸化を介した血管内皮機能が関与することが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Saito M, Ishizuka K, Hoshino T, Toi S, Kitagawa K.	4. 巻 97
2. 論文標題 Leptomeningeal anastomosis and early ischemic lesions on diffusion-weighted imaging in male murine focal cerebral ischemia.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 752-759
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jnr.24403	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 齋藤萌子、北川一夫
2. 発表標題 マウス中大脳動脈永久閉塞モデルにおける遠隔虚血コンディショニングの効果
3. 学会等名 第47回日本脳卒中学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤萌子、北川一夫
2. 発表標題 マウス中大脳動脈永久閉塞モデル遠隔虚血コンディショニングにおける eNOS、Aktリン酸化の関与
3. 学会等名 第64回日本脳循環代謝学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齋藤萌子、石塚健太郎、星野岳郎、北川一夫
2. 発表標題 遠隔虚血コンディショニングにおける一酸化窒素合成酵素の関与
3. 学会等名 第63回日本脳循環代謝学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 齋藤萌子、石塚健太郎、星野岳郎、北川一夫
2. 発表標題 Leptomeningeal anastomosis and early ischemic lesions on diffusion-weighted imaging in murine focal cerebral ischemia.
3. 学会等名 The 29th International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤萌子、石塚健太郎、星野岳郎、北川一夫
2. 発表標題 中大脳動脈永久閉塞モデルにおける遠隔虚血コンディショニングの効果
3. 学会等名 第62回日本脳循環代謝学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北川一夫
2. 発表標題 脳卒中克服を目指して実践してきた30年間の基礎、臨床研究のあゆみー次世代へのメッセージー
3. 学会等名 第44回日本脳卒中学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北川一夫
2. 発表標題 Brain protection against ischemic injury; Collateral circulation as a potential therapeutic target - "
3. 学会等名 The 29th International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 北川一夫	4. 発行年 2021年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 6
3. 書名 神経保護・神経再生療法	

1. 著者名 園生雅弘 北川一夫 青木正志	4. 発行年 2021年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 380
3. 書名 神経疾患最新の治療 2021-2023	

〔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
---------	---------