

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09336

研究課題名(和文) 低体温療法の分子機序の解明に基づいた甲状腺ホルモンの脳神経保護効果の実験的検証

研究課題名(英文) Evaluation of effect of thyroid hormone on neuronal injuries following transient cerebral ischemia in mice

研究代表者

道志 勝 (Doshi, Masaru)

帝京大学・薬学部・講師

研究者番号：30392385

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究によりトリヨードチロニン(T3)の投与がマウス脳虚血再灌流後の海馬神経細胞死を増悪させることが判明した。また、このとき海馬GFAPおよびIba1のタンパク質発現量がT3投与により用量依存的に増加することがわかった。つまり、T3は脳虚血再灌流後の海馬における炎症反応を亢進させ、神経細胞死の発生を増悪していることを明らかにした。さらに、海馬TGF- β 1 mRNA発現を解析したところ、T3投与により用量依存的にmRNAの発現量が低下していることがわかった。つまり、TGF- β 1遺伝子発現の抑制による神経保護効果の低下が、T3投与による脳虚血再灌流障害の悪化の原因のひとつである可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではT3投与がマウス脳虚血再灌流後の海馬神経傷害を悪化させることを明らかにした。つまり、体内のT3濃度が高いと脳卒中後遺症がより重度になる可能性が示唆された。一方、脳虚血は脳外科手術などでもみられるため、今回の研究成果は、周術期の脳神経保護の観点から、甲状腺機能亢進症患者や甲状腺ホルモン製剤を服用している甲状腺機能低下症患者の血中T3濃度に対する十分な管理が必要であることを示唆するものであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In mice, global cerebral ischemia (GCI) causes neuronal injuries after reperfusion in the hippocampus. In this study, we examined the effect of T3 administration on DNA fragmentation induced by neuronal death and the activation of inflammatory cells such as astrocytes and microglia in the hippocampus following GCI. The content of nucleosomes generated by DNA fragmentation in the hippocampus was increased by GCI and further increased by T3 administration. The protein expression levels of GFAP and Iba1 in the hippocampus were also increased by GCI and further increased by T3 administration. Our results indicate that T3 administration aggravates GCI-reperfusion injury in mice. We also demonstrated that T3 administration inhibited the gene induction of TGF- β 1 in the hippocampus following GCI. Therefore, the inhibition of TGF- β 1 expression might be one of the reasons for aggravation of neuronal injuries by additional T3 administration.

研究分野：生化学

キーワード：甲状腺ホルモン マウス脳虚血モデル 海馬神経細胞死

1. 研究開始当初の背景

脳の血流が悪くなり、酸素や栄養が不足している状態を脳虚血という。何らかの原因で心停止に陥ると脳虚血が引き起こされ、できる限り早く血流を再開させないと神経細胞が死滅し、蘇生しても重度の後遺症が残る可能性が高い。このような脳の障害を防ぐ手段のひとつとして体温を下げる低体温療法が有効である。しかしながら、低体温療法による脳神経保護効果の分子機序は解明されておらず、臨床においても病態の複雑性や重症度などが一定ではないため冷却の方法、時間および温度など標準的なプロトコルの確立には至っていない。実験的には、マウスやラットの左右の総頸動脈を一時的に閉塞し、一定時間後に血流を再開させる一過性の脳虚血モデルが、血流再開後に海馬において神経細胞死が発生するため、心停止蘇生後の脳障害モデルとして利用されてきた。現在、低体温療法は実験的に最も脳神経保護効果を発揮する治療法である。申請者は以前、マウス脳虚血モデルにおいて、脳虚血中の低体温が、血流再開3日後に海馬で神経細胞死が発生するのを完全に阻止することを定量的評価により明らかにした。脳虚血中の低体温は、血流再開後の神経細胞内で起こるグルタミン酸受容体や TNF- 受容体を介した細胞障害など細胞死に関わる様々な反応を幅広く抑制していることが明らかにされているものの、これといった明確な機序の解明には至っていない。これは見方を変えれば、脳虚血中から血流再開直後にかけての比較的早い段階で細胞死の進行を制御している機構が存在しており、低体温による何らかの変化がその機構に働いていると推測できる。

甲状腺ホルモンは、脳の発生や形態形成、さらに様々な中枢神経機能に深く関与する。つまり、甲状腺ホルモンは、生体の発育を促し、生きていく上では欠かせない。実際に、先天的に甲状腺機能が低下している小児では、低身長や知能・精神の発達障害がみられる。成人においても甲状腺機能が低下すると精神活動が低下して抑うつ状態となり、記憶力も衰える。一方、甲状腺ホルモンは、体温調節にも深く関わっており、寒冷環境では甲状腺ホルモンの分泌量が増加することが知られている。これは、全身の代謝反応を促進させて熱産生量を増加することで体温の低下を防ぐためであるが、実はこの体温を低下させた際に起こる甲状腺ホルモンの分泌量の増加によって脳神経保護効果が発揮されているのではないかと推測した。

2. 研究の目的

マウス脳虚血モデルにおいて、甲状腺ホルモンを積極的に投与することで神経細胞死の発生が阻止されるか否かを評価し、甲状腺ホルモンによる神経保護効果が低体温療法の分子機序となりうる可能性を明確にする。

3. 研究の方法

(1) トリヨードチロニン (T_3) およびチロキシン (T_4) の投与がマウス脳虚血再灌流後の神経細胞死の発生に及ぼす影響の評価

雄性 C57BL/6J マウスに T_3 を 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ あるいは T_4 を 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 腹腔内投与した(対照群には Vehicle を投与)。それぞれ投与 30 分後、1.5% イソフルラン吸入麻酔下でマウスの両側総頸動脈 (BCCA) を血管狭窄用クリップで閉塞し、15 分後クリップを外して血流を再開させた(脳虚血再灌流群)。対照群は BCCA 閉塞のみを行わず同様の手術を行った (Sham 群)。再灌流 3 日後の海馬を摘出し、細胞死の際に DNA の断片化によって生成されたヌクレオソームの含量を Cell death detection ELISA kit を用いて測定し、神経細胞死の発生を定量評価した。

(2) T_3 がマウス脳虚血再灌流後の神経炎症に及ぼす影響の評価

雄性 C57BL/6J マウスに T_3 を 5 ならびに 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ となるように腹腔内投与した。(1) と同様に脳虚血再灌流群と Sham 群のマウスを作成した。再灌流 3 日後のマウス海馬を摘出し、ウエスタンブロット法により GFAP (アストロサイトのマーカー) および Iba1 (ミクログリアのマーカー) の発現量を解析し、炎症反応の評価を行った。

(3) T_3 がマウス脳虚血再灌流後の海馬サイトカイン遺伝子発現に及ぼす影響の評価

雄性 C57BL/6J マウスに T_3 を 5 ならびに 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ となるように腹腔内投与した。(1) と同様に脳虚血再灌流群と Sham 群のマウスを作成した。再灌流 3 日後のマウス海馬の総 RNA を抽出し、RT-リアルタイム PCR 法により、TNF-、IL-1、IL-6、TGF- β 1 の mRNA 発現量を解析した。

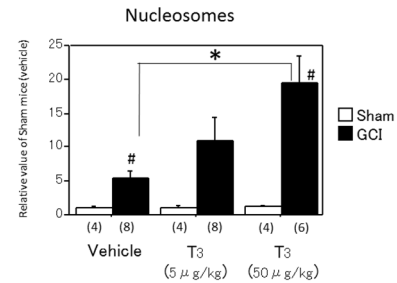
(4) T_3 投与がマウス脳虚血再灌流後の血清および海馬 T_3 濃度に及ぼす影響の評価

雄性 C57BL/6J マウスに T_3 を 5 ならびに 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ となるように腹腔内投与した。脳虚血再灌流 1 時間後の血清および海馬を採取した。血清および海馬中の T_3 濃度は市販のエンザイムイムノアッセイキットを用いて測定した。

4. 研究成果

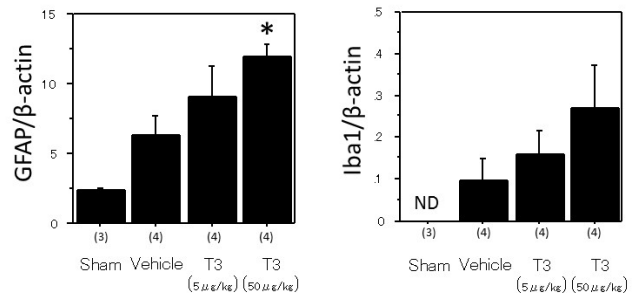
(1) トリヨードチロニン (T₃) およびチロキシン (T₄) の投与がマウス脳虚血再灌流後の神経細胞死の発生に及ぼす影響の評価

Sham 群のヌクレオソーム含量は T₃、T₄ いずれの投与量も Vehicle 群と差がなかった。脳虚血再灌流群のヌクレオソーム含量は、T₃ 投与によって用量依存的に増加し、50 μg/kg では有意に増加していた。一方、T₄ 投与を投与しても脳虚血再灌流群のヌクレオソーム含量は増加しなかった。以上の結果から、T₃ は脳虚血再灌流後の海馬神経細胞死を増悪させることが判明した。



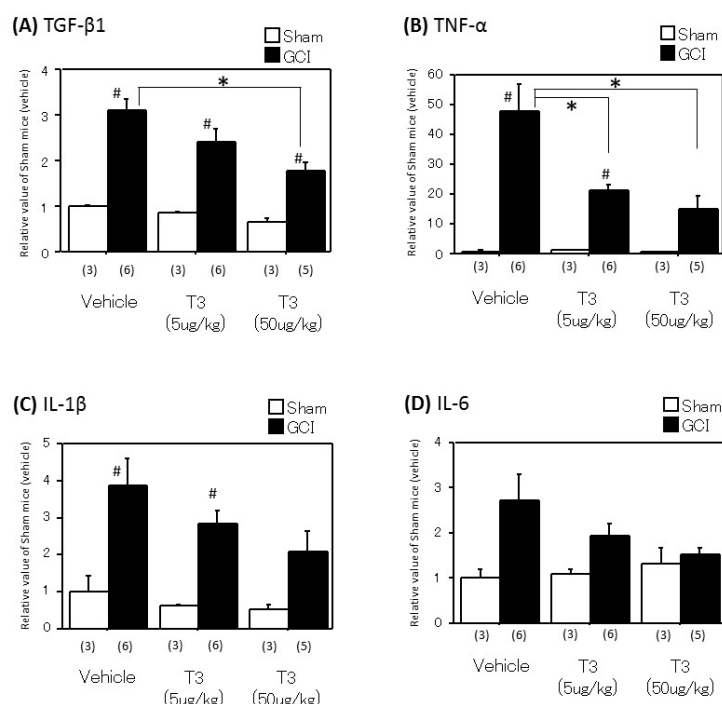
(2) T₃ がマウス脳虚血再灌流後の神経炎症に及ぼす影響の評価

T₃ を 5 μg/kg および 50 μg/kg 投与した群の GFAP 発現量は、Vehicle 群に比べて用量依存的に増加傾向であり、T₃ を 50 μg/kg 投与した群の GFAP 発現量は、Sham 群に比べて有意に増加していた。Sham 群では Iba1 の発現は検出されなかったが、脳虚血再灌流群では Iba1 の発現が検出された。T₃ を 5 μg/kg および 50 μg/kg 投与した群の Iba1 発現量は、Vehicle 群に比べて用量依存的に増加傾向であった。つまり、T₃ 投与により、脳虚血再灌流後の海馬における神経炎症が亢進していることが判明した。



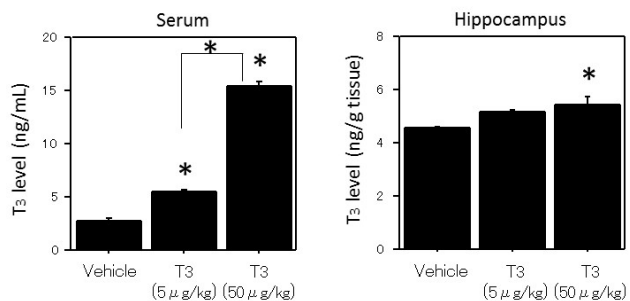
(3) T₃ がマウス脳虚血再灌流後の海馬サイトカイン遺伝子発現に及ぼす影響の評価

Sham 群の mRNA 発現量は T₃ のいずれの投与量も Vehicle 群と差がなかった。脳虚血再灌流群の TGF-β1 mRNA 発現量は、Sham 群に比べて有意に高かったが、T₃ 投与により用量依存的に減少し、50 μg/kg 投与群では Vehicle 群に比べて有意に減少していた。また、TNF-α、IL-1β、IL-6 の mRNA 発現量も似た傾向を示した。以上の結果から、TGF-β1 遺伝子発現の抑制による神経保護効果の低下が、T₃ 投与により脳虚血再灌流後の神経障害が悪化する原因のひとつである可能性が示唆された。しかしながら、TNF-αをはじめとする炎症性サイトカインの発現解析からは、T₃ 投与による脳虚血再灌流障害の悪化を説明することができなかった。脳虚血再灌流障害に対するサイトカインの役割については、より詳細な検討が必要である。



(4) T₃投与がマウス脳虚血再灌流後の血清および海馬 T₃濃度に及ぼす影響の評価

再灌流 1 時間後の血清中 T₃濃度は、Vehicle 群に比べて、5 μg/kg 投与群および 50 μg/kg 投与群で有意に上昇していた。また、50 μg/kg 投与群の血清中 T₃濃度は、5 μg/kg 投与群に比べて有意に高かった。海馬 T₃濃度は、Vehicle 群に比べて 5 μg/kg 投与群では有意差はなかったが、50 μg/kg 投与群で有意に上昇していた。以上の結果から、T₃投与により血清および海馬において用量依存的に T₃濃度が上昇していることがわかった。つまり、投与した T₃が血清および海馬で増加し、脳虚血再灌流後の海馬における神経炎症を亢進させ、神経細胞死の発生を増悪させることが示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Masaru Doshi, Shiro Watanabe, Yujin Natori, Makoto Hosoyamada, Yutaka Hirashima-Akai	4. 巻 44
2. 論文標題 Triiodothyronine Aggravates Global Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioiological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1824-1831
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b21-00424	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 -

1. 著者名 道志 勝	4. 巻 53
2. 論文標題 低体温療法の分子機序解明に向けた基礎研究の現状と展望	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 62-65
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 道志 勝、渡辺 志朗、名取 雄人、細山田 真、赤江 豊
2. 発表標題 甲状腺ホルモン投与がマウス脳虚血再灌流後の海馬TGF- β 1遺伝子発現に及ぼす影響
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 道志勝、渡辺志朗、名取雄人、細山田真、赤江豊
2. 発表標題 マウス脳虚血再灌流後の神経細胞死の発生に対するトリヨードチロニンの悪化作用
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 道志勝、渡辺志朗、名取雄人、細山田真、赤江豊
2. 発表標題 甲状腺ホルモンがマウス脳虚血再灌流後の神経細胞死の発生に及ぼす影響
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔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
---------	---------