

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390380

研究課題名（和文）脳電気刺激による神経保護効果のメカニズムの解明と臨床応用への基礎的研究

研究課題名（英文）The study to reveal the neuroprotective mechanisms induced by electrical stimulation of the brain

研究代表者

山本 清二 (YAMAMOTO SEIJI)

浜松医科大学・光量子医学研究センター・准教授

研究者番号：60144094

研究成果の概要（和文）：小脳室頂核電気刺激による神経保護のメカニズム解明のためラットで研究を行い、1時間の刺激後72時間において：(1) 中大脳動脈閉塞後24時間の脳梗塞巣体積が22%縮小（神経保護効果）し；(2) ミトコンドリア蛋白であるUncoupling Protein 4 (UCP4)の脳内発現（蛋白とmRNAレベル）が増加；(3) UCP4を抑制するsiRNA脳室内投与で刺激後のUCP4の発現が抑制され、虚血耐性が消去傾向にあり、UCP4が神経保護効果をもたらしていると結論づけた。

研究成果の概要（英文）：We tried to reveal the neuroprotective mechanisms induced by the electrical stimulation of cerebellar fastigial nucleus (FN) in rats. 1h-FN stimulation decreased, 72h later, the infarct volume by 22%. 1h-FN stimulation increased, 72h later, mRNA level of uncoupling protein 4 (UCP4), a mitochondria protein, to 160% in the brain. Intra-ventricular injection of siRNA decreased the UCP4 mRNA level, and tended to abolish the neuroprotection induced by FN stimulation. Following FN stimulation, up-regulation of UCP4 may be a component of the endogenous neuroprotective mechanisms.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 20 年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
平成 21 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
平成 22 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：脳血管障害、虚血耐性、脳電気刺激、ミトコンドリア蛋白、トランスレーショナルリサーチ

### 1. 研究開始当初の背景

生体には低酸素や血圧低下（ショック）に対して血圧を上昇させ脳血流を増加させる防御反応（diving response：イルカなど水中に長く潜る哺乳類にみられる潜水中の血圧・脳血流調節のような反応）がある。これに関係する小脳室頂核（FN, cerebellar fastigial nucleus）の電気刺激をラット中大脳動脈（MCA）閉塞後に行くと、control に比べて脳梗塞を約 50%縮小させるという事実は、1991 年 Reis DJ らにより世界で初めて報告された（*JCBFM* 11:810, 1991）。申請者の山本は、Reis の研究室（米国 Cornell 大学）でそのメカニズムの解明に関する研究を行い、それが脳血流や脳代謝の変化とは無関係であり、1 時間の電気刺激が 72 時間後をピークとして 3 週間まで持続する、すなわち FN 電気刺激により大脳に広範囲な虚血耐性が獲得できることを発見し報告した（*JCBFM* 13:1020, 1993; *Neurosci Lett* 210:181, 1996; *Brain Res* 780:161, 1998）。神経保護のメカニズムに関しては、FN 刺激が実験動物やヒトにおける seizure の閾値を上昇させるなど古い報告があるが、そのメカニズムに関しては解明されていない。最近になり、FN 刺激によりミトコンドリア機能が aerobic から anaerobic に変化している可能性を考え、ミトコンドリア蛋白に注目して本研究を立案した。

### 2. 研究の目的

生体内イメージング法による病態解明を、FN 電気刺激による神経保護効果のメカニズムの解明に応用し、さらにその結果を臨床応用するための translational research を行うことを目的とする。具体的には、ミトコンドリア蛋白の一つである Uncoupling Protein 4 (UCP4) に焦点を当て、以下を検討する。

- (1) FN 電気刺激で UCP4 が刺激に依存して発現しているか。
- (2) UCP4 の発現により神経細胞は虚血耐性を獲得できるか。
- (3) 電気刺激と UCP4 発現の間に介在するメカニズムは何か。
- (4) UCP4 発現を end point として他の方法で臨床応用可能な治療法が無いか。

FN 電気刺激は、その侵襲性から考えると臨床応用には不適である。創薬にその方向を求

めるのは今後の課題として、当該研究では電気刺激など物理的な方法による神経保護を目指し、神経源性に diving response を引き起こす脳内ネットワークを刺激する他の方法（より臨床応用しやすい方法）で、同様の神経保護効果を得ることはできないかを検討する。

神経保護のメカニズムが解明されれば、多くの方法による虚血耐性のメカニズムの解明につながる可能性が高く、新規の脳虚血治療に新たな展開をもたらす。さらに脳虚血のみならず、パーキンソン病に対する深部脳電気刺激療法の神経保護作用のメカニズムの解明にもつながる可能性が極めて高い。また UCP の研究は神経保護効果の他に、anti-obesity mechanism に関する新知見が得られる可能性がある。

### 3. 研究の方法

(1) FN 電気刺激により（我々の実験系で）neuroprotective かどうか。

- ① FN 電気刺激の脳梗塞巣の体積への影響  
1h-FN 電気刺激後 72h で、顕微鏡下に中大脳動脈(MCA)を凝固後に切断して永久閉塞させ (permanent focal ischemia を作製し)、24h 後に脳梗塞巣を Nissl 染色スライスで計測し、梗塞巣の体積を検討する。

(2) FN 電気刺激によりで UCP4 が刺激依存性に発現しているか。

- ① FN 刺激特異的な蛋白レベルでの UCP4 発現の確認

1h-FN 電気刺激後 72h（もっとも neuroprotective になる時間）で、western blotting により大脳皮質 UCP4 の蛋白レベルでの発現を検討する。

- ② FN 刺激特異的な mRNA レベルでの UCP4 発現の確認

1h-FN 電気刺激後 72h で、quantitative RT-PCR により大脳皮質 UCP4 の mRNA レベルでの発現を検討する。

- ③ FN 刺激後の時間と mRNA レベルでの UCP4 発現の関係

1h-FN 電気刺激後 6h、24h、48h、72h 後の mRNA レベルでの UCP4 発現を quantitative RT-PCR により評価し、刺激後の時間と、mRNA レベルでの UCP4 発現の経過を検討する。

- ④ 蛍光蛋白による個体レベルでの UCP4 発現の観察

長波長で生体内での検出が容易で、緑色の

脳の自家蛍光と重ならない赤色蛍光蛋白 (tdTomato) をレポーター(UCP4 が発現すれば同時に tdTomato が発現するようプローブデザインする)として、蛍光蛋白の蛍光像を撮影することにより FN 刺激による UCP4 発現を生体内(脳内)で検出する。これにより脳スライスでの発現程度の差異も部位別に検討できる。

⑤ transgenic rat 作製による個体レベルでの UCP4 発現の観察

FN 刺激や脳血流の過去の研究はラットでなされたためマウスは用いない。UCP4 が発現する場合には、同時に tdTomato が発現するよう遺伝子操作を加えたラットを作製するため、上記 tdTomato のレポータープローブの結果を踏まえて作製 (UNITECH に外注) する。

(3) siRNA により UCP4 発現が抑えられ、FN 電気刺激による neuroprotection が消失するか。

① siRNA により UCP4 発現が抑えられるか否か

siRNA を 3 種類 4  $\mu$ l ずつ (計 12  $\mu$ l) + RNAiMAX 3  $\mu$ l を 1 回脳室内投与群と、siRNA を 3 種類 8  $\mu$ l ずつ (計 24  $\mu$ l) + RNAiMAX 6  $\mu$ l を 3 回 (夕、朝、夕) 脳室内群とで、1h-FN 電気刺激を行い 72h 後に脳を摘出して両側大脳皮質における mRNA レベルでの UCP4 発現を quantitative RT-PCR により評価する。

② siRNA により FN 電気刺激による neuroprotection が消失するか否か

siRNA を 3 種類 8  $\mu$ l ずつ (計 24  $\mu$ l) + RNAiMAX 6  $\mu$ l を 3 回 (夕、朝、夕) 脳室内群とで、1h-FN 電気刺激を行い 72h 後に MCA を閉塞し、24h 後に MRI T2-WI により脳梗塞の体積を算出。MRI 撮影後にラットを sacrifice し梗塞巣を評価したラットで quantitative RT-PCR により大脳皮質 UCP4 の mRNA レベルでの発現を検討する。グループ分けは下記の表のように 5 群に分ける。

	siRNA	FN stim	MCA 閉塞
I 群	neg	(+)	(+)
II 群	(+)	(+)	(+)
III 群	neg	sham	(+)
IV 群	(+)	sham	(+)
V 群	(-)	(-)	(+)

4. 研究成果

(1) FN 電気刺激により (我々の実験系で) neuroprotective かどうか。

① FN 電気刺激の脳梗塞巣の体積への影響  
sham 刺激群 : 190.57  $\pm$  5.12 mm<sup>2</sup> vs FN 刺激群 : 150.30  $\pm$  11.13 mm<sup>2</sup> と有意 (p=0.000634) に FN 群で梗塞巣は縮小していた (神経保護効果が見られた)。

(2) FN 電気刺激により UCP4 が刺激依存性に発現しているか。

① FN 刺激特異的な蛋白レベルでの UCP4 発現の確認

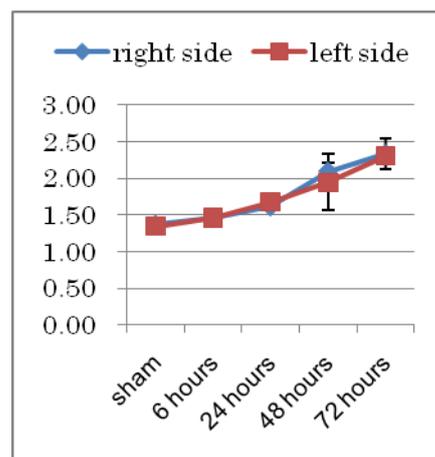
販売され入手な可能な抗体を用いて western blotting により大脳皮質 UCP4 の蛋白レベルでの発現を検討したが、新たなバンドは検出できるものの、抗体の特異性に疑問が残り、抗体の選択や作製より mRNA レベルでの UCP4 発現の確認を優先し行った。

② FN 刺激特異的な mRNA レベルでの UCP4 発現の確認

大脳皮質の UCP4 の発現を quantitative RT-PCR により左右分けて検討、いずれも 18srRNA にて補正した。Intact なラット (右 MCA 閉塞なし) において sham 刺激群と右 FN 刺激群の比較は、右 163.1%、左 160.9% と FN 刺激群で diffuse に上昇していた。右 MCA 閉塞を行ったラットにおいて sham 刺激群と右 FN 刺激群の比較では、右 148.2%、左 402.9% であり、虚血側でも mRNA レベルでの発現が上昇し、非虚血側では著明に上昇していた。

③ FN 刺激後の時間と mRNA レベルでの UCP4 発現の関係

1h-FN 電気刺激後の時間の経過に伴い、diffuse に UCP4 の発現が増加していた (グラフ参照)。



④ 蛍光蛋白による個体レベルでの UCP4 発現の観察

レポーター(UCP4 が発現すれば同時に tdTomato が発現する)プローブの正当性を検討した。Plasmid DNA を脳室カテーテルから投与し脳内に diffuse に蛍光プロ

ープが発現することは確認できたが、1h-FN 電気刺激依存的に発現の増加に関しては、発現増加傾向はみられたものの明確に断定できなかった。おそらく脳室カテーテル留置手技が安定しなかったこと、カテーテルからの plasmid 投与後の体重減少が著しく、個体の状態が poor であったことが原因と考えられた。以上より、今後検討すべき課題として残した。

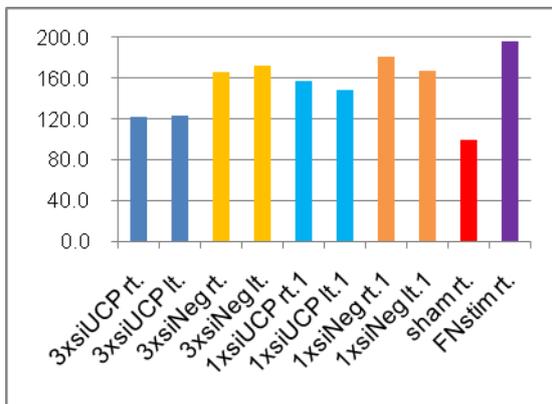
⑤ transgenic rat 作製による個体レベルでの UCP4 発現の観察

UCP4 が発現する場合には、同時に tdTomato が発現するよう遺伝子操作を加えたラットを作製する予定であったが、上記のごとく tdTomato のレポータープロープの正当性が完全に確認できていないので、レポータープロープの正当性を確認してから作製 (UNITECH に外注) する方針とし、今後検討すべき課題として残した。

(3) siRNA により UCP4 発現が抑えられ、FN 電気刺激による neuroprotection が消失するか。

① siRNA により UCP4 発現が抑えられるか否か

以下のグラフのごとく FN 刺激単独 (vehicle 投与、紫色) では、コントロール (赤色) に比べて発現が上昇、siRNA 1 回脳室内投与群 (水色) では軽度、siRNA3 回脳室内群 (青色) では明らかに UCP4 発現は抑制されていた。また、negative siRNA (ヤマブキ色、黄土色) では発現の抑制わずかであった。



② siRNA により FN 電気刺激による neuroprotection が消失するか否か

siRNA を 3 種類 8  $\mu$ l ずつ (計 24  $\mu$ l) + RNAiMAX 6  $\mu$ l を 3 回 (夕、朝、夕) 脳室内群では、MCA 閉塞後の死亡率が 50%以上と高率であった。siRNA 投与によるハロセン麻酔の繰り返しと、その後の FN(or sham) 電気刺激および MCA 閉塞の麻酔と処置の影響により、水分と餌の摂食不良が原因と考えられた。以後プロトコルを見直し、siRNA 脳室内投与を 3 回から 2 回に減

らし実験を継続した。これにより死亡率は減少し、平成 22 年度末現在、各群 n=3 までデータを取集した。その結果では、UCP4 を抑制する siRNA 脳室内投与では虚血耐性が消去傾向にあった。

(4) まとめと結語

1 時間の FN 刺激後 72 時間において: (1) 中大脳動脈閉塞後 24 時間の脳梗塞巣体積が 22% 縮小 (神経保護効果) し; (2) UCP4 の大脳皮質での発現 (蛋白と mRNA レベル) が増加; (3) UCP4 を抑制する siRNA 脳室内投与で刺激後の UCP4 の発現が抑制され、虚血耐性が消去傾向にあり、UCP4 が、FN 電気刺激による内因性神経保護効果のメカニズムの一因であると結論づけた。

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 4 件)

- ① Koizumi S, Yamamoto S, Hayasaka T, et al. Imaging mass spectrometry revealed the production of lyso-phosphatidylcholine in the injured ischemic rat brain. *Neuroscience* 168:219-225, 2010 (査読有)
- ② Wang Y, Yamamoto S, Miyakawa A, et al. Intravital oxygen radical imaging in normal and ischemic rat cortex. *Neurosurgery* 67:118-128, 2010 (査読有)
- ③ Thura M, Hokamura K, Yamamoto S, et al. GIF-0173 protects against cerebral infarction through DP1 receptor activation. *Exp Neurology* 219:481-491, 2009 (査読有)
- ④ 山本清二 他. ラット虚血脳では虚血中ではなく血流再開後に細胞内カルシウムイオン濃度および活性酸素産生が増加する. *脳循環代謝* 19:155-160, 2008 (査読有)

[学会発表] (計 6 件)

- ① 山本清二 他. ラット海馬 CA1 領域の生体内 OH ラジカル産生量と消去薬の遅発性神経細胞死に対する保護効果は平行する. 第 35 回日本脳卒中学会総会、第 39 回日本脳卒中の外科学会. 2010. 4. 16. 盛岡市
- ② Yamamoto S et al. Astrocytes are neuroprotective against transient forebrain ischemia in CA3 hippocampus. The XXIVth International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function and the IXth International Conference on Quantification of Brain

Function with PET. 2009.7.1. Chicago, USA

- ③ Yamamoto S et al. Real-time intravital imaging of hydroxyl radical ( $\cdot\text{OH}$ ) production upon neuroprotection of radical scavenger in rat hippocampus. Society for Neuroscience 39th Annual Meeting. 2009.10.19. Chicago, USA
- ④ 山本清二 他. グリオトキシンは海馬CA3神経細胞の一過性前脳虚血に対する脆弱性を増強する (Gliotoxin decreases neuronal viability following transient forebrain ischemia in CA3 hippocampus) 第32回日本神経科学大会 2009.9.16.名古屋市
- ⑤ 山本清二 他. 生体内蛍光イメージングによるwhisker stimulationに対するカルシウム反応の観察. 第31回日本神経科学会大会. 2008.7.10. 東京都
- ⑥ Yamamoto S et al. Physiological and pathological calcium responses in the deep brain regions observed with fiber-coupled confocal microscope. Society for Neuroscience 38th Annual Meeting. 2008.11.18. Washington DC, 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)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山本 清二 (YAMAMOTO SEIJI)  
浜松医科大学・光量子医学研究センター・  
准教授  
研究者番号：60144094

### (2) 研究分担者

井原 勇人 (IHARA HAYATO)  
浜松医科大学・医学部・助教  
研究者番号：00223298

### (3) 研究協力者

小泉 慎一郎 (KOIZUMI SHINICHIRO)  
浜松医科大学・医学部・大学院生

Min Thura  
浜松医科大学・光量子医学研究センター・  
研究員

Eugene V Golanov  
Neuroscience, Telemedicine & Advanced  
Technology Research Center, USA