

機関番号：32645

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591818

研究課題名 (和文) 新規脳保護法を導く脳内トランスポーターコントロールの解明

研究課題名 (英文) The elucidation of the intracerebral transporter control to lead the new cerebroprotection method

研究代表者

室園 美智博 (MUROZONO MICHHIRO)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：70276947

研究成果の概要 (和文)：脳内には mdr1a という物質があり、これにより多くの薬剤の脳内浸入が阻まれる。Mdr1a は内因性物質の移動にも影響する。今回、我々は mdr1a ノックアウトマウスを使用して局所脳虚血モデルを作成し、血中のサイトカインや Bcl-2 などアポトーシス関連物質を測定した。結果、mdr1 が存在することで虚血後の IL-6, Bcl-2 や Bax の変化に影響し、脳へのダメージが助長されることが推察された。

研究成果の概要 (英文)：There is mdr1a intracranially, which blocks invasion of multi drug to brain. Mdr1 also influences displacement of endogenous substance. We made a focal cerebral ischemia model using mdr1a knockout mouse and measured blood cytokine and apoptosis-related substances such as Bcl-2 in brain. From the results, we suggest that mdr1a influences IL-6, Bcl-2 and Bax after cerebral ischemia and promotes the damage to brain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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、mdr1a、血液脳関門

1. 研究開始当初の背景

(1) 我々は今までサイクロスポリン A(Cs A) や PACAP (pituitary adenylate cyclase-acting polypeptide) などを中心とした脳保護作用を有する薬剤を使い、脳虚血実験にてその効果を検討してきた。結果、これらの薬剤が濃度依存性に脳保護作用や神経毒作用を発揮することを突き止め、また薬剤の浸透に関わる因子として P-glycoprotein (P-gp) をはじめとする脳内の物質輸送担体が虚血直

後から大きく関わっていることが解明されつつある。

(2) さらに最近の報告では、P-gp などの脳内輸送担体はアポトーシス関連物質やサイトカインなどとも密接に相互作用を及ぼしており、P-gp 自体の脳組織内の局所的な特徴や働きから神経障害の大きさに影響していることが示唆されている {Fernandez et al. J. Pharm. Pharm. Sci. 2004, 7(3)}。

(3) 以上のことを踏まえて、今回脳障害時に

P-gp などの脳内トランスポーターがいかにかに発現し物質の輸送に関わっているか、また P-gp に依存する神経保護や障害に関わる物質の変化を観察することで、CsA などの神経保護薬をより効果的かつ現実的な使用法に導く。

2. 研究の目的

CsA のような脳保護剤の使用と同時に、P-gp の作用を調整し脳保護に有利な脳内環境を引き出すように P-gp inhibitor、抗酸化薬や抗サイトカイン薬などを併用する、新たな脳保護戦略を確立することが今回の主目的である。

3. 研究の方法

(1) Mdr1a ノックアウトマウスとワイルドタイプマウスによる一過性局所脳虚血モデルの作成 {Murozono et al, Eur J Pharmacol. 2004 498(1-3)}

局所脳虚血はシリコンコーティングした 6-0 モノフィラメントを外頸動脈から挿入し、中大脳動脈起始部に留置、30 分間虚血後、モノフィラメントを抜去し再灌流する。モデル作製中はレーザー Doppler フローメトリーを頭部に装着して中大脳動脈領域血流の変化を確認する。

(2) 脳虚血後脳内領域別及び経時的な免疫化学的測定

虚血前、再灌流後 3 時間、4 時間、12 時間、24 時間、48 時間に麻酔下にて脳を取り出し、領域別に分けて冷凍保存。それをホモジネートしてから遠心分離等により分画ごとに抽出した。

それらのサンプルを使って P-gp、Bcl1 ファミリーなどをウェスタン・ブロッティング法により検出。従来まで同条件での局所脳虚血実験にて得られている情報も所有しているので、その情報と本研究での結果を統合した後、障害程度を領域別に分類し、かつ各物質の経時的变化を定量的に解析した。

(3) 脳虚血後脳内領域別及び経時的な組織化学的確認法

再灌流後 30 分、3 時間、6 時間、12 時間、24 時間、48 時間に麻酔下にて経心臓的に脳をパラホルムアルデヒド固定する。固定脳を摘出後、冠状方向に切片を作成。glia や endothelial cell を重点的にサイトカイン、炎症性細胞の集積状況を観察した。

(4) 脳虚血後の血中サイトカインの経時的变化の観測

虚血前、再灌流後 3 時間、6 時間、24 時間におけるマウスから採血した。採取した血液を遠心処理後に ELISA 法を利用して IL-1beta、

IL-6、TGF-beta1 を測定した。

(5) Laser Speckle Imaging (LSI) を使用した脳虚血モデルでの血流変化

マウスを使用して一過性局所脳虚血モデルを作成、虚血前、虚血中、虚血後 30 分、3 時間、24 時間、7 日、28 日での脳血流を LSI により測定。28 日後に脳を摘出して NeuN 染色による組織染色を行いダメージの大きさを評価。脳組織ダメージと血流変化の関係を解析。

4. 研究成果

(1) Mdr1a ノックアウトマウスとワイルドタイプマウスによる一過性局所脳虚血モデルの作成

虚血中の脳血流量は Mdr1a ノックアウトマウスとワイルドタイプマウスとも虚血前の約 25% 程度で両群間に差はなかった。梗塞の体積 (mm³) は Mdr1a ノックアウトマウス : 34.4±16.3、FVB ワイルドマウス : 51.4±14.7 と有意にノックアウトの方が小さかった。

{Murozono et al, Neurochem. re.2009 34}

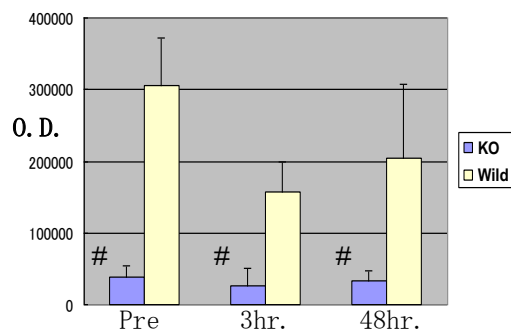
(2) 脳虚血後脳内領域別及び経時的な免疫化学的測定

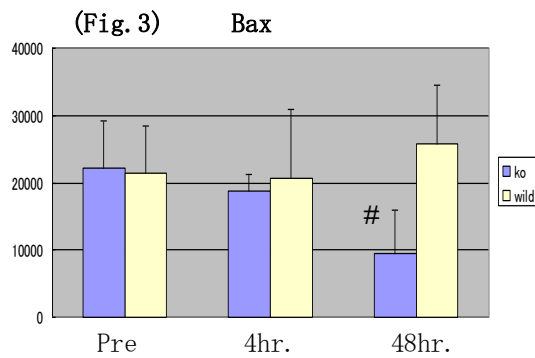
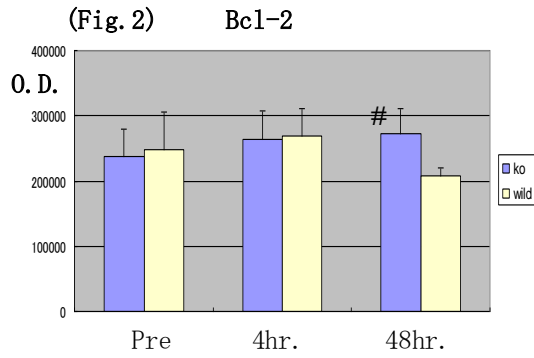
Fig. 1 はウェスタン・ブロットによる脳組織内 P-gp の量を示す。虚血前後の各時間とも明らかに wild の方が圧倒的に多かったことが判明。また、wild 群の中では 3 時間後に P-gp の量の低下を認めた。

Fig. 2 は一過性脳虚血による脳内 Bcl-2 の経時的变化。虚血前と再灌流 4 時間後までは ko, wild とともに変化を認めないが、48 時間経過すると、wild は減少傾向を示し、ko と比較すると有意に減少している。

Fig. 3 は一過性脳虚血による脳内 Bax の経時的变化を示す。虚血前と再灌流 4 時間後までは ko, wild とともに明らかに変化してないが、48 時間経過すると、ko は減少傾向を示し、wild と比較する約半分以下で有意に少ないことが確認された。

(Fig. 1) P-glycoprotein





: vs wild group (P<0.05)

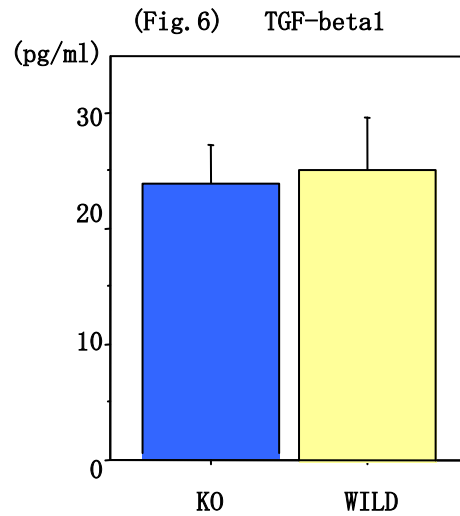
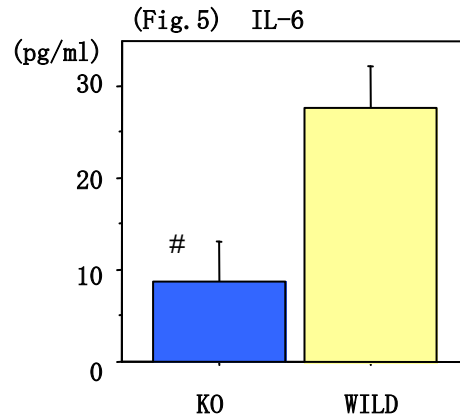
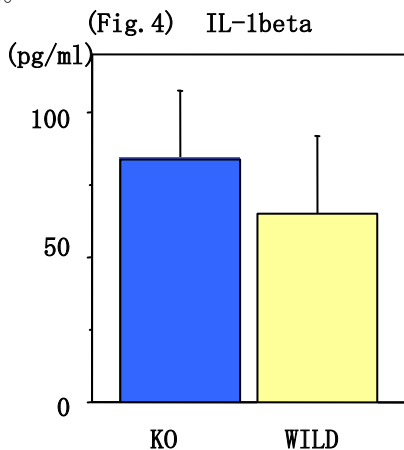
(3) 脳虚血後脳内領域別及び経時的な組織化学的確認法

今回、虚血後の脳組織での glia や血管内皮細胞を中心に炎症性物質やアポトーシス関連物質に対する染色をおこなったが、陽性所見の判断が難しく、KO マウスと Wild マウスとの違いを評価することが困難であった。

(4) 脳虚血後の血中サイトカインの経時的変化の観測

Fig. 4, 5, 6 は虚血後の血中サイトカインを ELISA 法により測定した結果である。

IL-1 beta と TGF-beta1 は KO と WILD に有意な差をみとめなかったが、IL-6 は KO では WILD の量の三分の一程度と有意に少なかった。



(5) Laser Speckle Imaging (LSI) を使用した脳虚血モデルでの血流変化

脳へのダメージが線条体に限定したマウス群と線条体+皮質に及んだマウス群で、LSI による血流測定を経時的変化を比較したところ、再灌流早期 (虚血後3時間) において血流回復に両群で差を認めた。

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2件)

① Michihiro Murozono, Shohei Matsumoto, Sinya Okada, et al.
Reduction of Brain Infarction Induced by a Transient brain Ischemia in mdrla Knockout Mice
Neurochem Res 査読有 34, 2009, 1555-1561

② Akiko Takeda, Ryoichi Miyashita, Takeo Nagura, Shusuke Sekine, Michihiro Murozono et al.
Effects of Differential Types of Anesthetic Agents on Cellular Protein

Kinase C- γ Dynamics in Mouse Brain
Pharmacology 査読有 87, 2011, 180-186

〔学会発表〕(計5件)

①室園美智博ら、mdrla 由来 P-glycoprotein
の脳虚血への影響 2008 年 第 23 回日本
Shock 学会総会

②室園美智博ら、mdrla ノックアウトマウス
における一過性局所脳虚血でのサイトカイン
に関する検討 2009 年 第 24 回日本
shock 学会総会

③室園美智博ら、mdrla ノックアウトマウス
による一過性脳虚血でのアポトーシス及び
サイトカインに関する検討 2009 年 日本
麻酔科学会第 56 回学術集会

④室園美智博ら、一過性脳虚血におけるアポ
トーシス及びサイトカインに対する、mdrla
由来 p-glycoprotein の影響 2009 年 日本
蘇生学会第 28 回大会

⑤室園美智博ら、二次元レーザー血流計を用
いたマウス一過性脳虚血モデルでの脳血流
測定 2010 年 日本麻酔科学会第 57 回学術
集会

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

室園 美智博 (Murozono Michihiro)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号: 70276947

(2) 研究分担者
()

研究者番号:

(3) 連携研究者
()

研究者番号:

6. 研究組織

(1) 研究代表者