

平成 22 年 5 月 24 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008 ～ 2009
 課題番号：20791008
 研究課題名 (和文) 脳血管障害におけるアディポネクチンの役割の解析
 研究課題名 (英文) Protective Actions of Adiponectin on Cerebral Ischemia-reperfusion Injury.
 研究代表者 西村 真樹 (NISHIMURA MASAKI)
 京都大学・医学研究科・助教
 研究者番号：60452348

研究成果の概要 (和文)：肥満がどのような機序で脳梗塞の危険因子となるのかについては未だ解析されていない。本研究は中大脳動脈虚血再還流モデルを使用し、脂肪から分泌されるサイトカインであるアディポネクチンの脳梗塞における役割を解析したものである。アディポネクチンノックアウトマウスにおいて脳梗塞面積が増大し、ペナンプラ領域が増大していることを発見した。本研究はアディポネクチンの補充が新たな治療適応となりうることを示している。

研究成果の概要 (英文)：Adiponectin is a fat-derived plasma protein that has beneficial actions on cardiovascular disorders. Low level of plasma adiponectin is associated with increased mortality following ischemic stroke. However, the causal role of adiponectin in ischemic stroke is unknown. APN-KO mice exhibited enlarged brain infarction and increased neurological deficits following ischemia-reperfusion compared with WT mice. Conversely, adenovirus-mediated supplementation of adiponectin significantly reduced cerebral infarct size in WT and APN-KO mice. APN-KO mice showed decreased cerebral blood flow during ischemia by laser speckle flowmetry methods. These data provide a novel evidence that adiponectin exerts a cerebroprotective action. Adiponectin could represent a molecular target for the prevention of ischemic stroke

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：脳卒中 肥満 脳血流 脳梗塞 アディポネクチン

1. 研究開始当初の背景

近年、肥満は日本においても西洋化した食

生活のために大きな社会問題となってきた。また American Stroke Association が

2006年に発表した論文にて、肥満が脳梗塞危険因子として報告されている。それにもかかわらず、肥満がどのような機序で脳梗塞の危険因子となるのかという分子生物学的メカニズムについては未だ解析されていない。

そこで肥満細胞から分泌されるサイトカインに注目し研究を開始した。

2. 研究の目的

当研究は肥満や肥満に関連した病態に深く関わり合いがあるとされるアディポネクチンに注目し、その脳血管障害における役割を解析することを目的とするものである。本研究より肥満の脳虚血に及ぼす作用が明らかになるだけでなく、新たな治療法の確立と脳梗塞危険因子群のスクリーニングが可能となると期待される。

アディポネクチンは脂肪から分泌される特異的なサイトカインとして発見されたものであるが、脂肪細胞から分泌されるのにもかかわらず、**Body Mass Index**の増加とともにその血中濃度が減少し、抗炎症作用を持つという興味深い特徴を持っている。臨床的にもアディポネクチンの低下は高血圧や糖尿病発症のマーカーなりうるとの報告がなされている。また実験系においてもノックアウトマウスを使った解析により、アディポネクチンは高塩分食による高血圧や、血管内膜肥厚、心筋虚血再還流モデルにおいても重要な役割を来すことが報告されている。これらはすべて脳梗塞の危険因子として強い関連が考えられる因子であり、アディポネクチンが脳梗塞において何らかの役割を担っていることが期待される。

3. 研究の方法

C57BL/6マウスを使用し、フィラメント法にて一時間の中大脳動脈虚血再還流モデ

ルを作成した。ノックアウトマウスおよびアディポネクチン高発現マウスを使用し、それぞれ脳梗塞面積、虚血中の脳血流、脳組織及び血管内皮の発現蛋白と遺伝子発現を調べた。

また脳虚血作成後に対象物を標識した色素を静脈注射したのち麻酔下にて頭部を開窓、蛍光顕微鏡にて微小循環を測定観察した。さらに虚血後のアディポネクチンの血中濃度およびNOの代謝産物を測定し脳虚血再還流後の動態を調べた。

4. 研究成果

フィラメントを用いたマウス中大脳動脈虚血再還流モデルを使用しアディポネクチンノックアウトマウスにおける虚血再還流後の梗塞面積を測定した。するとアディポネクチンノックアウトマウスにおいて脳梗塞面積が増大し脳梗塞後神経所見が悪化することを認めた。これらの作用はアディポネクチンの補充により回復することも確認した。またアデノウイルスを使ってWTマウスのアディポネクチン血中濃度を2倍にover expressionさせることにより脳梗塞面積が減少し、神経学的所見が改善することを発見した。

さらにアディポネクチンの脳血流への影響を調べるために遠位部中大脳動脈瘤閉塞モデルを使って虚血中の微小血流を調べた。このモデルは中大脳動脈閉塞後、生体下にて脳血流を観察するものであるが、中大脳動脈閉塞後、脳梗塞のcoreと考えられる血流20%以下に低下した部分と脳血流20~30%に低下した、いわゆるペナンプラ領域を観察することができる。このモデルを使用して脳血流を測定するとアディポネクチンノックアウトマウスにおいては脳梗塞のcoreと考えられる血流20%以下の領域の面積はWTとくら

べて変化なかったが、脳血流 20~30%に低下した領域がノックアウトマウスにおいて有為に増大していることを発見した。ノックアウトマウスの血管構造や脳血流絶対値はワイルドタイプと変化がないことからアディポネクチンが脳梗塞時の collateral circulation に係わっていることが示唆された。(図 1)

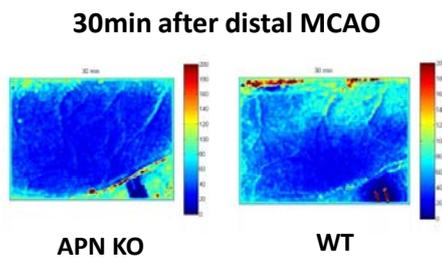


図 1 アディポネクチン KO マウスの脳血流

脳虚血急性期において eNOS が血流をコントロールする重要な要素であると報告されていることから、アディポネクチンノックアウトマウスにおける eNOS の活性化を調べたところ急性期において、コントロールと比べて優位に減少していた。さらにアディポネクチンノックアウトマウスにおいては NO の代謝産物が有意に減少しており、またそれらの減少もアディポネクチンの補充により改善することがわかった。eNOS のノックアウトマウスについてはアディポネクチンの虚血時脳保護作用が消失していたことから、アディポネクチンが eNOS の活性化を通して脳梗塞急性期の血流をコントロールしていると考えられた。

アディポネクチンは血中を巡回するサイトカインであるため、脳虚血時に作用している部分を調べるため脳組織の免疫染色をおこなった、するとアディポネクチンは虚血後早期より虚血脳、とくにペナンプラ領域に集積

することが分かった。これらの集積は再還流後 24 時間及び 48 時間においても継続して観察された。アディポネクチンは血管内皮細胞のマーカーと共染色されること、また脳組織においてアディポネクチン遺伝子の発現は虚血後も見られなかったことから、血中を巡回するアディポネクチンが虚血脳の内皮細胞に集積し作用していることが推測された。このことは eNOS を介した作用機序に矛盾しない結果であった。また脳梗塞後の血中のアディポネクチンの濃度は手術だけを行った対象群と比べて有意に減少していた(図 2)。このことは血中アディポネクチンが虚血脳に集積作用し同時に消費されることを意味している。そのためアディポチンの補充が新たな治療ターゲットとなる可能性を示しているものと考えられた。

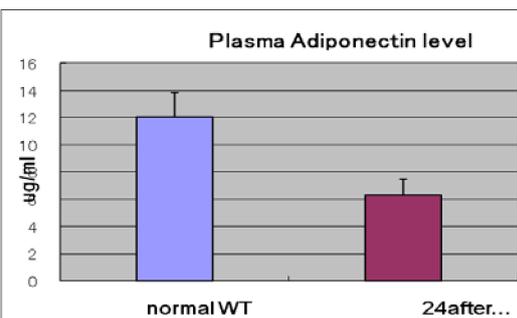


図 2 虚血後のアディポネクチン濃度

また脳虚血後の脳表微小循環を蛍光顕微鏡にて生体下に観察した。微小循環では白血球および血小板が内皮細胞に接着している様子が観察された。虚血後の微小循環では Rhodamine 6G にて蛍光された白血球が可視化され、また虚血脳において壁への集積および接着時間が亢進していることが分かった(図 3)。現在アディポネクチンノックアウトマウスを使用してさらに解析中である。

Microcirculation after ischemia

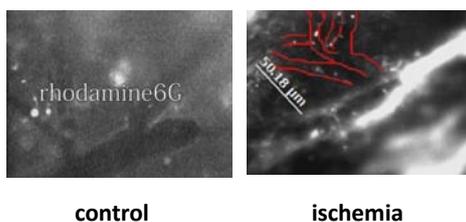


図3 虚血後の微小循環

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 Nishimura M., Ouchi N.et.al.
Adiponectin prevents cerebral ischemic injury through endothelial nitric oxide synthase dependent mechanisms. *Circulation*. 2008 Jan 15;117(2):216-23.
査読有

〔学会発表〕（計2件）

- ① アディポネクチンの急性期脳虚血保護作用の解析 西村真樹 他 第33回日本脳卒中学会 2008年3月21日 京都
- ② Protective Actions of Adiponectin on Cerebral Ischemia-reperfusion Injury. 西村真樹 他 第67回日本脳神経外科学会総会 2008年10月2日 盛岡

6. 研究組織

研究代表者

西村 真樹 (Nishimura Masaki)

京都大学医学研究科 助教

研究者番号：60452348