

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09238

研究課題名(和文)脳梗塞発生時におけるプロポフォールの脳保護作用メカニズム

研究課題名(英文)The Neuroprotective Mechanisms of Propofol during Cerebral Infarction

研究代表者

三井 一葉 (MITSUI, Kazuha)

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号：90568106

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)：コントロール群に比較して、プロポフォールを投与した野生型マウスにおいて炎症性サイトカインであるIL-6が有意に低下していることを確認した。よって、野生型マウスにプロポフォールを投与すると脳梗塞に対して保護的に作用する機序として、炎症性サイトカイン低下の可能性が確認された。また、コントロールマウスと比較して、プロポフォール投与マウスはペナンブラのTLR4発現ミクログリア数が有意に少ないことを確認した。

以上より、プロポフォールはTLR4経路抑制を通じて脳梗塞に保護的に作用し、その過程には炎症性サイトカインの低下、ペナンブラのTLR4発現ミクログリア数の有意な減少を伴うことが認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究および研究代表者の過去の研究より、プロポフォールはTLR4経路抑制を通じて脳梗塞に保護的に作用し、その過程には炎症性サイトカインの低下、ペナンブラのTLR4発現ミクログリア数の有意な減少を伴うことが示された。このことは、周術期に使用頻度が高いプロポフォールが、周術期の重要な合併症である脳梗塞に対して保護的に作用する可能性を示唆している。また、プロポフォールの脳梗塞への保護作用の詳細なメカニズムを検討したことにより、周術期における脳梗塞発生時の予後改善につながるような新薬の発見につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)： In wild-type mice administered with propofol compared to the control group, a significant decrease in the inflammatory cytokine IL-6 was confirmed. Therefore, it was suggested that propofol administration in wild-type mice may exert a protective effect against cerebral infarction through the reduction of inflammatory cytokines. Additionally, compared to control mice, mice administered with propofol showed a significantly lower number of microglia expressing TLR4 in the penumbra.

In conclusion, propofol was found to exert a protective effect against cerebral infarction via inhibition of the TLR4 pathway, accompanied by a significant decrease in inflammatory cytokines and a reduction in the number of microglia expressing TLR4 in the penumbra.

研究分野：脳梗塞

キーワード：脳梗塞 プロポフォール Toll like receptor 4

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞は生命予後に直結する重大な疾患である。周術期は血液凝固亢進・不整脈・低酸素血症などにより脳梗塞を起こしやすい。脳梗塞を比較的、起こしにくい非心臓・非大血管手術でも不顕性まで含めると約 10%の患者に脳梗塞が発症している可能性が示唆されている。(J Neurosurg Anesthesiol. 2014;26(4):273-85) 2014 年には周術期の脳梗塞管理に関するガイドラインが発表され関心を集めている。脳酸素消費量低下・頭蓋内圧低下などのため、中枢神経疾患のある患者は周術期にプロポフォールで管理することが多い一方、我々はセボフルランにも脳保護作用がある可能性を報告してきた。よって、周術期の脳梗塞に対してどの麻酔薬が最適であるか分かっていない。

脳梗塞発生時における炎症は脳梗塞増大に寄与し予後悪化につながる。さらに、脳梗塞局所における傷害細胞から放出される自己由来物質に TLR4 が反応し、さらなる炎症を惹起することが分かってきた。一般的な麻酔薬であるプロポフォールは TLR4 機能を抑制し抗炎症作用を示す可能性が示唆されている。以上の背景より、申請者は野生型マウスと TLR4KO マウスにプロポフォールを投与後、脳梗塞体積を検証し以下の事実を突き止めた。

・野生型マウスに予めプロポフォールを投与すると、その後に発生する脳梗塞の体積を有意に減少させることができる。

・体内全ての TLR4 を非特異的に欠損させた TLR4KO マウスに予めプロポフォールを投与しても、その後に発生する脳梗塞の体積は減少しない。

以上よりプロポフォールは TLR4 機能抑制を通じ脳梗塞への保護作用を示す可能性が示された。

脳梗塞発生時はマクロファージ・好中球などの炎症性細胞により炎症が惹起され、それら炎症性細胞の表面には TLR4 が発現していることが分かっている。しかし、TLR4 は炎症性細胞以外にも様々な細胞の表面に発現している。申請者の過去の研究より、プロポフォールは TLR4 機能を抑制することにより脳梗塞に保護的に作用することが示唆されたが、どの細胞表面に発現している TLR4 の機能を抑制しているのかは分かっていない。

2. 研究の目的

TLR4 を通じたプロポフォールによる脳梗塞への保護作用の具体的ターゲット細胞、その際の TLR4 の下流経路を検証することである。具体的には、プロポフォールの脳梗塞局所での抗炎症作用の有無を明らかにするため、脳梗塞局所への炎症性細胞の集簇が減少しているか、炎症性サイトカイン量が低下しているのかを確認する。さらに、プロポフォールの脳梗塞への保護作用は、具体的にマクロファージ・好中球などの炎症性細胞の表面の TLR4 機能を抑制することにより出現しているか検証する。

3. 研究の方法

・脳梗塞巣への炎症性細胞の集簇はプロポフォール投与にて減少するか。

プロポフォールの投与により脳梗塞発症後、脳梗塞巣周辺に集簇する炎症性細胞が減少するか検証する。

脳梗塞モデルマウスの作製

野生型マウスを使用する。マウス麻酔器を用いてマウスを十分な麻酔深度に維持し、マウス用血圧測定器にて血圧を測定する。プロポフォール(10mg/kg)または同量の脂肪製剤を尾静脈より静注しプロポフォール投与群と対照群を作製する。その後、左総頸動脈結紮および左中大脳動脈焼灼により脳梗塞を作製する。

炎症性細胞の集簇の確認

脳梗塞を作製した1日後にマウスを安楽死させ脳サンプルを取り出す。クリオスタットを用いて、脳組織を凍結切片標本にする。マクロファージ・好中球をターゲットにした抗体(Rabbit抗CD45抗体)とTLR4をターゲットにした抗体(Goat抗TLR4抗体)を用いて蛍光免疫染色し、それぞれの発現の程度をプロポフォール投与群と対照群で比較する。

・脳梗塞巣での炎症性サイトカインはプロポフォール投与で低下するか。

プロポフォールを投与することにより脳梗塞を発症したのちに、脳梗塞巣周辺で産生される炎症性サイトカインが低下するか検証する。

炎症性サイトカイン低下の確認

上記と同様の脳梗塞モデルマウスを、作製後1日目に安楽死させ同様に脳サンプルを摘出する。その後、RT-PCR装置を用いて各炎症性サイトカインがどの程度発現しているかプロポフォール投与群と対照群で比較する。

4. 研究成果

コントロール群に比較して、プロポフォールを投与した野生型マウスにおいて炎症性サイトカインであるIL-6が有意に低下していること確認した。よって、野生型マウスにプロポフォールを投与すると脳梗塞に対して保護的に作用する機序として、炎症性サイトカイン低下の可能性が確認された。また、コントロールマウスと比較して、プロポフォール投与マウスはペナンブラのTLR4発現ミクログリア数が有意に少ないことを確認した。

以上より、プロポフォールはTLR4経路抑制を通じて脳梗塞に保護的に作用し、その過程には炎症性サイトカインの低下、ペナンブラのTLR4発現ミクログリア数の有意な減少を伴うことが認められた。

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 Mitsui Kazuha, Kotoda Masakazu, Hishiyama Sohei, Takamino Ayasa, Morikawa Sho, Ishiyama Tadahiko, Matsukawa Takashi | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Propofol ameliorates ischemic brain injury by blocking TLR4 pathway in mice | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Translational Neuroscience | 6. 最初と最後の頁 246 ~ 254 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1515/tncsci-2022-0238 | 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0件

〔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 |
|-------|--|--|----|
| 研究分担者 | 石山 忠彦 (ISHIYAMA Tadahiko) (90293448) | 山梨大学・大学院総合研究部・准教授 (13501) | |

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 |
|---------|---------|
| | |