

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09189

研究課題名(和文) pHイメージングを用いた脳梗塞における酸感受性イオンチャネルの分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of pH-related ion channels in cerebral infarction using pH image

研究代表者

五十嵐 崇浩 (IGARASHI, Takahiro)

日本大学・医学部・医師職等特別職

研究者番号：20468747

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：虚血の「程度」の評価として、pH変化は重要な因子である。CEST技術は、プロトン交換速度の変化による組織内pH測定法として、臨床応用が期待されている。梗塞直後の従来のペナブラ領域においては、pH変化が顕著な部位(metabolic penumbra: MP)とpH変化がほとんど無い部位(benign oligemia: BO)を認めた。再灌流後のssDNA染色によりMPとBOでは、組織学的に評価すると傷害の「程度」に差があることがわかった。また、虚血早期のMP領域のpH変化に注目してその後の変化を観察すると、pH変化と出血性変化・Epac活性、痙攣発生に関連性を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

虚血早期の画像上のpH変化と組織傷害に明確な関連性を見出すことができた。組織pH変化は痛みや味覚の伝達に関与しており、脳内では海馬の神経新生に重要な役割を果たすことが解明されている。また、Epacは神経伝達物質によって引き起こされるシグナル伝達や神経可塑性などの神経機能に積極的に関与することが知られている。本研究の成果より、虚血によるpH変化とEpac2の発現に関連性を認めた。これは、虚血に伴うpH変化でEpac2が過剰に活性化され、機能的(異常)シナプス形成に関与していると考えられる。pH制御は、脳卒中急性期の生命・機能予後の改善だけでなく、慢性期のてんかん発症や重症化の抑制に寄与すると考える。

研究成果の概要(英文)：In stroke, it goes without saying that "time" since onset is crucial, but the "gravity" of ischemic damage is also an important factor. pH change is an important factor in evaluating the "gravity" of ischemia. Chemical Exchange Saturation Transfer technology holds promise for tissue pH based on proton exchange rate changes. In the conventional penumbra, distinct sites with significant pH changes (metabolic penumbra: MP) and sites with minimal pH changes (benign oligemia: BO) were identified. Histological evaluation using ssDNA staining revealed differences in the "gravity" of injury between the MP and BO regions after reperfusion. Furthermore, observing subsequent changes following early ischemic metabolic penumbra pH changes, we noted a correlation between pH changes, hemorrhagic transformation, and exchange proteins activated by cyclic AMP (Epac) activity. Additionally, behavioral observations in rats post-stroke revealed that pH changes post-ischemia influence subsequent seizure.

研究分野：脳血管障害

キーワード：脳血管障害 pH 酸感受性イオンチャネル Epac

様式 C - 19 , F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞は、基礎および臨床研究がこれまでに世界中で精力的に行われてきた。その結果、血栓溶解療法や経皮経管の脳血栓回収療法など、着実に治療の選択肢が登場してきている。その一方で、克服すべき問題が浮き彫りになってきた。脳梗塞治療において重要なのは、発症からの「時間」である事は言うまでもないが、虚血に伴う傷害の「程度」というのも重要な因子と言える。私達は、虚血に伴う傷害の「程度」と pH 変化に注目し pH image の研究を行ってきた。ペナンプラ領域の pH は一様ではなく、時間経過で領域が変化することがわかった。

虚血後の pH 変化に伴い、分子・組織レベルでは、pH 依存性に開閉するチャネルにより細胞内外のイオン交換がなされており、細胞死に関与している事が解明されてきた。虚血後の pH 制御が脳梗塞急性期の新たな治療ターゲットとして期待できる。しかし、脳梗塞後の pH image の経時的変化に関して未だ不明な点が多い。本課題は in vivo 脳梗塞モデルを用い、pH 制御をすることで、脳梗塞後の機能・生命予後を改善出来ないかを検討した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、1) 脳梗塞後の脳 pH image と pH 変化のサロゲートマーカー発現の経時的変化を確認すること、2) pH 変化とその後の組織学的な変化(特に出血性変化)の関連性を確認すること、3) 虚血の「程度」を pH 変化と捉えた時、pH が細胞死に与える影響を組織学的に確認すること、4) 薬物の投与により pH 変化に伴う分子生物学的変化を制御することで細胞死の抑制効果を確認すること、5) pH 変化に伴う分子生物学的制御の神経機能への影響を評価することである。

3. 研究の方法

実験 I : 脳梗塞後の pH image の経時的変化と、出血性変化の検討

【脳梗塞モデル作成】オス SD ラットの中大脳動脈フィラメント閉塞を用いる。ラットを 4% イソフルランで麻酔導入し、1.5-2.0% で維持する。体温測定プローブを直腸内に挿入し体温パッドで体温を管理する。鼠径動脈を PE50 でカニューレーションして、血圧の持続的モニタリングとサンプル採取を行う。

【pH image】モデル作成後、マルチスライス MRI (5 slices, slice thickness/gap=1.8/0.2 mm, the field of view=20×20 mm², image matrix=48×48) を用いて pH 分布を可視化し、記録する。

【神経機能評価】温室内でラットを覚醒させ、十分な覚醒が得られたら Gracia's score を用いて神経機能的評価を行う (Shimamura N et al, 2006, J. Neurosci. Methods)。

【梗塞変化と出血性変化】ラットの飼育は動物舎にて行う。虚血 24 時間後に神経機能的評価を行う。ラットを安楽死させ脳を摘出し、脳マトリックスに固定する。嗅球-前頭接合部を 0mm (起点) として 2mm ずつ冠状切開し、6 切片作成する。European Cooperative Acute Stroke Studies (ECASS) HT scale を用いて出血性梗塞の程度を評価し (Hacke W et al, 1995, JAMA), 非染色状態の脳切片の写真を撮影する。撮影した画像は ImageJ (v1.48, National Institutes of Health) を用いて color densitometry を計測する。1% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 染色を行い染色脳切片の写真を撮影する。撮影した画像は ImageJ を用いて梗塞面積 (直接法・間接法)、梗塞巣の腫脹面積、梗塞周囲の腫脹面積を計算する (Bederson JB et al, 1986, Stroke)。

実験 II : pH image と、分子生物学的変化、組織学的変化の検討

【Western blotting 法】採取した上清検体を 20 倍に希釈し、RC DC Protein assay Kit を用いて総タンパク量を測定した。濃度の測定には吸光度計を使用した。Laemmli sample buffer と beta-

mercaptoethanol を用いてサンプルを溶解した。1 ウェルあたりの総タンパクとして 15 μg の検体をローディングした。タンパク分離はポリアクリルアミド電気泳動で行い、4-20% 濃度勾配ゲルを用いて、120 V、400 mA で 65 分間泳動した。分子量マーカには、プレジジョンプラスプロテイン 2 色スタンダードを使用した。転写には iBlot システムを使用した。一次抗体反応は、1000 倍希釈の抗 Epac2 抗体および内因性コントロールとして 20,000 倍希釈の抗 beta-Actin 抗体を使用した。抗抗体感作、抗 beta-Actin 抗体感作はそれぞれ 4 内で 24 時間反応させた。二次抗体反応は抗ウサギ IgG 抗体を使用し、室温で 1 時間反応させた。発色には enhanced chemi lumenscence 法を用い、検出器にてバンドを検出した。測定には Image Lab ソフトウェアを使用した。全てのゲルに同一脳から精製した陽性コントロールサンプルを多段階濃度（25%、50%、75%に希釈）でのごせておき、ゲル間の染色性の補正を行なった。バンドの濃淡は陽性コントロールに対する比として表示した。結果は Epac2 / beta-Actin として比較した。

【免疫染色】免疫染色用の組織は 4% パラホルムアルデヒドで固定を行いパラフィンブロック作製し 6 μm 厚に薄切した。キシレンで脱パラフィンを行い、エタノールを用いて親水処置を行った。次に、0.3% 過酸化水素水メタノール液を用いて組織内の内因性ペルオキシダーゼ処理を行った。次いで Tris-EDTA 緩衝液 (pH 9.0) を用いて賦活処理を行った。流水、PBS 洗浄を行った後に 2% 正常ヤギ血清を用いてブロッキングを行った。一次抗体は 200 倍希釈の抗 Epac2 抗体を使用し、一次抗体反応は 4 内で 24 時間行った。二次抗体反応は抗ウサギ IgG 抗体を使用し、37 内で 1 時間行った。発色は DAB Substrate Kit を用いて行った後に、脱水、透徹後にカバースリップした。

4. 研究成果

脳梗塞治療においてペナンブラは急性期再開通療法のターゲットとなる組織であるといえる。1990 年代に MRI が臨床応用されるようになって、ペナンブラ領域を拡散強調画像 (DWI) と灌流画像 (PWI) を用いたミスマッチモデルによって同定できるようになった。DWI-PWI ミスマッチをどのように定義するかは、治療選択にかかわる重要な点であるにもかかわらず、確

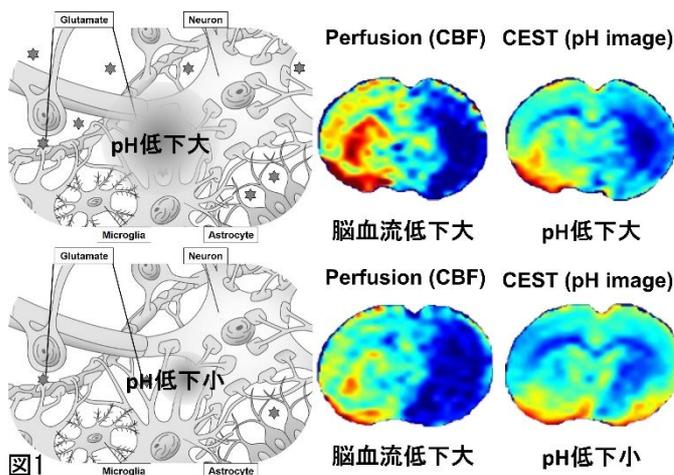


図1

立したものがない。その原因の一つとして PWI による虚血領域の定義があいまいである事が挙げられる。ミスマッチ領域は、再灌流がなければ時間とともに梗塞に陥る領域、すなわち脳代謝上のペナンブラであるべきだが、局所脳血流低下があるもののその程度は軽く、再灌流が生じなくとも梗塞に陥ることはない benign oligemia との境界線を明確に引くことが困難である。図 1 に示すように局所脳血流低下の大きさと pH 変化の大きさ (程度) は一致していない事がある。この違いが、虚血後のスコアが同じで、発症から再灌流までの時間が同じでも結果が違ってくる要因の 1 つといえる。(図 1: 局所脳血流低下の大きさと pH 変化の不一致)

また、虚血早期の metabolic penumbra 領域の pH 変化に注目した。pH 変化 (ΔpH) は、metabolic penumbra 領域の pH から対側の正常領域の pH を差し引いてもとめた。ECASS HT scale に基づいて、出血性変化を認めないものを None、梗塞の周辺部にのみ点状出血を認めるものを HI1、梗塞全体に点状出血を認めるものを HI2、明らかな血腫として梗塞内に存在 (梗塞面積の 30%未満) するものを PH1、明らかな血腫として梗塞内に存在 (梗塞面積の 30%以上) するものを PH2、とした。す

ると pH 変化とその後の出血性変化の程度に関連性があることがわかった (図 2)。虚血後の出血性変化の程度と予後には関連性がある事は以前より知られているが、本研究の結果により虚血早期の metabolic penumbra 領域の pH 変化がその後の出血性変化に強い影響を与えている事が証明された。(図 2 : pH 変化の違いと出血性変化について)

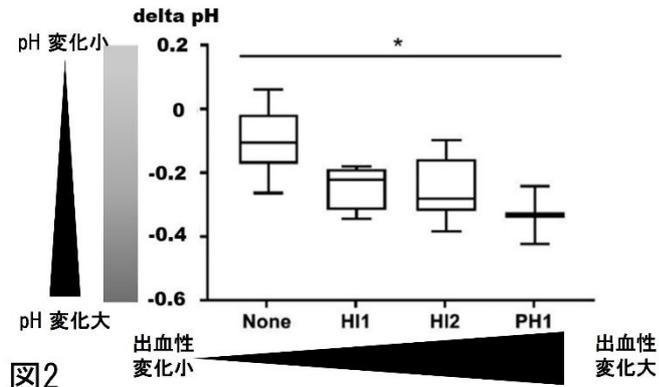


図2

梗塞直後の pH 変化は、虚血中心では顕著に認めた。従来のペナンプラ領域においては、pH 変化が顕著な部位 (metabolic penumbra) と pH 変化がほとんど無い部位 (benign oligemia) を認めた。再灌流後の single-stranded DNA (ssDNA) 染色により metabolic penumbra と benign oligemia では、組織学的に評価すると傷害の「程度」に差があることがわかった (図 3) (図 3 : metabolic penumbra と benign oligemia の組織学的な違い)

本研究よりペナンプラ領域において血流改善後、酸性に傾いていた pH が一時的にアルカリ性になり、その後の時間経過で再び酸性に傾き細胞死にいたる事がわかった。血流再開は最も

重要な因子ではあるが、それだけでは解決しない問題があり、pH 変化が重要な因子といえる。今後の課題として、脳梗塞後の pH 変化に関わる組織・細胞・分子レベルでの機序の解明とともに、真に有効な治療薬の開発が切望される。

pH 変化は虚血中心 > metabolic penumbra > benign oligemia の順になっており、そのサロゲートマーカーとして Epac2 に注目した。免疫組織染色においても上記部位により Epac2 の発現の程度に差をみとめた (図 4)。また、蛋白発現で半定量的に評価しても pH 変化と同様な変

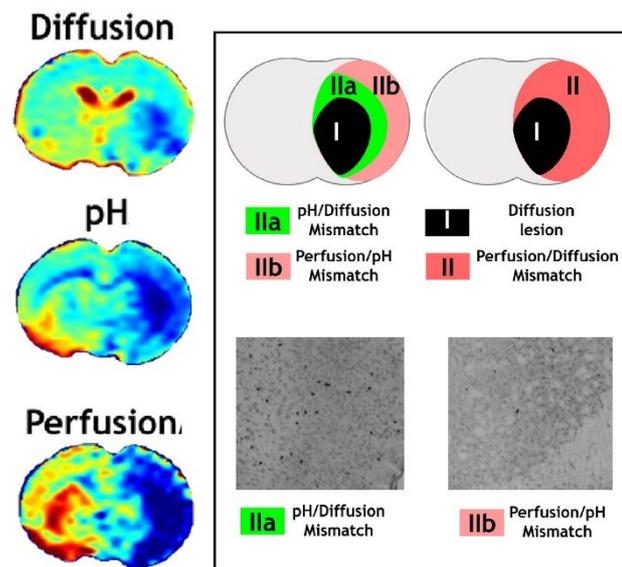


図3

化を認め強い関連性を示唆した。(図 4 : Core, Metabolic penumbra, Benign oligemia での Epac 発現)

以上により、虚血に伴う pH 変化と Epac の発現には関連性があると考えられる。また、脳梗塞後のラットの行動観察より虚血後の pH 変化がその後のけいれん様発作発生に影響を与えている事がわかった。Epac に関する先行研究では、Epac の発現が軸索進展や微小血管のリモデリングに参与している事が知られている。虚血に伴う pH 変化で Epac が過剰に発現することが、機能的(異常)シナプス形成に参与していると私達は考える。脳卒中後てんかんを予防する上で、pH を早期に制御する事が重要と考え、令和 6 年度からの科学研究費助成事業基盤 C、課題番号：24K12273「pH 変化を介した脳卒中後てんかん発症メカニズムの解明と新たな予防戦略の開発」の着想と受託に至った。

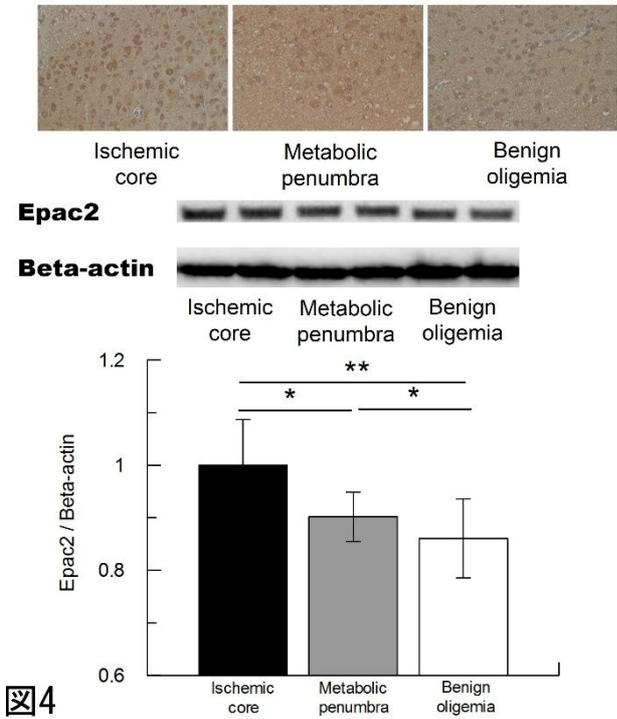


図4

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 五十嵐崇浩, 梶本隆太, 大島秀規, 大谷直樹, 吉野篤緒	4. 巻 56
2. 論文標題 最新の神経イメージング: CEST-MRI技術を用いたpH imaging	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 33-35
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 有
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 -

1. 著者名 KAJIMOTO Ryuta, IGARASHI Takahiro, MORO Nobuhiro, OSHIMA Hideki, SUMA Takeshi, OTANI Naoki, YOSHINO Atsuo	4. 巻 67
2. 論文標題 Glibenclamide reduces secondary brain injury in a SAH rat model by reducing brain swelling and modulating inflammatory response	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Neurosurgical Sciences	6. 最初と最後の頁 431-438
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.23736/S0390-5616.22.05271-7	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Igarashi Takahiro, Kim Hahnsung, Sun Phillip Zhe	4. 巻 36
2. 論文標題 Detection of tissue pH with quantitative chemical exchange saturation transfer magnetic resonance imaging	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 NMR in Biomedicine	6. 最初と最後の頁 e4711
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/nbm.4711	査読の有無 有
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 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 寛雄三, 五十嵐崇浩, 梶本隆太, 児玉智信, 大島秀規, 大谷直樹, 吉野篤緒
2. 発表標題 ラット脳梗塞モデルにおける神経細胞死に対するEpac2の影響
3. 学会等名 第66回日本脳循環代謝学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 五十嵐崇浩, 箕雄三, 塩川諒治, 梶本隆太, 大島秀規, 大谷直樹, Kimberly T William, Sheth N Kevin, 吉野篤緒
2. 発表標題 脳血管障害とスルホニルウレア受容体: 炎症性反応、免疫反応、そしてEpacとの関連について
3. 学会等名 STROKE2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 五十嵐崇浩, 梶本隆太, 大島秀規, 大谷直樹, 吉野篤緒
2. 発表標題 最新イメージング: CEST-MRI技術を用いたpH imagingのできる事
3. 学会等名 第65回日本脳循環代謝学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 五十嵐崇浩
2. 発表標題 これからの脳血管障害に伴うてんかんマネジメント~急性期から維持期を見据えたアプローチ~
3. 学会等名 STROKE 2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takahiro Igarashi, Ryuta Kajimoto, Hideki Oshima, Naoki Otani, Atsuo Yoshino
2. 発表標題 Novel MRI technique for the era of mechanical thrombectomy: pH imaging for CEST MRI
3. 学会等名 The 14th World Stroke Congress (WSC 2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 五十嵐崇浩, 梶本隆太, 須磨健, 大島秀規, 大谷直樹, 吉野篤緒
2. 発表標題 最新のMRI技術: 超急性期脳梗塞におけるpH-weighted-image
3. 学会等名 第64回日本脳循環代謝学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 五十嵐崇浩
2. 発表標題 これからの脳血管障害に伴うてんかんマネジメント~急性期から維持期を見据えたアプローチ~
3. 学会等名 第80回日本脳神経外科学会総会(招待講演)
4. 発表年 2021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
研究分担者	大島 秀規 (OSHIMA Hideki) (20328735)	日本大学・医学部・准教授 (32665)	
研究分担者	須磨 健 (SUMA Takeshi) (20526115)	日本大学・医学部・准教授 (32665)	
研究分担者	大谷 直樹 (OTANI Naoki) (20573637)	日本大学・医学部・准教授 (32665)	

6. 研究組織（つづき）

	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	梶本 隆太 (KAJIMOTO Ryuta) (90883041)	日本大学・医学部・助教 (32665)	

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		
米国	ハーバード大学	エモリー大学	