

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 21 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22592271

研究課題名（和文） 局所脳虚血モデルを用いたリドカイン脳保護作用の解明

研究課題名（英文） Elucidation of cerebral protection of lidocaine with transient cortical ischemia/reperfusion model

研究代表者

百田 義弘 (MOMOTA YOSHIHIRO)

大阪歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：60247880

研究成果の概要（和文）：リドカインを 30 分間の一過性局所脳虚血負荷の前に投与することにより、再灌流 5 日後には対照群と比較し梗塞域の縮小が確認された。免疫組織化学染色により梗塞巣内における Caspase3 の発現はリドカイン投与群、対照群ともにわずかに観察されたが両群間で差はみられなかった。リドカイン前投与による梗塞域縮小の一因として梗塞巣内の微小血管周囲および、ペナンプラ領域での nestin 陽性神経幹細胞の発現が観察され、反応性グリア細胞とは異なる神経再生機転の亢進が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Reduction of infarct size was confirmed in comparison with the control group 5 days after 30 min middle cerebral artery occlusion (MCAO) and reperfusion by administering lidocaine before MCAO. Expression of Caspase3 in infarct area was observed slightly in both lidocaine and control group by immunohistochemical staining, but there was not difference between the two groups. Nestin-positive neural stem cells were expressed around microvasculature in the infarct area and penumbra region. It was suggested that nestin-positive neural stem cells were often observed as a cause of the infarct zone reduced by pharmacological preconditioning of lidocaine, enhancement of nerve regeneration with that is different from the reactive glial cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
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：歯学・外科系歯学

キーワード：脳、神経・脳神経疾患・神経科学・再生医学

1. 研究開始当初の背景

(1) 脳虚血耐性現象を獲得する手段として、軽度の虚血負荷を予め加えるプレコンディショニングが報告され、さらに致死的な虚血負荷後、緩徐に再灌流することによっても致死性虚血域が減少するポストコンディショニングに関しても研究成果が報告されている。吸入麻酔薬を用いた脳虚血耐性獲得につ

いても研究報告があるが急性期の評価であり、脳保護作用については不明な点が多い。

(2) リドカインもナトリウムチャンネルの遮断によるグルタミン酸の放出抑制や細胞内カルシウム増加抑制、さらには虚血周辺部におけるアポトーシスの抑制が関与するといわれている。一方、一酸化炭素を吸入したヒツジにおいて、リドカイン静脈内投与は脳白

質の梗塞サイズを拡大するともいわれ、リドカインの脳保護作用を否定した報告もあり、リドカインの脳保護効果のメカニズムについては不明な点が多い。

2. 研究の目的

連携研究者である松山らが開発したマウス中大脳動脈局所脳虚血モデルを用い、致命的虚血負荷に先立ち、リドカインを全身投与した際のリドカインの脳保護効果について神経再生の面から検討した。

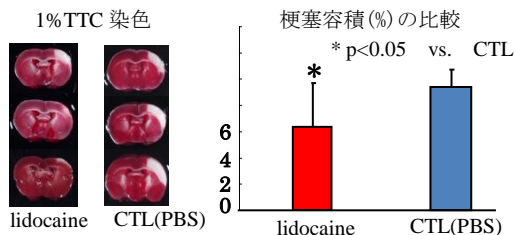
3. 研究の方法

(1) CB-17 系統マウス—過性脳虚血/再灌流モデルを用いて、対照群として PBS, リドカイン群としてリドカインを虚血負荷 30 分前に腹腔内投与し、再灌流 5 日後に 1%TTC 染色を行い梗塞域を比較する。

(2) PBS, リドカインを虚血負荷 30 分前に投与し、再灌流 5 日後の脳組織切片を用いて、虚血負荷領域におけるアポトーシスのマーカーである Caspase3 の発現, アストロサイトのマーカーである GFAP, 神経幹細胞のマーカーである nestin, さらに幼弱神経細胞マーカーである DCX の発現について免疫組織化学染色により比較検討する。

4. 研究成果

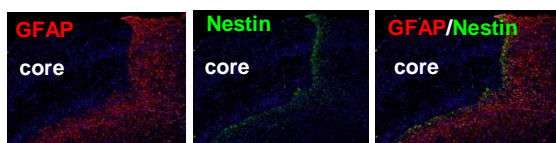
(1)



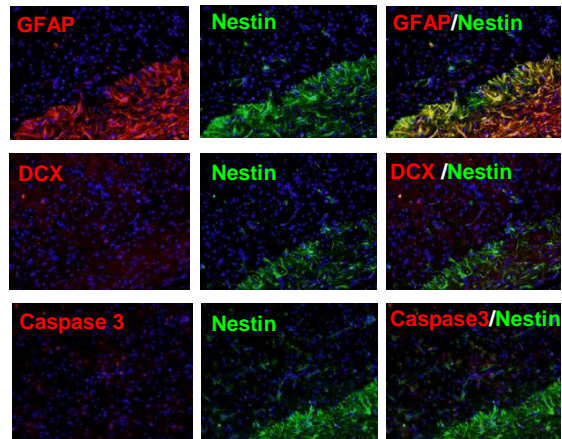
致命的虚血負荷の 30 分前にリドカインを腹腔内投与することで再灌流 5 日後には、CTL(PBS)と比較し、梗塞容積が減少し有意差が認められた。

(2) CTL (PBS I.P: 5 days after 30min MCAO)

弱拡大



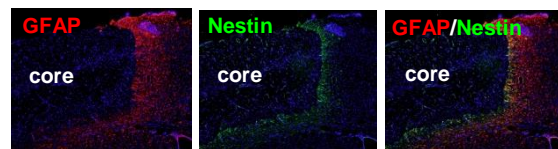
強拡大



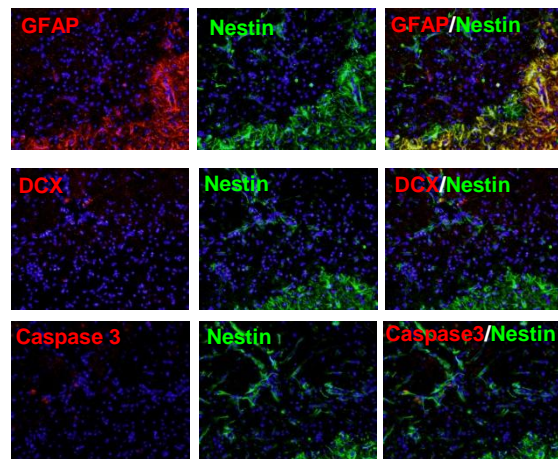
CTL(PBS)群では、梗塞巣内ではアストロサイトは完全に脱落し、nestin 陽性細胞もほとんど観察されなかった。一方、penumbra で多く発現する nestin 陽性細胞のほとんどは GFAP 陽性細胞であったことから、30 分間の致命的虚血負荷再灌流傷害では、反応性アストロサイトによる神経再生が亢進することが明らかとなった。梗塞巣にわずかに発現した nestin 陽性細胞の一部は DCX 陽性細胞である可能性が示唆された。さらに、梗塞巣内においてわずかに Caspase3 陽性細胞の発現が認められたが、その数はわずかであった。

(3) (lidocaine I.P:5 days after 30min MCAO)

弱拡大



強拡大



lidocaine 群では、梗塞巣内でアストロサイトは完全に脱落した。nestin 陽性細胞は CTL(PBS)群と比較し、pia mater から微小血

管周囲に多く発現した。さらに, penumbra で観察された nestin 陽性細胞の一部は GFAP 陽性細胞であったが, nestin 陽性細胞の多くは CTL(PBS)群と比較し, GFAP 陽性反応性アストロサイトとは異なる細胞であることが明らかとなった。梗塞巣に発現した DCX 陽性細胞は, 微小血管周囲で観察され, 一部は nestin 陽性細胞であったことから lidocaine 投与により梗塞巣においても神経再生機転が亢進する可能性が示された。さらに, Caspase3 陽性細胞は CTL(PBS)群と同様に梗塞巣内でわずかに発現した。

リドカインを一過性虚血負荷前に全身投与することにより, 梗塞域の縮小が観察され脳保護効果を示した。リドカインによる脳保護作用のメカニズムとして, これまでアポトーシスの抑制が示唆されてきたが, 本研究結果から, 虚血領域において反応性グリア細胞とは異なる神経再生機転が亢進することが明らかとなった。

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 6 件)

(1) Kasahara Y, Ihara M, Nakagomi T, Momota Y, Sterm D, Matsuyama T, Taguchi A. An highly reproducible model of cerebral ischemia/reperfusion with extended survival in CB-17 mice. *Neurosci Res* 2013. 査読有 In Press
DOI:10.1016/j.neures.2013.04.001.

(2) Matsushita Y, Momota Y, Kotani J. Dental management under general anesthesia in an intellectually disabled adult patient with phenylketonuria. *J Dent Sci* 2013 ; 8 : 96-97. 査読有
DOI:10.1016/j.jds.2012.12.003.

(3) Kishimoto N, Momota Y, Hashimoto Y, Ando K, Omasa T, Kotani J. Dedifferentiated fat cells differentiate into osteoblasts in titanium fiber mesh. *Cytotechnology* 2013 ; 65:15-22. 査読有
DOI: 10.1007/s10616-012-9456-z.

(4) Onishi A, Miyamae M, Inoue H, Kaneda K, Okusa C, Inamura Y, Shiomi M, Koshinuma S, Momota Y, Figueredo VM. Sevoflurane confers additive cardioprotection to ethanol preconditioning associated with enhanced phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 β and inhibition of mitochondrial permeability transition

pore opening. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2012. 査読有
DOI:10.1053/j.jvca.2012.10.002.

(5) Kishimoto N, Momota Y, Hashimoto Y, Omasa T, Kotani J. Self-assembling peptide RADA16 as a scaffold in bone tissue engineering using dedifferentiated fat cells. *J Oral Tissue Engin* 2011;8:151-161. 査読有

(6) Momota Y, Kaneda K, Arishiro K, Kishimoto N, Kanou S, Kotani J. Changes in blood pressure during induction of anesthesia and oral and maxillofacial surgery by type and timing of discontinuation of antihypertensive drugs. *Anesth Prog* 2010 ; 57 : 13-17. 査読有
DOI:10.2344/0003-3006-57.1.13.

[学会発表] (計 19 件)

(1) 柴田啓貴. 大脳皮質梗塞にともなう二次神経変性領域での内因性神経幹細胞の発現. 第 38 回日本脳卒中学会-STROKE2013-2013. 3. 21-23. グランドプリンスホテル新高輪 (東京都)

(2) 百田義弘. マウス一過性虚血脳虚血誘導性神経幹細胞の発現. 日本蘇生学会第31回大会 2012. 11. 23-24. ピアザ淡海 (天津市)

(3) 百田義弘. 一過性虚血脳虚血負荷により誘導される血管周皮細胞由来神経幹細胞. 第24回日本脳循環代謝学会総会 2012. 11. 8-9. リーガロイヤルホテル広島 (広島市)

(4) 百田義弘. 一過性脳虚血により誘導されるペリサイト由来神経幹細胞の発現. 第40回日本歯科麻酔学会 2012. 10. 5-6. アクロス福岡 (福岡市)

(5) 百田義弘. 一過性脳虚血により誘導されるペリサイト由来神経幹細胞の発現. 第35回日本神経科学大会 (Neuroscience2012) 2012. 9. 18-21. 名古屋国際会議場 (名古屋市)

(6) 岸本直隆. ヒト脱分化脂肪細胞は脂肪幹細胞より骨芽細胞分化能が高い. 第10回日本再生歯科医学会総会・学術大会 2012. 9. 1-2. ニチイ学館 神戸ポートアイランドセンター (神戸市)

(7) Momota Y. Expression of transient cortical ischemia induced neural stem/progenitor cells in mice. 2012 Sino-Japan Dental Conference (日中歯科医学大会 2012) 2012. 4. 26-27. 四川大学 (中国・成都市)

(8) Momota Y. Cerebral protection effects of lidocaine using a transient cortical ischemia model. 13th International Dental Congress on Anesthesia, Sedation, and Pain Control 2012. 3. 2. Kona, Hawaii (USA)

(9) Yamabayashi K. Lidocaine postconditioning attenuates myocardial infarct size *in vivo* rabbits hearts: role of extracellular signal-regulated kinase 1/2 ERK 1/2. 13th International Dental Congress on Anesthesia, Sedation, and Pain Control 2012. 3. 2. Kona, Hawaii (USA)

(10) 百田義弘. 一過性脳虚血誘導性神経幹細胞の発現. 第 23 回日本脳循環代謝学会総会 2011. 11. 4-5. 都市センターホテル (東京都)

(11) 岸本直隆. 脱分化脂肪細胞を用いた骨組織工学における自己組織化ペプチド RADA16 の足場材料としての有用性. 第 8 回日本再生歯科医学会学術大会・総会 2011. 10. 30. 愛知学院大学 (名古屋市)

(12) 岸本直隆. 脱分化脂肪細胞は Titanium Web スキャホールド内で骨芽細胞へ分化する. 第 9 回日本再生歯科医学会学術大会・総会 2011. 9. 10. 大阪国際会議場 (大阪市)

(13) Momota Y. Expression of neural stem cells induced by transient cortical ischemia in mice. XXVth International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism, and Function. 2011. 5. 25-28. Barcelona (Spain)

(14) 岸本直隆. 脱分化脂肪細胞と自己組織化ペプチド RADA16 を用いた骨組織再生の検討. 第 10 回日本再生医療学会総会 2011. 3. 1. 京王プラザホテル (東京都)

(15) 百田義弘. マウス虚血再灌流モデルにおける神経幹細胞の発現の検討. 第 22 回日本脳循環代謝学会総会 2010. 11. 26. 千里ライフサイエンスセンター (豊中市)

(16) Arishiro K. Remote preconditioning by carotid artery occlusion limits myocardial infarct size: role of MAPK. American Society of Anesthesiologist Annual Meeting 2010 2010. 10. 17. San Diego (USA)

(17) 百田義弘. ウサギ *in vivo* 心筋虚血再灌流モデルを用いたリドカインの薬理的ポストアコンディショニング効果. 第 38 回日本歯科麻酔学会総会・学術集会 2010. 10. 9.

横須賀芸術劇場 (横須賀市)

(18) 百田義弘. マウス一過性脳虚血再灌流モデルを用いた神経細胞死発現時間の検討. 第 38 回日本歯科麻酔学会総会・学術集会 2010. 10. 8. 横須賀芸術劇場 (横須賀市)

(19) Arishiro K. Remote preconditioning by bilateral carotid artery occlusion limits myocardial infarct size in *in vivo* rabbit hearts: involvement of extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2). European Society of Cardiology (EOS) Congress 2010 2010. 8. 29. Stockholm (Sweden)

〔図書〕 (計 1 件)

(1) 百田義弘 他. 学建書院、歯科衛生士テキスト 歯科麻酔学、2013: 127.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

百田 義弘 (MOMOTA YOSHIHIRO)
大阪歯科大学・歯学部・講師
研究者番号: 60247880

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

宮前 雅見 (MIYAMAE MASAMI)
大阪歯科大学・歯学部・講師
研究者番号: 20298821

松山 知弘 (MATSUYAMA TOMOHIRO)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号: 10219529