

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 14 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592477

研究課題名(和文) 迷走神経刺激による周産期脳障害の予防の試み

研究課題名(英文) Therapeutic approach using activation of the cholinergic response via acetylcholine receptor on tissue damage after HI in the developing brain.

研究代表者

古川 誠志 (Furukawa, Seishi)

宮崎大学・医学部・准教授

研究者番号：10347073

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：幼若ラットの低酸素虚血による脳障害モデルで、アセチルコリン刺激薬あるいは遮断薬が脳障害を劇的に軽減もしくは増悪させた。また低酸素虚血後の脳内ミクログリアの活性化のタイミングが部位別に異なり、脳内IL-1の産生も高まっていた。これらの結果を踏まえて、低酸素虚血後のミクログリアの活性化のタイミングに合わせて迷走神経刺激薬を投与すると、ミクログリアの活性化も抑制され脳障害が軽減した。このように周産期における低酸素虚血後の脳障害には炎症が強く関与し、迷走神経刺激が障害抑制に有効であることが分かった。

研究成果の概要(英文)：The efficacy of cholinergic stimulation for hypoxic-ischemic brain damage was evaluated in newborn rats. Cholinergic stimulation showed a marked reduction of brain damage, on the other hand, cholinergic inhibition showed a marked exacerbation. Regional specificity was observed for both microglial activation and susceptibility to cholinergic stimulation after hypoxia-ischemia. IL-1 production was also noted on hypoxic-ischemic brain. Regional microglial activation and IL-1 production was significantly reduced with timely cholinergic stimulation. Thus, we demonstrated that cholinergic stimulation reduced brain damage with a suppressive effect on microglial activation and IL-1 in a newborn rat model of hypoxia-ischemia. Under hypoxic-ischemic environments, activation of the cholinergic inflammatory response is effective against perinatal brain damage.

研究分野：周産期医学

キーワード：周産期脳障害 低酸素虚血 ラット 迷走神経 炎症 治療

1. 研究開始当初の背景

周産期脳障害のおよそ 20%は低酸素虚血によるものである。低酸素虚血による脳障害発生のメカニズムはまだ十分に解明されていないが、経時的には幾つかの段階がある。まず 低酸素虚血の直接的な組織障害(梗塞)次に 低酸素虚血による1次性エネルギー障害による細胞死(興奮性アミノ酸放出後の細胞内カルシウムイオン濃度の上昇によるカルシウム依存性の酵素の活性化)次に 血流再開、再酸素化による2次性エネルギー障害による細胞死(再還流後の活性酸素の発生と細胞内カルシウム濃度の増加に伴うミトコンドリア機能不全)である。

これまで神経保護の為に細胞死のカスケードに沿った薬物が選択され、その効果が検証されてきたが、臨床応用にまで達した薬剤はエダラボンが唯一と言っても過言ではない。新たな治療薬の開発や発見が待たれる。そのような状況で、近年脳障害の発生過程で炎症反応が脳障害発生に深く関与する事が判明した。しかし脳内の炎症反応を制御することが神経細胞保護につながるかはまだ明らかではない。2003年に迷走神経が免疫防御機能として働く事が明らかにされた。マクロファージにはニコチン性アセチルコリン受容体(7nAChR)があり、これにアセチルコリンが結合する事でマクロファージ内から産生されるTNFやHMGB-1などのサイトカインの放出を抑制することで免疫システムを制御するという。さらに動物実験では迷走刺激による免疫誘導が、実験的に誘発した炎症を軽減し、重症化へ進展を防いでいる。

2. 研究の目的

周産期脳障害モデルを用い、脳内迷走神経系の賦活化による周産期脳障害軽減効果を検証しそのメカニズムを明らかにすること。

3. 研究の方法

実験モデル:7生日のWistarラットを用い、左側の頸動脈を結紮した後に33の環境下で1~2時間の8%低酸素負荷を行なう。結紮側に脳障害が認められる。組織障害の評価は脳切片をHE染色し、コンピューターに画像で保存後、障害側の大脳半球面積を計測し比較した。

脳障害に対する迷走神経系刺激あるいは遮断の影響の評価:神経遮断薬にはメカミラミン(非選択的ニコチン受容体遮断;5,10mg/kg、皮下注)、メチルリカコニチン(7選択的ニコチン受容体遮断;5,10mg/kg、皮下注)、アトロピン(ムスカリン受容体遮断;10mg/kg、皮下注)を使用した。迷走神経刺激にはカルバコール(0.1mg/kg、皮下注)を投与した。またアルツハイマー病の治療薬に用いられるアセチルコリンエステラーゼ阻害薬(ガランタミン、5.0mg/kg)も用いた。これらの薬剤はいずれも血液脳関門を通過する。低酸素直前にラットに投与し、実験後から7日目に脳障害の程度を観察した。

脳内ミクログリアの低酸素虚血による脳障害への関与の評価:ミクログリアの集簇をトマトレクチンによる免疫染色によって評価した。

幼若ラットの低酸素虚血による脳障害脳内炎症の評価:結紮側の脳組織中のサイトカインであるIL-1の定量を行った。

4. 研究成果

幼弱ラットの低酸素虚血による脳障害モデルでアセチルコリン刺激薬あるいは遮断薬が脳障害を劇的に軽減もしくは増幅する事を報告した(Furukawa S, et al. Acetylcholine Receptor Agonist Reduces Brain Damage Induced by Hypoxia-Ischemia in Newborn

Rats. *Reprod Sci.* 2010 ; Furukawa et al., Activation of acetylcholine receptors and microglia in hypoxic-ischemic brain damage in newborn rats. *Brain Dev.* 2013)。その過程でミクログリアの活性化と脳障害が深く関係することを見いだした(Furukawa et al., Activation of acetylcholine receptors and microglia in hypoxic-ischemic brain damage in newborn rats. *Brain Dev.* 2013)。また低酸素虚血後のミクログリアの活性化のタイミングが脳の各部位で異なる事も見いだした(Furukawa S et al., Regional differences of microglial accumulation within 72 hours of hypoxia-ischemia and the effect of acetylcholine receptor agonist on brain damage and microglial activation in newborn rats. *Brain Res.* 2014)。脳内部位別で異なるミクログリア活性化のタイミングに合わせ、薬物による迷走神経刺激を行う事でミクログリアの活性化の抑制と脳障害の軽減できることも実証した。(Furukawa S et al., Repetitive administration of acetylcholine receptor agonist rescues brain inflammation and brain damage after hypoxia-ischemia in newborn rat. *J Perinat Med.* 2013)。脳内炎症は長期的には小児期領域での多動症、成人領域でのアルツハイマー病に代表される白質障害に関与する可能性がある。そこでアセチルコリンエステラーゼ阻害薬であるガラントミンを用いた実験を行ったが、低酸素負荷前投与群では脳障害が軽減されたが、加えてミクログリアの集積を伴うことなく、またIL-1の上昇も認めなかった(Furukawa S, et al. Galantamine, an acetylcholinesterase inhibitor, reduces brain damage induced by hypoxia-ischemia in newborn rats. *Int J Dev Neurosci.* 2014)。これらの結果から幼若ラットでは脳内迷走神経系の賦活化は周産期脳障害軽減に有効であることが判明した。障害のメカニズムと

して梗塞以外に低酸素虚血後に活性化するミクログリアの産生するIL-1などのサイトカインが深く関与していると考えられた。またミクログリアの活性化は脳部位別に違いがあり、そのタイミングに合わせて治療を行う必要があることも分かった。作用時間の長いアセチルコリンエステラーゼ阻害薬(ガラントミン)は低酸素虚血後早期から活性化するミクログリアと遅発性に活性化するミクログリアの両方を抑制でき、炎症のリクルートメントを抑制することで、白質障害が軽減できることが判明した。

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5件)

1. Furukawa S, Sameshima H, Yang L, Harishkumar M, Ikenoue T. Regional differences of microglial accumulation within 72 hours of hypoxia-ischemia and the effect of acetylcholine receptor agonist on brain damage and microglial activation in newborn rats. *Brain Res.* 査読有, 2014, 8;1562:52-8. doi: 10.1016/j.brainres.2014.03.028.
2. Furukawa S, Yang L, Sameshima H, Ikenoue T. Repetitive administration of acetylcholine receptor agonist rescues brain inflammation and brain damage after hypoxia-ischemia in newborn rat. *J Perinat Med.* 査読有, 2014 ;42(3):379-84. doi: 10.1515/jpm-2013-0175.
3. Furukawa S, Yang L, Sameshima H. Galantamine, an acetylcholin- esterase inhibitor, reduces brain damage induced by hypoxia-ischemia in newborn rats. *Int J Dev Neurosci.* 査読有, 2014;37:52-7. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2014.06.011.

4. Furukawa S, Sameshima H, Yang L, Ikenoue T. Activation of acetylcholine receptors and microglia in hypoxic-ischemic brain damage in newborn rats. *Brain Dev.* 2013;35(7):607-13.

doi:10.1016/j.braindev.2012.10.006.

5. Furukawa S, Sameshima H, Yang L, Ikenoue T. Acetylcholine receptor agonist reduces brain damage induced by hypoxia-ischemia in newborn rats. *査読有, Reprod Sci.* 2011;18(2):172-9. doi: 10.1177/19337191110385129.

〔学会発表〕(計9件)

1. Furukawa S, Yang L, Sameshima H, Ikenoue T. Nicotinic cholinergic receptor agonist prevents brain damage induced by hypoxia-ischemia in newborn rats. The 57th Annual Meeting of the SGI. March 24-27, 2010, in Orlando, Florida, USA.

2. Furukawa S, Yang L, Sameshima H, Ikenoue T. Stimulation or inhibition of acetylcholine receptor in the brain modifies brain damage induced by hypoxia-ischemia in newborn rats. 6th INTERNATIONAL ACADEMY OF PERINATAL MEDICINE (IAPM). 2010.10.22. Osaka (Japan).

3. Furukawa S, Yang L, Sameshima H, Ikenoue T. Stimulation or inhibition of acetylcholine receptor in the brain modifies brain damage induced by hypoxia-ischemia in newborn rats. SGI Annual Scientific Meeting Miami Beach, Florida, USA March 16 - 19, 2011.

4. Furukawa S, Yang L, Sameshima H, Ikenoue T. Regional difference of protecting effect of acetylcholine receptor agonist on brain damage induced by hypoxia-ischemia in newborn rats. SGI Annual Scientific Meeting San Diego, CA,

USA March 21-24, 2012.

5. Furukawa S, Fetal heart rate monitoring; The meaning of parasympathetic nerve activities around parturition. International Perinatal Medicine Forum (Wenzhou, China. 2012)

6. Furukawa S, Yang L, Sameshima H, Ikenoue T. Galantamine, known as acetylcholinesterase inhibitor reduces brain damage induced by hypoxia-ischemia in newborn rats. SGI Annual Scientific Meeting Orland, Florida, USA March 20-23, 2013.

7. Furukawa S, Yang L, Sameshima H, Ikenoue T. A new therapeutic approach for perinatal hypoxic-ischemic brain damage - Activation of the cholinergic anti-inflammatory pathway-. XI WORLD CONGRESS OF PERINATAL MEDICINE (Moscow, Russia. 2013).

8. Furukawa S, Yang L, Sameshima H, Ikenoue T. EP3 Receptor Antagonist Reduces Brain Damage Induced by Inflammation and Hypoxia-Ischemia in Newborn Rats. SGI Annual Scientific Meeting Florence, Italy, March 26-29, 2014.

9. 古川誠志、鮫島浩、池ノ上克：周産期脳障害モデルにおけるアセチルコリンエステラーゼ阻害剤の脳障害軽減効果
第50回日本周産期・新生児医学会学術集会 (2014)、7月14日(日)～16日(火) / 会場：パシフィコ横浜・会議センター

〔図書〕(計1件)

古川 誠志、池ノ上 克：胎児心拍数細変動の重要性

CTGモニタリングテキスト(共著):49-54(2013)

〔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：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古川誠志 (FURUKAWA, Seishi)

宮崎大学・医学部・准教授

研究者番号：10347073

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：