

氏名	菱山 壮平
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	医工博4甲 第288号
学位授与年月日	令和2年3月19日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
専攻名	生体制御学専攻
学位論文題名	Neuroprotective effects of neurotropin in a mouse model of hypoxic–ischemic brain injury (低酸素脳虚血マウスモデルにおけるノイロトロピンの脳保護作用)
論文審査委員	委員長 教授 小口 敏夫 委員 准教授 川瀧 智之 委員 講師 篠崎 陽一

## 学位論文内容の要旨

(研究の目的)

Ischemic–hypoxic insult leads to detrimental effects on multiple organs. The brain is especially vulnerable, and it is hard to regenerate once damaged. Currently, therapeutic options are very limited. Previous studies have reported neuroprotective effects of neurotropin, a non-protein extract derived from the inflamed skin of rabbits inoculated with vaccinia virus, using a murine model of peripheral nerve injury and cultured cell lines.

However, whether neurotropin might have protective effects against brain injuries remains unclear. We, therefore, investigated the neuroprotective effect of neurotropin and possible underlying mechanisms, using a mouse model of hypoxic–ischemic brain injury.

(方法)

Hypoxic–ischemic brain injury was induced via a combination of the left common carotid artery occlusion and exposure to hypoxic environment (8% oxygen) in adult male

C57BL/6 mice. Immediately following induction of hypoxia–ischemia, mice received either saline or 2.4 units of neurotrophin.

After the hypoxic-ischemic insult, the survival rate over 7 days was assessed. Neurological functions were evaluated using the neurological deficit score (0: no deficit; 1: flexion of the torso; 2: circling to one side; 3: longitudinal circling; 4: no spontaneous activity; 5: death).

Another set of 20 mice was used and euthanized 24 hours after the hypoxic-ischemic insult. Infarct volume was analyzed using 2,3,5-Triphenyl tetrazolium chloride (TTC).

Further, Real-time PCR was used to evaluate inflammatory cytokine expressions.

(結果)

Compared to the control group, the neurotrophin group exhibited a significantly higher survival rate (100% vs. 62.5%,  $p < 0.05$ ) and lower neurological deficit scores (1; 0–2 vs. 3; 0–5, median; range,  $p < 0.05$ ) after the hypoxic–ischemic insult. The administration of neurotrophin also reduced infarct volume ( $18.3 \pm 5.1\%$  vs.  $38.3 \pm 7.2\%$ ,  $p < 0.05$ ) and mRNA expression of pro-inflammatory cytokines.

(考察)

In the present study, exposure to hypoxic–ischemic insult caused cerebral infarction and led to a 40% mortality rate in untreated mice. The administration of neurotrophin after hypoxic–ischemic insult successfully attenuated the brain injury and improved survival rate and neurological function, demonstrating the neuroprotective effect of post-treatment with neurotrophin.

Administration of neurotrophin systemically did not affect the heart rate or blood pressure, suggesting cerebral blood flow was not affected by neurotrophin. Thus,

the neuroprotective effects of neurotrophin observed in this study were unlikely to be a result of changes in hemodynamics.

The neurological function of neurotrophin-treated mice at 7 days after hypoxic–ischemic insult was found to be almost fully recovered, possibly indicating that neurotrophin attenuates hypoxic–ischemic brain injury by suppressing not only the initial local inflammation but also the expansion of the inflammation. Inhibition of pro-inflammatory cytokine production is a likely mechanism underlying the neuroprotective effect of neurotrophin.

## 論文審査結果の要旨

脳梗塞は、国内外で死因上位の疾患である。加齢により無症候性の頸動脈狭窄が生じて脳梗塞へ進展する危険性が高まることから、超高齢化の進むわが国ではますます重要な位置づけとなっている。また、運よく一命をとりとめた場合にも、虚血を受けた脳神経細胞は不可逆的なダメージを受けることが知られており、その際の有効な対処法が望まれている。一方、手術時の全身麻酔下でも脳虚血または低還流を起こすことがあり、低酸素症を引き起こすリスクも見逃せない。本研究は、脳細胞が虚血により低酸素状態に置かれたときに、ノイロトロピンの投与に保護効果があることを示したものである。ノイロトロピンは300種類以上の生理活性物質を含み、腰痛症、頸肩腕症候群、変形性関節炎、アレルギー性鼻炎、皮膚掻痒などに効果をもつ薬剤である。そしてノイロトロピンの作用は、末梢神経系でマップキナーゼカスケードを介して炎症を阻害し、NGF産生を増やして神経保護・神経成長を促す作用が考えられている。この点に着目し、発表者は中枢神経系での疾患、すなわち炎症が関与する脳梗塞にも保護作用があるのではないかと考え研究に着手した。

発表者は、脳虚血モデルを開発した。8-10週齢の雄マウスを全身麻酔下で頸動脈結索したのち、脳を低酸素環境に一定時間暴露。暴露直後、コントロール群では生理食塩水を、治療群にはノイロトロピン注射液を腹腔内投与する。そのモデルを用いて7日後の生存率を比較したところ、コントロール群およびノイロトロピン投与群はそれぞれ60%および100%であり、ノイロトロピンの脳保護作用が明らかに示された。また、脳梗塞体積および各種炎症性サイトカイン mRNA の発現量を測定し、その保護作用の結果に関する裏付けを示した。審議の結果、以上の方法論は新規性・独創性のあるものであり、結果の信頼性にも問題ないと判断した。

今後としては、各種 mRNA の発現量の時間的発現の変化やタンパク発現の組織内分布等の解明が課題であると判断された。また、ノイロトロピンの投与量が臨床使用量よりも顕著に多いことが指摘され、今後、本研究結果の臨床への応用性が問われた。発表者からは、ノイロトロピンの適応疾患への臨床使用量でも脳梗塞に対する保護作用は期待できる可能性は十分にあること、そして動物モデルで低濃度での保護効果を検討して臨床研究に移行する予定であるといった展望が述べられた。

以上のことより、本論文が学位論文に値することを審査委員全員一致で承認した。なお、本研究は *Journal of Anesthesia*, **33**, 495-500 (2019) にすでに掲載済みであることを申し添える。