

課題番号 8

慢性脳低灌流に関与する血管内皮障害の影響

[1] 組織

代表者：若狭 良成
(秋田大学医学部 脳神経外科)
対応者：中瀬 泰然
(東北大学加齢医学研究所)
協力者：清水 宏明
(秋田大学医学部 脳神経外科)

研究費：物件費 11 万 7 千円

[2] 研究経過

目的

近年、慢性心房細動や動脈硬化症による慢性脳低灌流状態あるいはエストロゲンなどの性ホルモン低下などが、血管内皮障害や血液脳関門 (BBB) の機能障害を惹起することにより、アルツハイマー病の病態修飾に関与している可能性が示唆されている。これまで、Presenilin や Apolipoprotein などの遺伝子改変動物を用いた研究が進められているが、効果的な治療法の開発には至っていない。実際、アルツハイマー病患者では遺伝的素因、環境素因、動脈硬化リスク、ホルモンバランスの変化などを併せ持っていることがほとんどであるため、その病態解明には多様な要因が関与する実臨床に近い新規アルツハイマー病態モデル開発の必要性が強く求められている。そこで本研究では、実臨床に近い新規ラットアルツハイマー病態モデルを用いて、血管内皮細胞—pericyte—astrocyte の細胞間連絡に生じる異常を分子レベルで解明し、「エストロゲン低下による血管内皮機能障害が慢性脳低灌流により助長され神経細胞障害が促進される」ことを明らかにする。

概要

7 週齢雌ラットの両側卵巣切除後に 1 か月間の食塩負荷飼料による高血圧誘導を行い、内皮機能低下を惹起する。さらに一側総頸動脈閉塞 + 他側総頸動脈高度狭窄による脳低灌流を誘導する。高度狭窄は 29 ゲージ針と一緒に結紮した後に針のみ除去することで作成できる。BBB 破壊程度は 3 日後の深麻酔後に Evans Blue を尾静脈から投与した後、大脳を取り出

し Evans Blue の浸潤程度を指標に評価する。

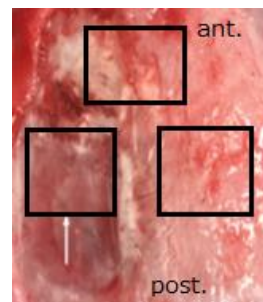
本研究ではエストロゲンが血管内皮機能障害に及ぼす影響を明らかにするため、i) 通常飼育のみのコントロール群、ii) 両側卵巣切除のみで飼育した低エストロゲン群、iii) 両側卵巣切除 + 食塩負荷で飼育した低エストロゲン高血圧群の 3 つの実験群に分類する。それぞれの群において頸部切開縫合のみの Sham operation を行ったシャム個体、一側総頸動脈閉塞 + 他側総頸動脈高度狭窄を作成した低灌流個体を準備する。それぞれの群の病態マウスを灌流固定した後、脳を摘出する。その後、凍結切片を作成し astrocyte や pericyte の各種細胞マーカー蛋白に対する抗体 (例：抗 GFAP 抗体や抗 NG2 抗体など) を用いて免疫組織化学染色を行い、各病態変化における各種細胞の変化を共焦点レーザー顕微鏡による観察で明らかにする。また血管内皮機能の維持には、内皮細胞—pericyte—astrocyte 間の細胞間連絡をつかさどるギャップ結合の発現が重要であることが知られている。そこでギャップ結合構成蛋白である connexin (Cx) や BBB 機能障害の指標となるタイト結合構成蛋白である zonula occludens-1 の発現量変化や分布異常について免疫組織染色を用いた病理学的検討を行う。

研究打ち合わせ等は、コロナウイルス蔓延への対策として主にメールと WEB 面談で情報交換を行なった。情報漏洩対策として個人情報 は 消 去 し、画 像 デー タ は 転送後速やかに削除した。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

ラット実験道具を整備し、各群 2 匹ずつ合計 6 匹の処置を行ない、手術の術式確立を目指した。まだプレリミナリーなデータであるため結果解析までは行えていない。今後、実験動物数を増やすとともに安定した結果を得て、データ解析を行う予定。



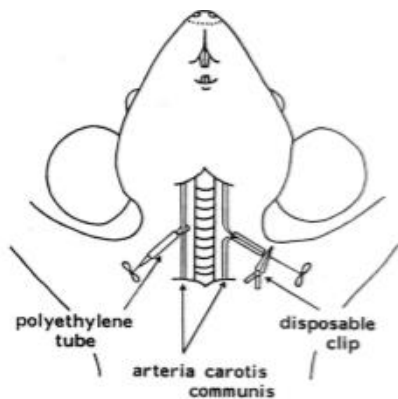
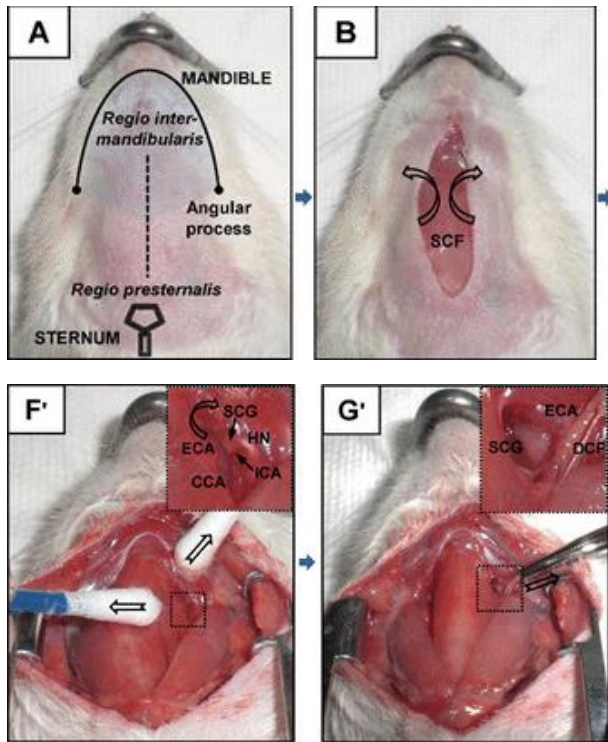


Fig. 1 Diagram of bilateral carotid artery occlusion in mice. The exposed artery was threaded through a small polyethylene tube, and the ends of the thread were ligated (shown on the left side). The occlusion was made by pulling the artery into the tube for a desired period, by protecting the release using a small disposable clip (shown on the right side).

(3-2) 波及効果と発展性など

本病態モデルは我々が長年蓄積してきた独自の知見に基づいた着想であり、国内外に同様の研究を行っているグループは我々の知る限り存在することはなく、独創性の高い研究である。性ホルモンによる内皮機能障害や酸化ストレスあるいは炎症反応による内皮機能障害など、個々の病態における研究報告は散見されるが、低エストロゲン状態に対して血行性ストレスをかけた病態モデルはこれまでになく、本研究により新しい知見が見い出される可能性が極めて高いと言える。他の神経変性疾患における脳循

環代謝の研究にも応用できると期待できるため、社会に大きく貢献できると考える。

[4] 成果資料

なし