

課題番号 17

高齢脳卒中患者に認められる肺血管透過性の亢進の分子機序 解明

[1] 組織

代表者：桑原 正貴

(東京大学大学院農学生命科学研究科)

対応者：鈴木 隆哉

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：

柄内 亮太

(東京大学大学院農学生命科学研究科)

武藤 達士

(秋田県立循環器脳脊髄センター)

研究費：物件費 25,065 円，旅費 174,935 円

[2] 研究経過

【目的および概要】

脳卒中における肺水腫を起こす病態として神経原性肺水腫(Neurogenic pulmonary edema: NPE)がある。これはくも膜下出血 (Subarachnoid hemorrhage: SAH)などの脳卒中の直後におこる全身合併症で、死因の多くを占める。急性肺水腫の病態の中心は、急激な循環動態の変化・炎症性物質の拡散による血管内皮バリア機能の破綻であるが、このバリア機能の破綻・修復メカニズムについてはよくわかっておらず、治療標的に乏しい。そのため、SAH後のNPE治療は、肺炎や敗血症を誘因とした急性呼吸頻拍症候群(Acute respiratory distress syndrome: ARDS)に準じた人工呼吸管理がほとんどであり、予後向上に向けた新規治療戦略が必須といえる。

最近では、血管内皮細胞の表面で保護的な層を構成するグリコカリックス(glycocalyx: GCX)が、炎症や循環動態の変化により直接障害され、様々な組織における血管透過性の亢進に関与していることが示唆されており、重症SAH後のNPEにおいてもGCXが治療標的となる可能性が考えられる。こうした背景の下、本研究の目的は、重症SAH後のNPEにおける血管内皮のGCX層の動態に着目し、モデル動物を用いて1.CGX障害の発症機構、2.増悪に関与しうる臓器連関ならびに加齢性変化の影響、3.CGX保護/修復治療を

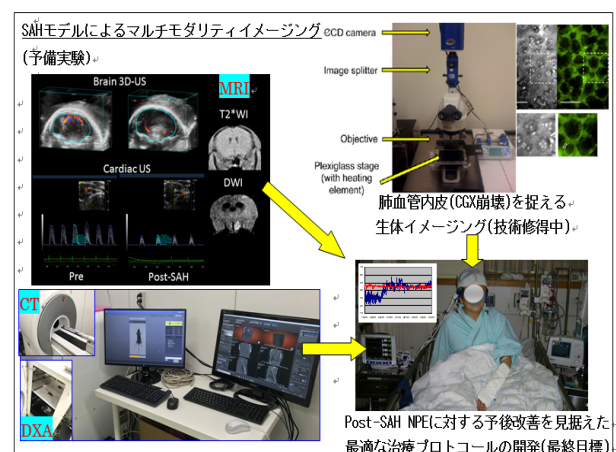
解明することにある。

【研究実施内容】

実験には、ヒトのSAHの好発年齢に相当する実験動物(マウス)に、全身麻酔下でナイロン糸を外頸動脈より挿入して内頸動脈先端部を破綻してSAHを誘発した後(endovascular perforation 法)、脳室内にフィブリンを投与することで作製するSAH-NPEモデルを用いる。また、動物は8-12週齢の成体マウスおよび加齢医学研究所で飼育されている自然加齢マウス(18-24ヶ月齢)を利用した。SAHの対照群として、血管内にナイロン糸を挿入するのみのsham-operated control群を設定した。

老齢マウスにおけるSAHモデルについて様々な条件を検討した。若年マウスで行ったナイロン糸挿入による出血モデルではほとんどの老齢マウスが死亡してしまった。モデルとして負荷が高すぎたため、あらたに自己血の脳槽内注入モデルを作成し、モデル作成後の生存率を高めた。

SAH後のNPEの経時変化については、MRI/脳灌流画像、CTなどのマルチモダリティ画像技術(下図)によるリアルタイム生体イメージングを導入して適時測定を行った。肺水腫が遷延した個体において、肺



を摘出してGCXの解析および肺構成細胞の遺伝子発現解析を試みる。画像取得は主に東京大学・プライムテック株式会社において行った。

摘出肺におけるGCXの撮像は、東京大学の電子顕微鏡(透過型・走査型双方)にて行った。肺の灌流固定技術が観察の要であり、マウスの肺灌流実験に長けた、

鈴木隆哉助教（呼吸器外科分野、受け入れ教員）の技術協力により実施した。

研究計画についてはオンライン会議システムにより1-2ヶ月に一度程度の頻度で分担者全員があつまり行っていた。老齢マウスのモデル作成についてはとくに苦労があり、数回のミーティングと試行錯誤を重ねた。年2回の老齢マウス供給にあわせ、加齢医学研究所に集合し、動物実験・検体採取を行った。

〔3〕 成果

（3-1）研究成果

1 若年のマウスを使用し、肺動脈カニューレーションをおこないランタンを含む固定液で **Glycocalyx** の電子顕微鏡による描出が可能か検討した。血管内皮表面に林立する **Glycocalyx** の描出ができた。

2 同様に若年マウスを利用しくも膜下出血（**SAH**）モデルを作成し、同様の固定を行った。右図2に見られるように、**SAH** をきたしたマウスでは、肺毛細管血管内皮表面における突起物が剥離していると思われた。これは **SAH** 後における循環動態の物理的な変化を反映していると考えられた。まは **HE** 染色でも肺水腫と一致する所見が認められた。さらに血清を採取しシンデカン濃度を **ELISA** により測定すると、統計的有意差はないものの、モデル動物においてシンデカン血中濃度が上昇しており、**SAH** モデルによるグリコカリックスの血管内放出（剥離）の存在が疑われた。

3 **SAH** モデルでの肺水腫の描出を、小動物用 **CT** および **MRI**（東京大学プライムテック）で行った。2で犠牲死させる直前に全身麻酔下画像を取得した。しかし急性期3日後の採取であったためか、画像上あきらかな肺水腫所見は認められなかった。

以上1-3についての結果を国際誌 **Microvascular research** へ投稿し、査読中である。

4 老齢マウス(24ヶ月齢)を使用し **SAH** モデルの作成を試みた。血管穿刺モデルでは全てのマウスが即死してしまうため、脳槽内への自己血注入モデルを作成した。しかし若年 **SAH** モデルのような明らかな血管内皮 **GCX** の変化が見られなかった。老齢マウスは疾病モデル負荷への耐性が低く、若年マウスと違ったモデル作成が必要であることが判明した。

5 死亡がみられない脳槽自己血注入にエンドセリン受容体拮抗薬であるピブラッツ注射を加えた。ピブラッツは血管攣縮抑制薬とされるが、臨床において肺水腫惹起する可能性のある薬物として知られている。しかしプラビッツ追加モデルではやや肺水腫を疑わせる所見もあり、現在電子顕微鏡による追加観察を行っている。

6 脳槽注入モデルでの組織学的変化は明らかでは

なかったが、定量が困難であるものの肺間質に若干の浮腫が認められたため、なんらかの遺伝子発現変化は見られる可能性があると考えた。脳槽自己血注入後超急性期（18時間後）の肺を採取し、網羅的遺伝子発現解析を行った。データを解析中である。

（3-2）波及効果と発展性など

本研究チームは令和5年度・6年度学際ハブ形成プログラム（金沢大学）に「加齢マウス超急性期神経原性肺水腫モデル解析による加齢寄与因子の解明」のタイトルで採択された。

〔4〕 成果資料

なし