

課題番号 9

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

[1] 組織

代表者：梶内 亮太

(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：武藤 達士

(秋田県立循環器脳脊髄センター)

研究費：物件費 43,220 円，旅費 156,780 円

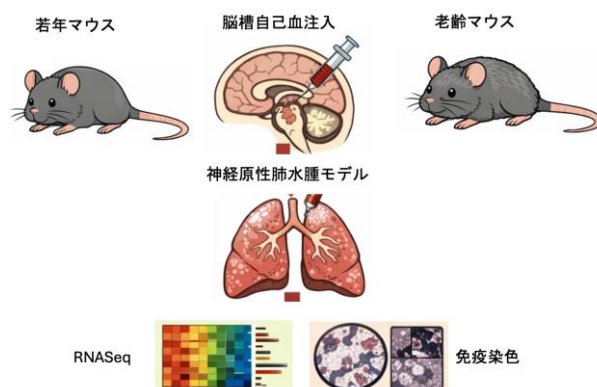
[2] 研究経過

肺疾患モデルとして神経原性肺水腫を用いる。我々はこれまでクモ膜下出血モデルマウスにおける急性期肺水腫のメカニズムについて、おもに血管内皮細胞グリコカリックスの役割を追求してきた。この過程でさまざまな神経原性肺水腫モデルを検討し、疾患超早期の血管内皮インテグリティの変動を研究してきた。現在はそのモデルを使用し、神経原性肺水腫が死因となりやすい高齢マウスについて検討し始めている。しかし高齢マウスは予想通り非常に脆弱で、若年マウスに使用するような脳出血モデルでは即死することが多い。そこで我々は自己血の脳槽注入モデルを使用し始めたが、これは逆に侵襲が不十分で組織像で明らかな肺水腫とわかる変化をもたらさなかった。

本研究はこの特徴を逆に利用するものである。組織像では明らかな定量化は困難であるが、極微量の肺水腫・間質浮腫は見られている。であればなんらかの遺伝子発現変化がみられることが予想され、さらにこの差は若年個体と老化個体で差がある可能性がある。この変化を捉えるために以下の4つのサンプルを検討する。

8週齢(若年)マウス：モデル作成前、作成後6時間、24時間のマウスを犠牲死させ、肺を採取する。右肺をRNA-Seq用サンプルとし、左肺は光学顕微鏡観察・電子顕微鏡観察用に固定する。マイクロサージャリーにより、我々は肺組織を極めて良好な状態で採取・固定する技術に我々は習熟している。まず若年マウスを検討することにより、反応遺伝子が立ち上がる時間軸を決定する。その時間軸に応じて24ヶ月齢マ

ウスを用意し、モデル作成前と最適時間の肺サンプルを採取する。得られたサンプルのRNAオミクス解析と、候補遺伝子発現の定量的な変化をqPCRと組織免疫染色で明らかにする。さらに我々が得意とする電子顕微鏡超微細形態観察により、血管内皮・肺胞上皮表面の糖鎖バリアの変化も明らかにする。



上記モデルの転写産物は肺全体の細胞を含むため、血液・上皮・内皮・間質細胞のそれぞれの役割は必ずしも明らかにならない。並行してHUVECおよび小気道上皮細胞(SAEC)を長期培養して分裂老化に陥らせ、酸化ストレス(高血糖培地・過酸化水素水暴露)による刺激を行い同様の遺伝子発現解析を行うことも検討する。

月に1回程度のオンラインミーティングを行い計画を決定したうえで、供給される加齢マウスを用いて実験を行った。モデル作成は主に梶内が行い、サンプル採取は鈴木が行った。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

これまでに、SAHの病態生理学的研究を遂行する上で有益な動物モデルが確立されてきた。血管内穿刺法(endovascular filament perforation technique: EFP)はSAHの主要な特徴を再現し得る手法であり、我々はEFPマウスモデルを用いた心拍変動解析において、NPEを模倣すると考えられる肺病変を呈する個体や、SDRRやRMSSDの低値、すなわち自律神経機能の著しい抑制を示す個体が存在することを確認している。このことは、EFPモデルが自律神経機能異常と

NPE との関連を研究するモデルとして有用であることを示唆している。一方で、EFP 単独では明らかな肺病変や自律神経変化を呈する個体は稀であり、NPE 研究における再現性が課題である。

我々は、EFP に大槽内血液注入を組み合わせた複合モデルを作製した。その結果、本モデルでは、限局的ではあるものの、肺病変を EFP モデルよりも高頻度に誘発することができた。複合モデルの肺を電子顕微鏡にて観察した結果、血管内皮の保護成分であるグリコカリックス (GCX) の剥離が認められた。この結果から、NPE の病態発現には GCX 脱落に伴う血管透過性の変化が関与しており、GCX 保護が SAH 後の NPE に対する新規治療ターゲットになる可能性が示唆された。このモデル開発を通じて、NPE を起こしていると考えられる肺の遺伝子発現の変化スピードを RNA シークエンスで捉え、老化指紋を割り出すことを試みた。PCA 解析をおこなうと、若年と老齢ではそもそものベースラインの遺伝子レベル発現が異なることが示唆され、現在このなかから特異的な因子を割り出しつつある。

(3-2) 波及効果と発展性など

本研究ではすでに原著論文をものにしており、これを元にさらなる外部資金獲得につなげる予定である。

[4] 成果資料

Tochinai R*, Suzuki T, Tomita K, Sekizawa SI, Okada Y, Taki Y, Kuwahara M, Mutoh T*.
Localized pulmonary vascular changes in a mouse model of subarachnoid hemorrhage created by combining filament perforation and blood injection. *Microvasc Res.* 2025 Apr 13;160:104810. doi: 10.1016/j.mvr.2025.104810. PMID: 40233848.