

(続紙 1)

京都大学	博士 (薬科学)	氏名	澤幡 雅仁
論文題目	ゼブラフィッシュを用いた低酸素負荷による新規脳虚血モデルの確立ならびに脳・血管系の生理的変化の解析に関する研究		
(論文内容の要旨)			
<p>脳血管疾患は多くの国において主要な死因となっており、その中で我が国においてもっとも頻度の高い疾患は脳梗塞である。脳梗塞では血管の閉塞による虚血に加え、血流の再灌流後に誘発される神経細胞死が病態形成に重要であることが知られている。しかしながら、神経細胞保護に基づく疾患治療薬の開発は十分ではなく、新たな戦略に基づいた治療薬開発のための新規病態モデルが渴望されている。このことから近年、脳実質細胞と血管、それらの周囲の細胞をひとつの機能的な単位として捉える、neurovascular unitという考え方が注目されている。これまでの脳梗塞研究では動物モデルとしてげっ歯類が頻用されてきたが、げっ歯類を用いた研究では脳実質と血管の両者を同時に評価することは難しい。そこで我々は、胚および稚魚が透明で生きた状態での観察が容易であることから、ゼブラフィッシュに着目した。本研究において著者は、低酸素負荷による脳における虚血-再灌流モデルの確立および本モデルの表現型解析に関する研究を行い、以下の新知見を得た。</p>			
第一章 ゼブラフィッシュを用いた低酸素負荷の血管系に対する影響の解析			
<p>これまでのゼブラフィッシュを用いた研究では低酸素負荷により脳細胞障害および運動障害が引き起こされるとの報告があるが、血管や血流に対する影響については知られていない。そこで、低酸素負荷がゼブラフィッシュの血流に対する影響を調べるため、赤血球前駆細胞にmRFP、血管内皮細胞にeGFPを発現させ、血流の可視化を可能にしたトランスジェニックゼブラフィッシュを用いて検討した。低酸素負荷を行うと、脳血流が停止した後、体幹部血流が停止した。定量化のために頭部血管としてmiddle mesencephalic central artery (MMCtA)、体幹部血管としてdorsal aorta (DA)に着目したところ、MMCtAでは低酸素負荷開始約60分後に、DAでは約70分後に血流が停止し、MMCtAはDAよりも有意に早く血流が停止することが明らかになった。これらの結果から、頭部血管MMCtAの血流停止直後に、再酸素化を行うことにより、脳血管の再灌流が生じることが考えられた。実際、低酸素負荷によりMMCtAの血流が停止した直後に再酸素化を行うことによって、一定時間後に脳血管が再灌流した。この時、DAの血流は保たれていた。次に、低酸素負荷により脳虚血が生じる機序について以下の検討を行った。通常二酸化炭素分圧の低酸素環境下では生体内の動脈血二酸化炭素分圧は増加すること、これに伴い血管拡張が生じることが知られている。このことから、低酸素負荷による虚血の惹起に体幹部</p>			

血管の拡張が関与していることが考えられた。そこで、血漿アルブミンに対して高い親和性をもつ化合物ZMB741を用いて、低酸素負荷時の体幹部血管内径の変化を測定した。その結果、体幹部血管posterior (caudal) cardinal vein (PCV) とDAにおいて拡張傾向が観察された。これらの結果から、低酸素負荷により体幹部血管内径の拡張が生じ、相対的に脳への血流が減少することで虚血が惹起されることが示唆された。

第二章 ゼブラフィッシュを用いた低酸素負荷の中樞神経系に対する影響の解析

低酸素負荷によるゼブラフィッシュ脳虚血-再灌流モデルにおける生体内変化を明らかにする目的で、本モデルの表現型解析を行った。脳虚血-再灌流により神経細胞をはじめとする脳実質細胞が傷害を受けること、さらにアストロサイトが活性化することが知られている。そこで、まずアクリジンオレンジ染色により低酸素負荷-再酸素化後の脳実質細胞死を評価した。低酸素-再酸素後24時間において、脳・脊髄において顕著な細胞死が見られた。アクリジンオレンジ染色陽性細胞数を計数したところ、脳・脊髄において低酸素-再酸素処置により有意な細胞死が惹起された。次に、細胞死が誘導された細胞種を明らかにする目的で、神経細胞に蛍光タンパクKaedeを発現させたゼブラフィッシュを用いて検討したところ、低酸素-再酸素処置24時間後においてKaedeの蛍光輝度が有意に低下していた。また、低酸素-再酸素処置後24時間においてアストロサイトのマーカータンパク質であるGFAPの染色輝度が上昇したことから、アストロサイトが活性化していることが示唆された。以上の結果から、低酸素負荷-再酸素化によりゼブラフィッシュの脳において神経細胞障害およびアストロサイトの活性化が惹起されることが示唆された。

以上、著者は低酸素負荷-再酸素化によるゼブラフィッシュ脳虚血-再灌流モデルの作製に成功し、その機序の一端として体幹部血管拡張作用の関与が示された。さらに、本モデルは神経細胞障害、アストロサイトの活性化といった脳梗塞病態の重要な要素を反映するものであることが明らかとなった。本研究成果は、ゼブラフィッシュを用いて、脳・血管系の変化を総合的に評価することが可能な新しい脳梗塞モデルの確立に成功したものであり、脳梗塞病態の解明および治療薬を開発する上で重要な基礎的知見を提供するものである。

(論文審査の結果の要旨)

脳血管疾患は多くの国において主要な死因となっており、その中で我が国においてもっとも頻度の高い疾患は脳梗塞である。脳梗塞では血管の閉塞による虚血に加え、血流の再灌流後に誘発される神経細胞死が病態形成に重要であることが知られている。しかしながら、神経細胞保護に基づく疾患治療薬の開発は十分ではなく、新たな戦略に基づいた治療薬開発のための新規病態モデルが渴望されている。このことから近年、脳実質細胞と血管、それらの周囲の細胞をひとつの機能的な単位として捉える、**neurovascular unit**という考え方が注目されている。これまでの脳梗塞研究では動物モデルとしてげっ歯類が頻用されてきたが、げっ歯類を用いた研究では脳実質と血管の両者を同時に評価することは難しい。そこで著者は、胚および稚魚が透明で生きた状態での観察が容易なゼブラフィッシュに着目し、低酸素負荷による脳における虚血-再灌流モデルの確立、および本モデルの表現型解析に関する研究を行った。その結果、低酸素負荷-再酸素化によるゼブラフィッシュ脳虚血-再灌流モデルの確立に成功し、その機序の一端として体幹部血管拡張作用の関与を示した。さらに、本モデルが神経細胞障害やアストロサイトの活性化などの脳梗塞病態の重要な要素を反映することを明らかにした。

まず、第一章で著者は、低酸素負荷-再酸素化によるゼブラフィッシュ脳虚血-再灌流モデルの確立を目指して、低酸素負荷が血管系に与える影響について検討を行った。低酸素負荷が脳血流を消失させること、さらにその作用は血管径に依存しないことを示した。次に、低酸素負荷による脳血流の消失は体幹部の血流消失によるものなのかについて検討するため、体幹部の主要な血管であるDA (dorsal aorta) に着目して血流変化について検討を行った。その結果、低酸素負荷による血流消失は、体幹部血管DAよりも脳血管MMcTA (middle mesencephalic central artery) において早く生じることを示した。これまでの結果から、低酸素負荷による脳虚血の後に再酸素化を行うことにより、体幹部の血流を維持したまま再灌流が生じると考えられた。そこで著者は、低酸素負荷後、脳血流が消失した直後に再酸素化を行った。その結果、再酸素化後に脳血流が回復し、脳血管が再灌流することを示した。次に低酸素負荷による脳血流の消失メカニズムについて検討を行った。これまでに、低酸素負荷による血流消失は脳血管において体幹部血管よりも早く生じることが明らかになっていることから、これらの血管における低酸素への反応性の違いが血流消失の潜時へ影響していることが推察される。血流量の変化に大きな影響を与える要因として、血管径の変化が挙げられる。そこで次に、脳および体幹部血管の血管径に着目して検討を進めた。低酸素負荷により脳血管、体幹部血管の血管径はどちらにおいても増大が見られた。低酸素負荷により脳および体幹部血管が拡張することが明らかになったが、低酸素負荷による血流消失に対する関与は不明である。そこで著者は、血管拡張薬ニフェジピンが低酸素負荷による血流消失にどのような影響を与えるのかについて検討した。ニフェジピンを処置した後、低酸素負荷を行って、血流消失までの時間を計測したところ、脳血管MMcTA、体幹部血管DAのどちらにおいても血流消失までの時間を短縮する傾向にあった。このことから、低酸素負荷による血流消失の作用機序の一部に血管拡張作用が関与する可能性が示唆された。

続いて、第二章で著者は、低酸素負荷によるゼブラフィッシュ脳虚血-再灌流モデルにおける生体内変化を明らかにする目的で、本モデルの表現型解析を行った。まず低酸素負荷による全身の細胞への影響について検討し、脳から脊髄領域にかけて顕著な細胞死が観察されることを示した。さらにより詳細な観察によって、脳、脊髄領域のどちらにおいても顕著な細胞死が見られることを示した。このことから、低酸素-再酸素化によって生じる脳虚血-再灌流は、中枢神経系において顕著な細胞死を誘導することが示唆された。アクリジンオレンジ染色では、その細胞種を特定することは

困難なので、著者は神経細胞特異的に蛍光タンパク質Kaedeを発現させたトランスジェニックゼブラフィッシュを用いて低酸素-再酸素化処置による神経細胞障害について検討した。その結果、低酸素-再酸素化処置によりKaedeの蛍光輝度が有意に低下することを明らかにした。このことから、低酸素-再酸素化による脳虚血-再灌流により神経細胞障害が惹起されることが示唆された。脳虚血-再灌流によって、神経細胞への障害とともにグリア細胞の一種であるアストロサイトの活性化が報告されている。そこで低酸素-再酸素化がアストロサイトの活性化に与える影響について検討することによって、低酸素-再酸素化処置群において抗GFAP抗体による染色強度の有意な上昇が見られることを示した。アストロサイトは活性化するとGFAP強陽性になることから、低酸素-再酸素化によってアストロサイトが活性化することが示唆された。

本研究成果は、ゼブラフィッシュを用いて、脳・血管系の変化を総合的に評価することが可能な新しい脳梗塞モデルの確立に成功したものであり、脳梗塞病態の解明および治療薬を開発する上で重要な基礎的知見を提供するものである。

よって、本論文は博士（薬科学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成28年2月22日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公表可能日： _____ 年 _____ 月 _____ 日以降