

要約論文
澤幡 雅仁

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

2015

澤幡 雅仁

緒言

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である、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、以下に述べる新知見を得た。

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

脳梗塞の病態解明は、これまでにげっ歯類の脳梗塞モデルを用いた研究成果によって大きく進展してきた。主にげっ歯類の中大脳動脈閉塞モデルを用いて、興奮毒性や酸化ストレスによる神経細胞死や、アストロサイトの活性化、血液脳関門機能の破綻、ミクログリアの活性化や末梢免疫系細胞の浸潤が起きることが報告されている。これらの知見に基づき、多くの創薬ターゲットが創出されてきたが、その大部分が医薬品としては成功していない。例えば、NMDA 受容体アンタゴニスト、カルシウム拮抗薬、抗炎症薬、細胞膜安定化薬などの治療薬の開発が期待されたが、十分な治療効果が得られないことや副作用の問題などによって、それらの多くが臨床で用いられるまでには至っていない。その要因の一つとして、脳梗塞治療薬の開発では脳実質細胞、すなわち神経細胞やグリア細胞を対象とした研究が大部分であり、脳血流の変化と脳実質細胞の機能障害の両者に注目して研究が進められなかった点がある。したがって、脳血流の変化と実質細胞の機能障害を包括的に捉えることが、より進んだ病態解明および治療法の開発に繋がることが考えられる。この考えと一致して、近年になって、脳実質細胞と血管、そして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** という概念に注目が集まっており、これらの単位を適切に評価できる動物モデルの開発が必要である。ゼブラフィッシュはげっ歯類などのこれまでの実験モデルに比べて様々な利点をもっている。著者は特に、脳梗塞研究のモデルとして次の2つの点に着目した。まず、ゼブラフィッシュの胚や稚魚の体が透明なことであり、これによって病態時の生体内の変化についての観察が容易になる。すなわち、ゼブラフィッシュは個体としての形態を維持したまま血流を可視化したり、特定の細胞のイメージングに利用したりできる利点がある。

次に多くの遺伝学的なツールを利用できる点がある。一例としては、特定の細胞種に蛍光タンパク質を発現することで可視化することが容易にでき、交配を行うことによって複数の細胞種を同時に観察することが可能になることがある。また、ゼブラフィッシュは体外発生するので、実験操作の面でも有利である。そこで本章では、血流の変化と脳実質の障害を包括的に評価しうる疾患モデル動物としてゼブラフィッシュを用い、血管系に対する影響を解析することによって、低酸素負荷による脳虚血-再灌流モデルの作出、および脳虚血が起こるメカニズムの解析を行った。

ゼブラフィッシュへの低酸素負荷が与える影響として、これまでに成魚において脳障害や運動障害が生じること、BBB (blood brain barrier) 機能が未発達な時期において、脳や網膜に障害が惹起されることが報告されている。しかし、血管系に対する影響についての報告はない。本研究により、低酸素負荷が脳血流を消失させることが明らかになった。さらに、その作用は血管径に依存しないことが示された。これまでのところ、低酸素条件下における脳血流の変化が、血管径の違いによってどの程度影響を受けるのかについてはわかっておらず、これらを明

らかにするためには更なる検討が必要である。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かを検討するため、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が明らかになった。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のではないかと考えられた。そこで、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、脳における再灌流が生じることが明らかになった。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。これまでの結果で、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ため、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。すなわち、低酸素条件下では、生体の組織がより酸素を取り込もうとして、血管が拡張することが考えられる。また、酸素の拡散効率は血管が拡張した状態において高い。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、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。また興味深いことに、脳血管 MMcTA は低酸素負荷後 40 分で有意な血管拡張作用が観察されたのに対して、体幹部血管 PCV (posterior cardinal vein) では低酸素負荷後 15 分で有意な拡張作用が見られ、その作用は 40 分後においても維持されていた。また、DA 血管においても同様の傾向が観察された。これらの結果は低酸素負荷による血流消失が体幹部血管よりも脳血管で早く生じることの原因の一つである可能性を示唆する。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、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。

本研究の成果により、ゼブラフィッシュ稚魚における低酸素負荷-再酸素化により脳虚血-再灌流が生じることが明らかになり、新規脳虚血-再灌流モデルの確立に成功した。また低酸素負荷による脳虚血の誘導に血管拡張作用が部分的に関与する可能性が示唆された。

第二章 ゼブラフィッシュを用いた低酸素負荷の中枢神経系に対する影響の解析

第一章においてゼブラフィッシュを用いて低酸素負荷を行い、脳血流が消失した後に再酸素化を行うことによって脳虚血-再灌流が誘発されることを明らかにした。これまでにげっ歯類を用いた脳虚血-再灌流モデルにおいて、再灌流障害、神経細胞障害、アストロサイトの活性化、BBB 完全性の破綻、ミクログリアの活性化、末梢免疫系細胞の脳組織への浸潤などが知られている。特に神経細胞障害は脳梗塞病態の主要な現象であり、脳梗塞の様々な症状の発現に関与している。脳組織は神経細胞、アストロサイトやミクログリア、血管などから構成されているが、神経細胞は虚血に対してもっとも脆弱であることが知られている。神経細胞が障害されるメカニズムとして、虚血に伴うグルタミン酸過剰放出による興奮毒性や、再灌流時に発生する活性酸素種などが報告されている。また、アストロサイトは、脳の構成細胞として脳の機能的な構造維持や神経細胞へのエネルギー供給、神経伝達に関与しており、その機能は多岐に渡る。さらに、アストロサイトは脳血管と接していることから、BBB 機能に重要な役割を果たしていることが知られている。このようにアストロサイトは脳の恒常性維持を担っており、虚血状態においてアストロサイトが活性化することにより、脳の恒常性維持に大きな影響を与えるとともに、脳梗塞病態の解明において重要な役割を果たすことが考えられる。このようにげっ歯類で明らかになっている脳虚血-再灌流により中枢神経系において見られる障害に関して、ゼブラフィッシュ稚魚を用いた脳虚血-再灌流モデルにおいても検証を行う必要がある。一方で、ゼブラフィッシュは稚魚の体が透明であるため、生体としての機能や三次元的な形態を損なうことなく、観察を行うことができる。そのため、ゼブラフィッシュ脳虚血モデルの解析により、これまで検討できなかった脳虚血病態における経時的な変化や、生体としての形態がほぼ完全に保存された状態で中枢神経系の変化について検討を行うことができる。そこで本研究では、低酸素-再酸素化による中枢神経系に対する影響の解析として、脳梗塞病態の重要な要素である神経細胞障害とアストロサイトの活性化について解析を行った。

第一章において、ゼブラフィッシュの稚魚を用いて低酸素-再酸素化処置を行い、脳血流と体幹部血流を詳細に解析することで脳虚血-再灌流が惹起されることを明らかにした。しかし、実際の中枢神経系における障害についての解析は行っていなかった。そこで、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たところ、脳から脊髄領域にかけて顕著な細胞死が観察された。より詳細に検討するため、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察すると、脳、脊髄領域のどちらにおいても顕著な細胞死が見られた。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明らかになった。この結果は、これまでのげっ歯類をはじめとする哺乳類での脳虚血-再灌流モデルと一致する。げっ歯類を用いた脳虚血-再灌流モデルにおいては、虚血に伴うグルタミン酸過剰放出による興奮毒性や、再灌流時に発生する活性酸素種などが報告されている。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であるため、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が明らかになった。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したところ、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観察された。アストロサイトは活性化すると GFAP 強陽性を示すことから、低酸素-再酸素化はアストロサイトを活性化することが示唆された。このことから、アストロサイトの活性化という脳梗塞病態の主要な要素が本モデルにおいて反映されていることが明らかになった。

以上の結果は、第一章で確立した新規脳虚血-再灌流モデルにおける中枢神経系に対する影響を解析することにより、低酸素-再酸素化によって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という脳梗塞病態の主要な要素を反映することを示唆する。本モデルを用いることで、同一個体での経時的な解析が可能になり、Tg (HuC:Kaede) を用いた実験のように、げっ歯類では観察が困難な処置前と後での脳実質の変化を検討することができるなど、脳梗塞の詳細な病態解明に有用なモデルであることが示唆された。

総括および結論

著者は本研究において、低酸素負荷によるゼブラフィッシュの脳虚血-再灌流モデルの確立、および本モデルの中樞神経・血管系の生理的変化の解析に関する研究を行い、以下の新知見を得た。

1. 血管径の異なる 5 つの脳血管において、低酸素負荷による血流消失までの時間に有意な差は見られなかった。低酸素負荷による血流消失は、脳血管 MMcTA が体幹部血管 DA に先行して生じた。低酸素-再酸素化により、脳血管で虚血-再灌流が生じた。低酸素負荷により脳血管 MMcTA と体幹部血管 DA、PCV は拡張した。ニフェジピンは血管拡張作用を示し、低酸素負荷による血流消失をより早くする傾向にあった。以上の結果から、低酸素負荷を行うことにより、ゼブラフィッシュを用いた新規脳虚血-再灌流モデルの確立に成功した。また、低酸素負荷による脳虚血の誘導には一部血管拡張作用が関与することが示唆された。
2. 低酸素-再酸素化により、脳および脊髄において、アクリジンオレンジ陽性細胞数が増加した。低酸素-再酸素化は、神経細胞特異的に発現する蛍光タンパク質の輝度を低下させ、GFAP 染色の強度を上昇させた。以上の結果から、低酸素-再酸素化によりゼブラフィッシュの脳において、神経細胞障害やアストロサイトの活性化などの脳梗塞病態の主要な要素が反映されていることが示された。

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-再灌流モデルの確立に成功し、その機序の一部に体幹部血管拡張作用が関与することを示した。さらに、本モデルは、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。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、脳梗塞の病態の解明およびその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。