

令和 2 年 5 月 11 日現在

機関番号：12501

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2017～2019

課題番号：17KK0187

研究課題名（和文）多発性硬化症の新規治療法開発に向けた革新的血液脳関門イメージング法の確立

研究課題名（英文）Development of the innovative imaging of the blood brain barrier

研究代表者

栞田 大生（Masuda, Hiroki）

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10722936

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,000,000円

渡航期間： 11ヶ月

研究成果の概要（和文）：ミトコンドリア機能が低下すると血液脳関門の破綻が生じることが報告されていることから、網膜を通じてミトコンドリア機能を評価することにより間接的に血液脳関門を評価することが可能であると考え研究を行った。一般に、酸素濃度が低いとミトコンドリア機能が低下するが、過去の研究結果と合わせ、マウス的大脑において酸素濃度が低下するとリアルタイムにミトコンドリア機能が低下することを示すことが出来た。次に、血液脳関門を破綻させたモデルラットを用いて運動機能と血液脳関門破綻、酸素濃度との関連を調べた。酸素濃度が高い状態で飼育したラットは運動機能の改善を認めたが、血液脳関門の破綻は酸素濃度による差を認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多発性硬化症などの神経免疫疾患ではその発症において血液脳関門の破綻が重要な役割を果たしている。ヒトにおいて血液脳関門破綻を評価するためには造影剤を用いた頭部MRIか血液・髄液中のアルブミン比（Qa1b）を用いることが多い。しかし、それぞれ侵襲度が高いことと頻回に評価できないことから、新規評価法の構築が望まれる。今回の方法では残念ながら新規イメージングの構築には至らなかったが、今後も新規評価法や治療法確立を目指した研究を継続したい。

研究成果の概要（英文）：Mitochondrial dysfunction was reported to cause the disruption of the blood brain barrier. The aim of this study was to assess the blood brain barrier function through the retina by mitochondrial function. Hypoxia causes the mitochondrial dysfunction. Decreased mitochondrial function due to hypoxia was shown on the mouse brain in real time. We examined the association among the motor function, the blood brain barrier and oxygen concentration by a rat model with surgically-induced blood brain barrier disruption. The results showed the high concentration of the oxygen improved the rat motor function, but no difference was found between the blood brain barrier disruption and the oxygen concentration.

研究分野：神経科学、脳神経内科学

キーワード：血液脳関門 ミトコンドリア 多発性硬化症 実験的アレルギー性脳脊髄炎

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症などの神経免疫疾患ではその発症において血液脳関門の破綻が重要な役割を果たしている。ヒトにおいて血液脳関門破綻を評価するためには造影剤を用いた頭部 MRI か血液・髄液中のアルブミン比 (Qalb) を用いることが多い。しかし、それぞれ侵襲度が高いことと頻回に評価できないことから、新規評価法の構築が望まれる。

発生学的に、視神経は中枢神経系に属し、血液脳関門は網膜にも存在している。さらに、網膜は視神経と接していること、ミトコンドリア機能が低下すると血液脳関門の破綻が生じることが報告されていることから、網膜を通じてミトコンドリア機能の評価することにより間接的に血液脳関門を評価することが可能であると考えた。

### 2. 研究の目的

マウスを用いて、大脳や脊髄よりもアクセスが容易である網膜において、ミトコンドリアの機能異常を検出することを通じてリアルタイムに血液脳関門を評価する方法を確立することを目的とした。

### 3. 研究の方法

酸素濃度の低下 ミトコンドリア機能の低下 血液脳関門破綻、について検討を行う。

#### (1) ミトコンドリア機能と酸素濃度の関係をリアルタイムに評価する。

フラボプロテイン蛍光イメージングを用いてミトコンドリア機能の評価する (J Cereb Blood Flow Metab. 2016;36:1955-1964.)。イソフルレンとメドミジンを用いてマウスの麻酔を行う。大脳及び小脳の観察については、頭部を固定して大脳皮質を露出し、カバースリップを載せ、共焦点顕微鏡を用いて行う。網膜の観察については、眼球に接するように小さなカバースリップを載せ、共焦点顕微鏡を用いる。酸素が保たれている状態では、フラボプロテインからの信号は緑色として検出可能であるが、酸素濃度が低下するにつれて動脈周囲に halo を形成し、他の部分の信号は消失していく。したがって、動脈周囲の halo が出現するまで徐々に酸素濃度を下げながら観察し、halo が出現する酸素濃度を確認する。

#### (2) 血液脳関門の破綻と酸素濃度の関係を評価する。

Vascular endothelial growth factor (VEGF) は血管透過性を亢進させることが知られている。一方、多くの場合、血液脳関門の破綻は血管透過性の亢進を意味している。多発性硬化症の研究では多くの場合、そのモデル動物である EAE が用いられるが、EAE は脱髄をきたすため、脱髄をきたさずに血液脳関門破綻をきたし、神経障害を呈するモデルを用いることが望ましいと考えた。そこで、オスの SD ラットの脊髄前角に VEGF を注射することで、血液脳関門破綻モデルラットを作成し、術後酸素濃度 80% と 21% の環境下で飼育し、12 時間おきに神経障害の評価を行った。また、術後 24、48、72 時間後に灌流固定を行い、血液脳関門破綻の程度を組織学的に評価した。コントロール群には PBS を注射したラットを用い、神経障害はラダーテストによって評価した (図 1)。

図 1 : ラダーテスト



3 往復したビデオをコマ送りして一歩ずつスコアリング、  
平均値を算出

#### 4. 研究成果

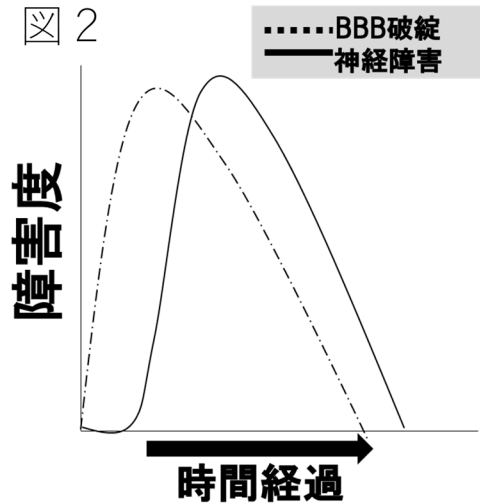
(1) 大脳においては健常マウスでは吸入気の酸素濃度 (FiO<sub>2</sub>) 9%、リポ多糖を静脈注射したラットでは FiO<sub>2</sub> 10%、リポ多糖を眼内注射したラットでは FiO<sub>2</sub> 8% でフラボプロテインの信号が低下するという所見を得た。

すなわち、酸素濃度を低下させていくと FiO<sub>2</sub> が 8-10% 程度のところで大脳のミトコンドリア機能の低下を検出することが可能であった。

(2) VEGF 群では PBS 群に比し、有意な神経障害を認め (repeated ANOVA、P = 0.024)、かつ VEGF 群では術後 36 時間後に神経障害のピークを認めた。一方、組織学的な評価において、VEGF 投与群では術後 24 時間後に IgG の血管外への漏出はピークを迎え、以降は IgG の血管外漏出は減少していくことが確認された。PBS 群では明らかな IgG の血管外への漏出は認めなかった。すなわち、VEGF 投与群では術後 24 時間後に血液脳関門の破綻がピークに達し、その後神経障害がピークを迎えることが示された。

一方、高濃度酸素下で飼育したラットは通常の酸素濃度下で飼育したラットに比べて術後 48 時間後の神経障害が軽症であったものの、血液脳関門の破綻は高濃度酸素群と通常の酸素濃度群で差を認めなかった。すなわち、酸素濃度と血液脳関門破綻との間に明らかな相関を認めなかった。

以上より、ミトコンドリア機能を利用して血液脳関門の機能を評価することは困難であると考えた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>G. Delattre, H. Masuda, K.J. Smith   |
| 2. 発表標題<br>Severe, transient neurological deficits associated with breakdown of the blood-brain barrier |
| 3. 学会等名<br>ECTRIMS 2019 (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2019年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|   | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)      | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)  | 備考 |
|---|--------------------------------|--|----|
| 主たる<br>研究<br>先の<br>主たる<br>海外<br>共同<br>研究者 | スミス ケネス<br><br>(Smith Kenneth) | ロンドン大学・Institute of Neurology, department of neuroinflammation・Professor |    |