

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16504

研究課題名（和文）硬膜リンパ管の結紮が記憶を障害するメカニズムの解明

研究課題名（英文）Mechanism of cognitive impairment after ligation of meningeal lymphatic vessels

研究代表者

石川 智愛（Ishikawa, Tomoe）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：20804587

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、MAZ51の投与によりリンパ管新生を阻害したマウスにおいてワーキングメモリが傷害されることを発見した。またリンパ管の結紮は左右前頭皮質の γ 波の同期レベルを低下させ、マイクログリアの体積を膨張させていた。ワーキングメモリの成立に γ 波は重要な役割を担うことがすでに示されており、リンパ機能の低下が引き起こす γ 波の変化がワーキングメモリの低下に繋がったのではないかと推察している。今後より詳細に検証することで、なぜ免疫機能の低下が記憶障害を引き起こすのかを明らかにすることを旨とする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、脳リンパ管と記憶の関係性に対しシナプス-細胞-脳波という異なる階層の相互作用からアプローチするものである。現時点では例数が十分ではないものの、リンパ管の結紮やリンパ管新生の阻害が記憶の回路基盤に及ぼす影響を各階層において発見しており、今後それらをつなぐことで、脳-免疫連関の実体や記憶のメカニズムの解明に繋がることを期待される。本研究を発展させることにより、脳免疫連関が記憶に及ぼす影響を明らかにできれば、記憶研究に対し新たな視点を提供することができる。記憶メカニズムの解明だけでなく、記憶障害の治療を目指す上でも重要な知見になると期待される。

研究成果の概要（英文）：In this research, we found that inhibiting of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-3 by 6-week MAZ51 injection impaired working memory. We also found that the ligation of lymphatic vessels toward and away from the cervical lymph nodes reduced the interhemispheric coherence of prefrontal gamma oscillation and increased the volume of prefrontal microglia. These results suggest that interhemispheric coherence reduction of prefrontal gamma oscillation caused by aberrant lymphatic drainage impairs working memory. We will test this hypothesis as a next step.

研究分野：神経薬理学

キーワード：リンパ管 記憶

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1622年 Gaspar Aselli によるリンパ管発見以来、脳はリンパ管を持たない唯一の器官として知られてきた。しかし、2015年に、硬膜にもリンパ管が存在することが示され(Louveau Nature 2015)、脳リンパ機能の理解は新たな局面を迎えている。硬膜リンパ管は髄液と免疫細胞の両方を輸送し、最終的には深部の頸部リンパ節に流入する(Louveau Nat Neurosci 2018)。この硬膜リンパ管を損傷させると海馬依存的な記憶学習成績が低下し、アミロイドの蓄積が生じることが示唆されている(Mesquita Nature 2018)。しかし、なぜ、リンパ管の損傷が記憶学習課題成績の低下を引き起こすのかまで踏み込む知見は存在しない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、単一シナプスから神経回路レベルの活動に着目し、脳リンパ管と記憶の関係性を明らかにすることである。脳リンパ流の障害が記憶の分子基盤である LTP、LTD、回路基盤である記憶再生と脳波に与える影響を調べることで、脳リンパ機能と記憶の相互作用という新たな概念の構築に挑む。硬膜リンパ機能と記憶の関係性を示唆する研究は様々な視点から急速に進んでいるが、分子基盤と回路基盤をつなぐ研究はほとんど存在しない。大規模イメージングを駆使して、スケールの異なる記憶基盤の相互作用に迫ってきた経験を活かし、硬膜リンパ管と記憶の関係性にアプローチする。これにより、硬膜リンパ管の損傷が記憶を障害するメカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

硬膜リンパ管の流入先である頸部の深部リンパ管を結紮し、リンパの流れを阻害する。三種混合麻酔薬を投与した C57BL/6J マウスもしくは Vegfr3-dVenus マウスの後頸部を切開し、大槽に Alexa594 を投与することでリンパ管を蛍光標識する。Alexa594 の投与 15 分後に後頸部を縫合し、頸部に存在する深部リンパ管を結紮する。深部リンパ節に繋がるリンパ管(流入・流出)を全て手術糸で結紮し、頸部を縫合する。リンパ流阻害 1 週間、1 か月、2 か月後マウスを用いて、脳波の記録、神経細胞・グリア細胞の免疫染色、行動試験を行い、リンパ流の阻害がどのような影響を及ぼすのか検証した。

脳波を記録するため、リンパ管結紮の 1 週間前に前頭皮質・運動皮質・聴覚皮質・視覚皮質の脳表にネジ電極を設置し、歯科用セメントで固定した。1 週間の回復期間の後、リンパ管結紮前と結紮 2 日後から 7 日後までの脳波を毎日、またリンパ管結紮 1 週間後から 1 週間おきに 8 週間後までホームケージにおける自発行動中の脳波を計測した。

実験後マウスは灌流固定を行い、アストロサイト(GFAP、S100 β)・マイクログリア(Iba1)・ニューロン(MAP2)などの免疫染色を行った。

また、Perivascular space の可視化を行うため、CAG-GFP マウスの側頭頭頂葉に open skull 法を用いて観察窓を作成し、二光子顕微鏡で観察した。CAG-GFP マウスではほぼ全ての細胞が GFP を発現していることから空間が黒抜きで観察される。覚醒下マウスでの観察を行う前に、イソフルラン麻酔下のマウスにおいて、脳浮腫前後に Perivascular space の変化が認められるか検証した。

4. 研究成果

はじめに脳リンパ流を阻害するため、頸部リンパ管の結紮を行った。大槽に Alexa594 を投与するとリンパ管が蛍光標識され、リンパ管の結紮は容易になる。その一方で、大槽投与のための後頸部の切開とリンパ管結紮のための前頸部の切開が必要となり、マウスへの負担が大きいたことが問題であった。そこで、Vegfr3-dVenus の蛍光のみでリンパ管の結紮が可能であるか検証したが、リンパ管は非常に細いことから全てのリンパ管を確実に結紮できるほど明瞭な蛍光とはいえなかった。また、リンパ管の結紮自体も難しく繊細な技術を要しており、最終的な成功率は 15% と非常に低いまま改善されなかった。そこで、代替案として、リンパ管新生を阻害する MAZ51 の長期投与も試みた。MAZ51 は VEGFR3 キナーゼ阻害薬であり、5 日/週間の投与を 6 週間続けることで脳浮腫後の病態や記憶に影響をおよぼすことが知られている。MAZ51 は Dimethyl Sulfoxide (DMSO) に溶解し、腹腔内投与が可能であることから、一部の実験では MAZ51 を投与したマウスを用いて実験を行った。リンパ管結紮の場合はコントロール群として Sham 群を、MAZ51 投与の場合はコントロール群として DMSO のみを投与した群を設け、比較した。

(1) リンパ管の結紮は前頭皮質のマイクログリアの体積を膨張させる

リンパ管の結紮 4 週間後のマウスに対し灌流固定を行い、脳を摘出した。その後 100 μ m 厚の coronal 切片を作成し、免疫染色を行った。GFAP、S100 β 、Iba1、MAP2、VGLUT1、Homer1、VGAT、Gephyrin などの抗体を用いて染色し、各抗体陽性の体積をコントロール群と比較した。VGLUT1 と Homer1、VGAT と Gephyrin は興奮性シナプスのプレとポスト、抑制性シナプスのプレとポストに発現するタンパク質であり、2 つのタンパク質が重なる部分をシナプスとした。その結果、リンパ管結紮群では前頭皮質において Iba1 陽性の体積が増加することを発見した。また、リンパ管の結紮は背側海馬の GFAP 陽性の体積を増加させ、腹側海馬の GFAP 陽性の体積を減少させる傾向にあることも見出した。Iba1 はマイクログリア、GFAP はアストロサイト

細胞骨格に存在するタンパク質であることから、リンパ管の結紮が前頭皮質のマイクログリアの体積を膨張させること、また背側海馬のアストロサイト細胞骨格を膨張させ、腹側海馬のアストロサイト細胞骨格を減少させることが示唆される。現在は、興奮性および抑制性のシナプスの解析を行っている。また、体積やシナプス数の変化だけでなく、細胞の形態変化などに関しても今後の解析対象とする。

(2) リンパ管の結紮は左右前頭皮質のガンマ波の同期性を低下させる

リンパ管結紮 2 日後-7 日後までは毎日、リンパ管結紮 1 週間後 (7 日後) から 8 週間までは 1 週間ごとに、ホームケージ内で観察される自発的な脳波を観察した。脳波の記録中、マウスはホームケージ内を自由に行動させた。得られた脳波に関して、 δ (1-3 Hz) 帯域、 θ (4-7 Hz) 帯域、 α (8-13 Hz) 帯域、 β (14-29 Hz) 帯域、*slow* γ (30-60 Hz) 帯域、*fast* γ (61-100 Hz) 帯域に分けて解析を行った。その結果、*low* 帯域の左右半球のコヒーレンスが前頭皮質において低下していることを発見した ($n = 3$ animals each)。それに対し、他の脳領域や他の周波数においてこのような変化は認められていない。前頭皮質の θ 波はワーキングメモリの成立に重要な役割を果たすと考えられていることから、今回観察された θ 波の低下が次項の行動試験結果と深く結びついている可能性は高い。今後例数を増やし、さらに詳細な解析を行う予定である。

(3) MAZ51 の投与が記憶に及ぼす影響

MAZ51 を 6 週間投与した群に対し、オペラント条件付け学習とワーキングメモリの試験を行った。3 枚のタッチパネルを装備したホームケージ内で行う実験系を使用する。飲水制限を行ったマウスを実験用のホームケージに入れ、オペラント条件付け (4 日間) ワーキングメモリ (3 日間) の順で検証する。この実験は夜間に行うため、通常ケージは暗室となっている。オペラント条件付けでは、光ったパネルを正しくタッチすれば報酬として水が得られ、誤ったパネルをタッチすると罰としてケージ全体がライトで照らされる。ワーキングメモリでは、新たなトライアルが始まると左右の二枚のパネルが光り、マウスは前回のトライアルでタッチしていない方のパネルをタッチすることで報酬が得られる。誤ったパネルをタッチした場合はオペラント条件付けと同様である。これまでの結果から、オペラント条件付け学習では、コントロール群および MAZ51 投与群ともに実験開始 4 日後には 70% 以上の正答率に達した。最終的な正答率およびそこに至るまでの成績の上昇率に関して、今のところ両群で顕著な差は認められていない。その一方で、ワーキングメモリに関しては、コントロール群では日を経るにつれ成績が向上し、3 日後には平均 90% 程度の正答率であったのに対し、リンパ管新生を抑制した MAZ51 投与群では 65% 程度で留まることが明らかになった。現時点では例数が十分ではなく、今後の検証が必要となるがリンパ管新生の阻害によりワーキングメモリが阻害される可能性があると考えている。

本研究は、脳リンパ管と記憶の関係性に対しシナプス-細胞-脳波という異なる階層の相互作用からアプローチするものである。現時点では例数が十分ではないものの、リンパ管の結紮やリンパ管新生の阻害が記憶の回路基盤に及ぼす影響を各階層において発見しており、今後それらをつなぐことで、脳-免疫連関の実体や記憶のメカニズムの解明に繋がることを期待される。

また、上記の研究を発展させるにあたり、血管周辺に存在する空間、Perivascular space の *in vivo* イメージングが必要になると考えている。そこで、CAG-GFP マウスに観察窓を作成し二光子顕微鏡で観察したところ、Perivascular space をはじめとした脳内の「空間」を抽出できることが明らかになった。その一方で、Perivascular space は場所によっては $1 \mu\text{m}$ と非常に薄く、二光子顕微鏡の空間分解能において Perivascular space の形態変化が捉えられるのか調べる必要があった。リンパ管新生の阻害による Perivascular space の影響を捉える前に、より顕著な病態を引き起こすと予測される水中毒を誘導したところ、脳表および貫入血管の周辺に存在する Perivascular space が収縮することを発見した。この結果は、CAG-GFP マウスを用いた *in vivo* イメージングが、今後リンパ管-血管周辺スペースの相互作用を明らかにする上で有用なツールになるだけでなく、脳浮腫の進行時に Perivascular space が関与することを示唆する重要な知見である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ishikawa Tomoe, Ikegaya Yuji	4. 巻 6
2. 論文標題 Locally sequential synaptic reactivation during hippocampal ripples	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.aay1492	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Ishikawa, T., Unekawa, M., Tomita, Y., Nakahara, J., Yasui, M.
2. 発表標題 In vivo systemic reactions, including the morphological change of paravascular space, during water
3. 学会等名 BRAIN & BRAIN PET2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ishikawa, T., Unekawa, M., Tomita, Y., Nakahara, J., Yasui, M.
2. 発表標題 Biphasic morphological and physiological responses, including the change of paravascular space
3. 学会等名 XIV European Meeting on Glial Cells in Health and Disease, GLIA 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ishikawa, T., Unekawa, M., Tomita, Y., Nakahara, J., Yasui, M.
2. 発表標題 Aquaporin 4 knockout in mice attenuates paravascular space closure and neuronal activity
3. 学会等名 Society for Neuroscience 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------