

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07306

研究課題名（和文）脳梗塞の病態進行における卵巣ホルモン - 細胞免疫相互作用の役割

研究課題名（英文）Role of ovarian hormone-T cell immune interaction in the pathological progression of brain ischemic stroke

研究代表者

長谷川 潤 (Hasegawa, Hiroshi)

神戸薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：10332230

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、脳梗塞の病態進行における卵巣ホルモンの影響を検証することを目的とした。マウス光血栓性脳梗塞モデルを用いて、脳梗塞作製後にエストラジオール、プロゲステロン又はその両者を投与し、病態を検討した。雌マウスを用いた解析の結果、エストラジオール及びプロゲステロンは、ミクログリアの動態には影響しなかったが、アストロサイトの反応性を調節することが分かった。これらのアストロサイトの反応性変化は卵巣の有無による影響を受けなかった。雄マウスでも同様の結果を得られたが、炎症性サイトカインの発現に関しては、一部に雌雄差が見られた。今回の実験条件においては、脳梗塞部位へのT細胞の集積は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、脳梗塞、特に病変が小さいラクナ梗塞において、卵巣ホルモンが病態を制御することが初めて明らかとなった。また、エストラジオールとプロゲステロンが異なる影響を示すことが分かった。ラクナ梗塞は自覚症状の乏しい脳血管疾患であり、認知症の原因である可能性が示唆されている。したがって本研究成果は、卵巣ホルモンの制御が認知症を始めとする脳疾患の治療や予防に応用できる可能性を示唆したものである。また、この卵巣ホルモンの影響には雌雄差は見られなかったことから、エストロゲン作用をもつ環境化学物質が、男女を問わず脳疾患の病態に影響している可能性を提起するものである。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to investigate the influence of ovarian hormones on the progression of ischemic stroke. Using a photothrombotic stroke model in mice, estradiol, progesterone, or both were administered after inducing the stroke, and the disease pathology was examined by histological analyses. The analysis using female mice revealed that estradiol and progesterone did not affect microglial dynamics but regulated astrocyte reactivity. These changes in astrocyte reactivity were not influenced by the presence or absence of ovaries. Similar results were obtained in male mice, although there were some sex differences observed in the expression of inflammatory cytokines. In the current experimental condition, there was no accumulation of T cells in the stroke lesion.

研究分野：神経科学、衛生薬学、毒性学

キーワード：卵巣ホルモン 脳梗塞 エストラジオール プロゲステロン アストロサイト

1. 研究開始当初の背景

脳血管疾患は日本人の死因第4位を占める。また、寝たきりになる疾患としては最も発生頻度が高く、健康寿命を考えるうえで、また増え続ける医療費問題においても近年の日本における大きな社会問題となってきた。脳血管疾患のうち、50%以上が脳梗塞であり、脳梗塞の病態メカニズムの解明及び予後の改善は医学上重要な課題である。

研究開始当初までの脳梗塞研究においては、動物モデルとして中大脳動脈結紮(MCAO)モデルが多用されていた。このモデルはヒトにおける病変部位が大きい脳梗塞(発作を伴うアテローム性脳梗塞や新原生脳塞栓症)のモデルとして考えられる。一方、認知症の原因などとして注目を集めるラクナ梗塞のモデルは確立されていなかった。そのため、ラクナ梗塞の発症機構や病態進行機構については研究が進んでいなかった。

女性における脳梗塞の発症リスクは、生殖年齢期に低く、閉経後に高くなることが知られている。これは女性ホルモンであるエストロゲンやプロゲステロン(卵巣ホルモンと総称)の血中濃度の変化によるものと考えられている。しかし、脳梗塞発症後の病態進行に女性ホルモンがどのように影響するのかはほとんど分かっていなかった。

2. 研究の目的

我々は、我々自身がこれまで用いてきたマウス光血栓性脳梗塞モデルを改良することで、微小サイズの脳梗塞を作製することに成功してきた。これはラクナ梗塞のモデルとなりうると考えられた。そこで、このモデルを用いて、(1)卵巣ホルモンが脳梗塞の病態をどのように変化させるか、(2)この卵巣ホルモンの作用はT細胞の分化や活性化を制御することによるものかどうかを検討することを目的とした。

3. 研究の方法

野生型ICRマウスの雄及び雌マウスを用いた。雌マウスについては、卵巣摘出(OVX)又はsham手術を行い、4週間以上の回復期間の後に実験を行った。光血栓性脳梗塞を作製し、その後の7日間、食用油に溶かしたエストラジオール、プロゲステロン、両者の混合物又は溶媒である食用油を皮下投与した。解析のために脳及び胸腺を採取し、凍結切片を作製、免疫染色法にて解析を行った。また遺伝子発現解析のために、別途同様の処置を行ったマウスを準備し、脳梗塞部位(又はコントロールとして正常な大脳皮質)を摘出した。摘出組織からtotal RNAを抽出し、逆転写の後、定量的RT-PCR法にてそれぞれのmRNAの発現量を測定した。

4. 研究成果

(1) 脳梗塞部位のグリア細胞に対する卵巣ホルモンの影響

エストラジオール投与、プロゲステロン投与、溶媒投与のマウスの脳梗塞部位切片を、活性型ミクログリアマーカーであるIBA1/AIF1に対する抗体で免疫染色したところ、いずれの個体においても、脳梗塞部位におけるミクログリアの活性化に特に顕著な差異は認められなかった。一方、アストロサイトのマーカーであるGFAPに対する抗体で免疫染色を行ったところ、エストラジオール投与群のアストロサイトは溶媒投与群のアストロサイトより、コア領域とペナンブラ領域の境界により多く集積していた。また、ペナンブラ領域外側の健常領域のアストロサイトのGFAP陽性シグナルは、エストラジオール投与群で減弱していた。一方、溶媒投与群及びエストラジオール投与群ではGFAP陽性シグナルはコア領域にほとんど見られなかったのに対し、プロゲステロン投与群ではコア領域に一部のアストロサイトが侵入している様子が観察された。またペナンブラ領域のシグナルも、プロゲステロン投与群では、溶媒投与群、エストラジオール投与群に比べて分布がまばらであった。エストラジオール投与群及び溶媒投与群では、GFAP陽性アストロサイトは十分に突起を伸ばしているのに対して、プロゲステロン投与群のアストロサイトは突起を十分に伸ばさず、部分的に脱分化しているような形態が観察された。エストラジオールとプロゲステロンを同時投与した群では、プロゲステロン単独投与と同様の結果が得られた。脳梗塞部位のサイズを検討したところ、エストラジオール投与群、プロゲステロン投与群では、溶媒投与群に比べて脳梗塞サイズが大きい傾向が見られた。これらのことから、エストロゲンとプロゲステロンはアストロサイトの活性化を制御するとともに、コア領域-ペナンブラ領域の境界形成を変化させることで脳梗塞の病態を悪化させる可能性が考えられた。

(2) 脳梗塞の病態進行における卵巣ホルモンの影響の雌雄差

卵巣ホルモンが脳梗塞の病態進行に影響を与えることが分かったので、雌雄の差について検討した。雄マウスに同様の処置を行った場合も、エストラジオールのミクログリア及びアストロサイトに対する影響は(1)で述べた雌マウスと同様であった。さらに詳細に違いを明らかにするため、遺伝子発現解析を行った。雌マウスサンプルを用いて、定量的RT-PCR法によりミクログリアマーカーである*Iba1*及び*F4/80*のmRNAを検討した。その結果、脳梗塞部位では健常部位に比べてこれらのmRNAの発現量は高かったが、エストラジオールはこの脳梗塞による発現上昇を変化させなかった。同様に、アストロサイトマーカーである*Gfap*、*Aqp4*、*Fabp7*の発現量も脳

梗塞部位で上昇していたが、エストラジオールはこれらに影響しなかった。脳梗塞部位で発現が上昇する代表的な炎症性サイトカインのうち *Ccl3*, *Ccl4*, *Tgfb1* の発現量を検討したところ、*Tgfb1* のみエストラジオール投与群で発現上昇が低下していた。TGF- β 1 はアストロサイトで産生され、オートクライン的にアストロサイトの反応性を制御することが知られていることから、エストラジオールは TGF- β 1 の産生を介してアストロサイトの反応性を制御している可能性が考えられた。

(3) T細胞の関与について

脳梗塞の病態進行とエストラジオールによる影響への細胞性免疫の関与を検討するために、雄の ICR マウスに光血栓性脳梗塞を作製し、解剖時に胸腺の大きさを観察した。その結果、脳梗塞を作製したマウスでは、sham 手術を行ったマウスに比べて胸腺が退縮していることが分かった。脳梗塞部位の切片を、T細胞全てのマーカーである CD3 に対する抗体、またヘルパーT細胞、細胞障害性T細胞のマーカーである CD4、CD8 に対する抗体で免疫染色を行ったが、これらに反応する細胞はほとんど見られなかった。MCAO モデルを用いた過去の文献では、T細胞の集積が報告されていたことから、T細胞の集積には虚血からの再灌流と活性酸素の刺激が必要である可能性が考えられた。これらの結果から、光血栓性脳梗塞モデルにおける卵巣ホルモンの効果は、胸腺機能の変化やT細胞の動態調節を介さず起きると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 近藤真理、岡崎晴夏、中山啓、北條寛典、瀬木（西田）恵里、長谷川潤
2. 発表標題 光血栓性脳梗塞モデルマウスにおけるミクログリアとアストロサイトの動態
3. 学会等名 フォーラム2021衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長谷川潤、近藤真理
2. 発表標題 脳梗塞の病態進行における細胞種間相互作用
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長谷川潤、近藤真理、岡崎晴夏、中山啓、北條寛典、瀬木 - 西田恵里
2. 発表標題 脳梗塞発症後のアストロサイト活性制御に対するミクログリアの役割
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 近藤真理、岡崎晴夏、中山啓、瀬木 - 西田恵里、長谷川潤
2. 発表標題 Effect of minocycline on pathological progression in the infarct brain of the photothrombosis mouse model
3. 学会等名 第49回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 寺本昂司、押部佑香、近藤真理、中山啓、瀬木 - 西田恵里、長谷川潤
2. 発表標題 脳梗塞の病態進行に対する発症前ストレスの影響
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023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