

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591589

研究課題名（和文） 脳梗塞後遺症・神経変性疾患における骨髄ストローマ細胞を用いた脳保護作用の検討

研究課題名（英文）

Preventive effect of marrow stromal cells on stroke and neurodegenerative disease

研究代表者

茂木 正樹 (Mogi Masaki)

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：20363236

研究成果の概要（和文）：血圧調節のホルモンであるレニン・アンジオテンシン系が脳卒中や認知症に与える影響を検討した。骨髄細胞を他のマウスで置き換えたマウスの検討により、骨髄由来の細胞中のレニン・アンジオテンシン系が脳梗塞の大きさに影響を与えることが見出された。また、KKAy という糖尿病マウスでは脳の微小血管の障害が認められ、レニン・アンジオテンシン系の作用を制御することで微小血管障害が減弱し、糖尿病による認知症を抑制することが見出された。

研究成果の概要（英文）：We investigated the effect of renin-angiotensin system (RAS) on stroke and dementia. RAS in marrow-derived cells regulated stroke size using chimeric mice which were replaced bone marrows by other kinds of mice. Moreover, regulation of RAS prevented diabetes-induced dementia via inhibition of blood-brain barrier using diabetic mice, KKAy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：アンジオテンシン II、脳梗塞、認知症、骨髄細胞、糖尿病、血液脳関門

1. 研究開始当初の背景

(1) 脳卒中による後遺症や認知症など神経変性疾患に伴う神経障害に苦しむ患者数は大変多いにも関わらず、傷害を受けた神経を修復する治療には限界があり、新たな治療アプローチが希求されている。

(2) 我々のこれまでの研究より、血圧調節に関係するレニン・アンジオテンシン系 (RAS) が脳神経系組織でも発現しており、

神経障害にも関与することがわかってきたことから、その制御による脳保護作用が期待されている。

(3) さらに、骨髄細胞を用いた細胞治療は、脳梗塞後の神経障害を抑制する効果があり、我々の以前の研究からも、RASの制御により、より効果的な細胞治療に繋がる可能性がある。

2. 研究の目的

- (1) 臨床的にも神経疾患に関与する可能性が報告されている、RAS に着目して、脳卒中による後遺症や認知症などの脳神経疾患に対する新しい治療法の探索と検討を行った。
- (2) 神経修復を誘導し、新しい治療に結び付くのではと期待されている骨髄細胞に関連する組織における、RAS の制御による脳神経保護作用の検討を行った。

3. 研究の方法

- (1) 脳卒中後遺症モデルとしてマウスに中大脳動脈閉塞術を施行し、脳梗塞慢性期モデルマウスの作成を試みた。
- (2) アンジオテンシン II2 型受容体欠損マウスの骨髄で置換したキメラマウスを作成し、血液細胞における RAS が脳梗塞に及ぼす影響について検討した。
- (3) 糖尿病による認知機能障害に着目し、糖尿病マウスを用いて、骨髄細胞が保護作用を示すと考えられる血液脳関門 (BBB) の破綻の有無と RAS の影響について検討した。

4. 研究成果

- (1) 脳卒中後遺症モデルの作成は、マウスに中大脳動脈閉塞術を施行し、生存マウスの神経障害の度合いと頭部 MRI で脳梗塞巣の大きさを経時的に追ったところ、脳梗塞作成後約 1 週間で脳梗塞巣は殆ど消失してしまい、軽度の神経障害を残すのみに回復してしまったため、慢性期脳梗塞モデルを作成して脳保護効果を検討するのは困難であった。

- (2) そこで、骨髄細胞を入れ替えたマウスを作成して骨髄細胞由来の細胞が脳梗塞にどのような影響を与えるかについて検討をすることとした。

(a) これまでに脳保護効果があると報告されているアンジオテンシン II2 型受容体 (AT2R) を欠損させたマウスから骨髄細胞を抽出し、放射線を照射して骨髄細胞を破壊した野生型マウスに投与して骨髄細胞由来細胞のみ AT2R が欠損したマウス (キメラマウス) を作成した。このマウスを用いて中大脳動脈閉塞術を施行したところ、野生型マウスの骨髄細胞を投与したキメラマウスと比べて脳梗塞巣が拡大した (図 1)。

(b) AT2R 欠損キメラマウスは、野生型キメラマウスと比較して、3D レーザ血液計を用いて検討した脳表の血流が低下しており (図 2)、脳梗塞後の脳内の炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子 (TNF- α) や単球走化性タンパク質 (MCP-1) の発現が増加傾向を示した。

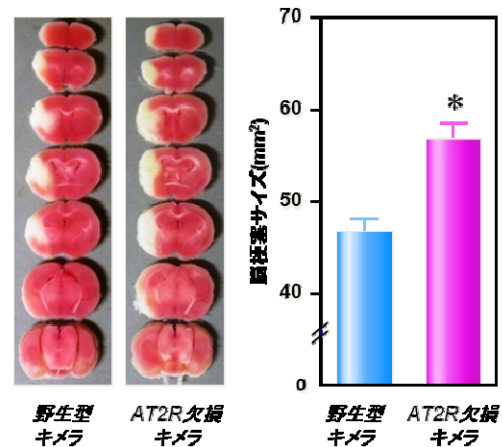


図1. アンジオテンシンII2型受容体欠損キメラマウスでは脳梗塞の大きさが拡大する
(左): 代表的な脳梗塞の大きさの写真 (白い部分が脳梗塞)
(右): 脳梗塞の大きさの比較. * p<0.05 vs. 野生型キメラ
AT2R: アンジオテンシンII2型受容体

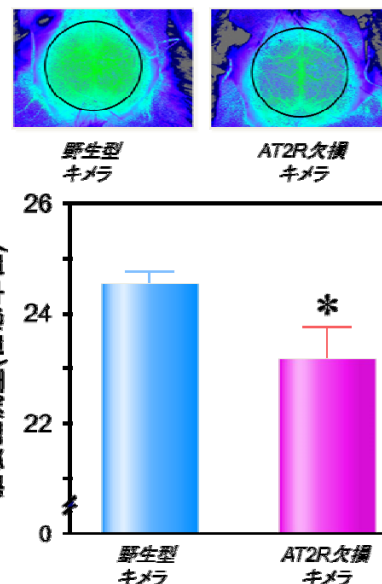


図2. アンジオテンシンII2型受容体欠損キメラマウスでは脳表血流が低下する
(上): 代表的な脳表血流の写真 (青より黄緑の方が血流が多い)
(下): 脳表血流の比較. * p<0.05 vs. 野生型キメラ
AT2R: アンジオテンシンII2型受容体

(c) こうした結果から、骨髄由来の細胞中のレニン・アンジオテンシン系が脳梗塞の大きさに影響を与えることが見出された。以上の成果を英文医学誌: Hypertension (査読有) [雑誌論文#2] に報告した。

(3) 次に神経変性疾患に関する研究は主に認知症に焦点を置いて検討した。最近、糖尿病患者で将来的に認知機能が低下することが危惧されている。血糖値やインスリンの影響が考えられているが、糖尿病による認知症の原因はよくわかっていない。骨髄細胞による細胞治療により、脳の微小血管である血液脳関門 (BBB) の障害が軽減することが報告されており、血管と神経、そしてアストロサ

イトの3者が相互に関連して脳神経を維持しているという“neurovascular unit”という概念においてBBBが果たす役割は大変重要で、BBBの障害は神経活動を障害し、認知症の低下に繋がると考えられる。そこで、糖尿病マウスを用いて、BBBの機能の検討と認知機能との関連、そしてRASがBBBに及ぼす影響について検討した。

(a) エバンスブルーという色素を注射して、色素の脳への漏出を調べることでBBBの障害を検討した。エバンスブルーはKKAyマウスで顕著に漏出が認められ、RAS抑制薬を投与した糖尿病マウスでは色素の漏出は顕著に抑制されていた(図3)。



図3. 糖尿病マウスではエバンスブルーの脳内への漏出が認められ、レニン・アンジオテンジン系の抑制薬であるテルミサルタン投与で漏出が抑制される代表的な脳梗塞の大きさの写真(青い部分が漏出を示す) RAS:レニン・アンジオテンジン系

(b) さらに、アルブミンや免疫グロブリン(IgG)などを蛍光でラベルした物質を注射しても血管から漏出していることがわかり、糖尿病マウスでは比較的大きな物質も血管から漏れ出ている状態であると考えられた。RAS抑制薬を投与した糖尿病マウスではこれらの蛍光物質の漏出は顕著に抑制された。

(c) 続いて電子顕微鏡による微細構造を検討したところ、糖尿病マウスでは微小血管に接したアストロサイトが膨化した Swollen astroglial end-feet という状態になってお

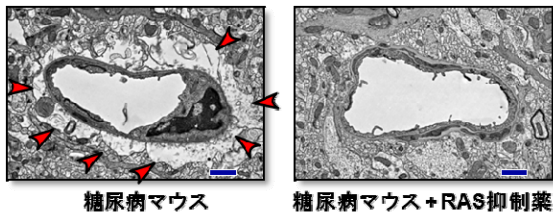


図4. 糖尿病マウスでは微小血管周囲のアストロサイトの膨化が認められる代表的な微小血管の電子顕微鏡写真(赤い矢印が膨化を示す) RAS:レニン・アンジオテンジン系、— 2μm

り、アストロサイトの機能不全を起こしていることが示唆された。一方、RAS抑制薬を投与した糖尿病マウスでは Swollen astroglial end-feet は顕著に抑制されていた(図4)。

(d) 次に BBBの構成タンパクであるタイトジャンクションタンパクの発現をウエスタンブロッティングで比較したところ、糖尿病マウスではタイトジャンクションタンパクの発現の低下が認められた。また、構成タンパクを溶解する酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼタンパクの発現は糖尿病マウスでは増加していた。

(e) これらの糖尿病マウスで認められた BBBの障害はRAS阻害薬であるテルミサルタンを投与したマウスでは顕著に軽減していた。

(f) 2型糖尿病のモデルマウスであるKKAyは、水迷路試験により検討した空間認知機能において、野生型マウスに比べて、認知機能の著しい低下が認められた。一方、RAS抑制薬を投与した糖尿病マウスでは認知機能の低下は認められなかった(図5)。

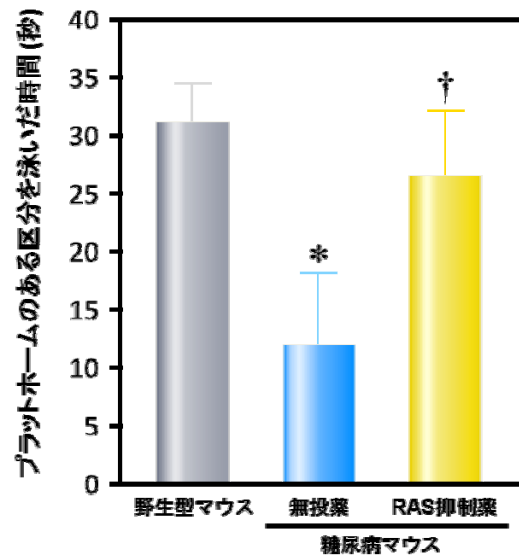


図5. 糖尿病マウスでは Morris 水迷路試験により、空間認知機能の著しい低下が認められるが、レニン・アンジオテンジン系の抑制薬であるテルミサルタン投与で抑制されるプラットフォームのある区分を泳ぐ時間の比較(泳ぐ時間が長いほど、プラットフォームの場所を認識していると考えられる) * p<0.05 vs. 野生型マウス、† p<0.05 vs. 無投薬糖尿病マウス RAS:レニン・アンジオテンジン系

(f) こうした結果から、RASの作用を制御することで微小血管障害が減弱し、糖尿病による認知症を抑制することが見出された。今回 BBBと骨髄細胞との関連については検討を行っていないが、細胞治療の標的でもある BBBとRASの関連について今後骨髄細胞機能を含めて検討していく予定である。以上の成果を英文医学誌: Hypertension (査読有) [雑誌論文#1]に報告した。

[雑誌論文] (計 4 件)

#1. Mogi M, Min LJ, Shudou M, Jing F, Tsukuda K, Ohshima K, Iwanami J, Horiuchi M, Peroxisome proliferator-activated receptor- γ activation with angiotensin II type 1 receptor blockade is pivotal for the prevention of blood-brain barrier impairment and cognitive decline in type 2 diabetic mice. 査読有, Hypertension. 59 巻:1079-1088 頁, 2012 年, DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.192401.

#2. Iwanami J, Mogi M, Tsukuda K, Min LJ, Sakata A, Jing F, Ohshima K, Horiuchi M, Effect of angiotensin II type 2 receptor deletion in hematopoietic cells on brain ischemia-reperfusion injury. 査読有, Hypertension. 58 巻:404-409 頁, 2011 年, DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.177873.

#3. Min LJ, Mogi M, Iwanami J, Sakata A, Jing F, Tsukuda K, Ohshima K, Horiuchi M, Angiotensin II and aldosterone-induced neuronal damage in neurons through an astrocyte-dependent mechanism. 査読有, Hypertens Res. 34 巻:773-778 頁, 2011 年, DOI: 10.1038/hr.2011.38.

#4. Tsukuda K, Mogi M, Iwanami J, Min LJ, Jing F, Ohshima K, Horiuchi M, Irbesartan attenuates ischemic brain damage by inhibition of MCP-1/CCR2 signaling pathway beyond AT₁ receptor blockade. 査読有, Biochem Biophys Res Commun. 409 巻:275-279 頁, 2011 年, DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.04.142.

[学会発表] (計 6 件)

#1. 茂木正樹、Vascular Dysfunction and Brain Aging-Role of renin-angiotensin system in the brain- 第 19 回 日本血管生物医学会学術集会 シンポジウム、2012 年 12 月 1-3 日、東京

#2. Telmisartan prevents cognitive decline in type 2 diabetic mice with improvement of blood-brain barrier disruption partly due to PPAR- γ activation. 24rd Scientific Meeting of the International Society of Hypertension. Sydney, 1-4, October, 2012

#3. PPAR- γ activation with AT₁ receptor blockade prevents blood-brain barrier disruption and cognitive impairment in type 2 diabetic mellitus

mice. International Conference of Alzheimer's Disease 2012, Vancouver, July 18, 2012

#4. 茂木正樹、アンチエイジングからみた高血圧研究 “高血圧治療と脳のアンチエイジング” Antihypertensive Treatment against Brain Aging 第 34 回 日本高血圧学会学術総会 シンポジウム、宇都宮、2011/10/20-21

#5. 茂木正樹、脳卒中基礎研究の今 (将来の新しい脳保護療法を目指して) 第 34 回 日本高血圧学会学術総会 日本脳卒中学会合同シンポジウム、宇都宮、2011/10/ 20-21

#6. 茂木正樹、脳血管イベント発症にレニン・アンジオテンシン系は如何に影響しているのか? How does the Renin-angiotensin System Affect Cerebrovascular Events? 第 43 回 日本動脈硬化学会総会 シンポジウム、札幌、2011 年 7 月 15 日-16 日

[図書] (計 1 件)

特集:脳保護はどこまで可能か RAS 抑制薬の今日的意義 脳の RAS update オーバービュー 査読無, Angiotensin Research, 8 巻: 171-176 頁, 2011 年

[その他] ホームページ等 <http://www.m.ehime-u.ac.jp/school/biochem1/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

茂木 正樹 (Mogi Masaki)

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 20363236

(2) 研究分担者

堀内 正嗣 (Horiuchi Masashi)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 40150338

(3) 連携研究者 なし