

## 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6月20日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2013

課題番号：22591597

研究課題名（和文）脳微小循環におけるアストロサイトの役割 - 2光子励起生体蛍光顕微鏡を用いて-

研究課題名（英文）Role of astrocytes in cerebral microcirculation -observation with two photon intravital microscope-

研究代表者

石川眞実（ISHIKAWA MAMI）

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60212859

研究成果の概要（和文）：GFAP-GFP マウスにより Astrocyte を可視化し、Qdot 静脈投与により脳血管を可視化して2光子励起生体蛍光顕微鏡で脳内微小循環を周辺環境とともに観察した。Penetrating arteriole や precapillary arteriole を取り巻くように astrocyte の end foot が観察され、間質にも無数の astrocyte が鮮明に観察された。くも膜下出血や脳梗塞発症直後からの脳内微小循環は著明に悪化し、GFP で可視化された astrocyte も消褪した。

研究成果の概要（英文）：GFP-labeled astrocytes and Qdot-labeled arterioles and capillaries were observed with two photon intravital microscope in GFAP-GFP mice. Penetrating arterioles and precapillary arterioles regulate cerebral microcirculation in mice with an infarct or a subarachnoid hemorrhage, comparing with normal mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
22年度	800,000	240,000	1,040,000
23年度	1,100,000	330,000	1,430,000
24年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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

キーワード：アストロサイト、脳虚血再灌流、くも膜下出血、一酸化炭素、硫化水素

### 1. 研究開始当初の背景

（1）脳梗塞やくも膜下出血後に発生する脳内の炎症反応は、血管透過性亢進や血小板・白血球の血管内皮への接着に始まる現象で、我々は、生体蛍光顕微鏡を用いて、脳表の微小循環を観察する研究を行ってきた。脳では、細動脈の周囲にはアストロサイトがとりまいており、ニューロンとアストロサイトとの間には情報伝達があることがわかっており、脳微小循環における血球動態と血管反応には、それらの脳細胞が大きく関与していることが予想される。脳血流調節には大血管の調

節機構も重要であるが、無数に存在する細動脈の血流調節機構の重要性も高いものと考えられる。vitro の実験とは異なり、in vivo での脳内血管と脳細胞の研究は、実際の現象を観察できる唯一の実験系であり、vitro の実験や理論上得られる結果の中で、実際に何が起きている現象かを見極めるためには必要不可欠である。

（2）脳梗塞やくも膜下出血の発症時の微小循環に関する研究は少なく、脳内の観察は未知の領域であった。脳虚血やくも膜下出血発症時の病態を把握することは、脳循環研究の

発展につながるだけでなく、より有効な治療につながる可能性がある。

(3) アストロサイトから情報伝達物質が放出され、微小循環調節がなされていると予想される。また、アストロサイトが足突起を出す血管周囲にはアクアポリンが存在し、アストロサイトの形態変化や脳浮腫に関係すると言われている。アストロサイトの形態とCa濃度変化などに代表される実際の変化を捉えられる観察が重要となる。また、ニューロンには一酸化炭素の合成酵素が多く存在し、脳内で産生された一酸化炭素は脳血管に対しては強い収縮作用を持っており、正常の状態では脳血管をある程度収縮状態に保つ役割がある。脳循環調節機構における一酸化炭素の役割は重要でありそのメカニズムの解明が注目されている。

## 2. 研究の目的

(1) 脳表だけでなく、脳内微小循環の研究システムを確立し、脳血管外の情報源としてのアストロサイトに注目し、その形態変化を含めて *in vivo* の系での観察研究システムを確立する。

(2) 正常時とともに、脳梗塞やくも膜下出血時の病態モデルを用いて、発症時の微小循環の変化とアストロサイトの変化を観察し、発症時のアストロサイトの関与を検討する。

(3) 脳内微小循環の観察システムを応用して、脳血管収縮物質である一酸化炭素の脳内循環に対する役割を検討し、その産生場となっているニューロン-アストロサイトの脳循環調節への関与や病態における意義を検討する。

## 3. 研究の方法

(1) マウスを全身麻酔し、脳表に頭窓を作成して2光子励起生体蛍光顕微鏡を用いて観察した。静脈投与したQdotにより可視化した血管を観察して血管径の変化を捉え、**GFAP-GFP** マウスで異なる波長のレーザー光を用いて**GFP**により可視化されたアストロサイトの形態を観察した。Qdotを静脈投与することで、血管径だけでなく**line scan**による血流速度を測定した。これは、2光子励起生体蛍光顕微鏡を用いた場合、完全なりアルタイムの測定ができないことから、血流評価が困難となるため、非常に重要である。

(2) 脳梗塞やくも膜下出血の病態モデルマウスを用いて(1)の脳内微小循環を観察した。マウスの脳表を上に向けて、脳を観察できる状態とし、中大脳動脈にナイロン糸をつめて脳梗塞を作成、また、ナイロン糸で血管を貫いてくも膜下出血を作成した。腹臥位でこれを行うことで、脳梗塞やくも膜下出血発症直後1分以内の血管反応性が観察できる

ようになり、発症直後の起こる物理的変化に対する生体の反応を秩序だてて観察できるようにした。アストロサイトの変化も観察して、病態における反応を観察することで、生理機能を検討した。

(3) 一酸化炭素の合成酵素である **heme oxygenase** の **knockout mouse** を用いて、脳梗塞・くも膜下出血発症時の脳微小循環とアストロサイトを観察し、正常マウスと比較することで、ニューロンに多数存在する **heme oxygenase** から産生されるCOの役割を検討した。

## 4. 研究成果

(1) **Astrocyte** の **end foot** は細動脈周囲をとりまき、脳表近くにも多く存在し、また、太い静脈周囲や一部の毛細血管周囲にも存在した。細動脈の血流速度は10mm/s以上でそれ以上の高速は**line scan**では測定が困難であり、一方、毛細血管血流速度は**line scan**でも測定可能な範囲であった。脳表から垂直に脳を貫くように入る **penetrating arteriole** とさらにその血管から枝分かれする **precapillary arteriole** は、さらに毛細血管へと枝分かれした。

(2) まず、脳梗塞を作成して虚血中の脳内を観察すると、脳表の血流は **colateral circulation** として維持されるように見えていたが、**penetrating arteriole** や **precapillary arteriole** の血流は低下し、微小循環全体の血流が著明に低下、毛細血管の中には血流が悪化して流れが途絶えてしまう血管も多数みられた。**Line scan**での細動脈の血流速度は容易に測定可能なレベルまで低下した。血管透過性も亢進し、Qdotが血管内皮からもれ、まず、基底膜内にとどまっている様子が観察された。そういった血流悪化時には、血管周囲の **astrocyte** の **GFP** 蛍光強度は著明に低下していた。30分、60分の虚血後に再灌流しても血流が再開しない毛細血管も多い。血流の再開とともに、**astrocyte** の **GFP** 蛍光強度は回復傾向を示し、特に60分虚血後の再灌流では、**GFP** の蛍光強度は虚血前よりもさらに増強した。蛍光強度の低下は、細胞内 **acidosis** の進行が予想され、今後その病態について解明する必要があり、また、再灌流後の蛍光強度の **overshoot** については不明であり今後の検討を要するものである。

また、脳虚血再灌流後の血管反応性を観察するためには、血流低下が強く観察不能になってしまうため、再灌流が十分可能な虚血時間を5分とした。

脳虚血中の細動脈は、血管内体積も低下するために、拡張できる血管とあまりかわ

らない血管が存在したが、再灌流するとすぐに一旦は拡張した。その拡張は時間経過より物理的拡張と考えられ、その後、10分以内に、一度収縮するというのが今回の結果である。くも膜下出血では、出血直後1分以内に一度拡張し、その後収縮に転じたが、血管内体積の急激な低下を示すマウスでは、血管拡張にも至らず流れなくなったり、血流が回復して拡張に転じるものもある。血管により、また、くも膜下出血後の時間にもよって変わる。くも膜下出血直後の継時的観察では細動脈に無数の足突起を出したアストロサイトの蛍光強度の増減が観察され、それに平行して precapillary の血管径も変化し、情報伝達システムの存在が示唆された。血管基底膜と aquaporin 4 を介して血管内腔とアストロサイトは接するが、脳血流障害時にアストロサイトの膨大化は観察されなかった。

(3) heme oxygenase の knockout mouse では、脳虚血作成時の血管変化は、やはり様々であったが、再灌流後の血流増加とその後に見られる血管収縮も有意な変化とならなかった。このことは、正常マウスでは、常に産生される一酸化炭素が血管を一定の収縮レベルに保っていることを示唆する結果である。脳循環予備能維持のメカニズムとして、脳内で産生される一酸化炭素の存在が示唆された。

今後、更に、研究を進展させるために、蛍光色素による pH 測定や、H<sub>2</sub>S の蛍光測定を進めながら、Astrocyte と CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S の関与の検討を進め、ATP 産生などのエネルギー代謝の検討を加えて、細胞壊死の前に生ずる神経機能低下のメカニズムの探求に発展させ、neurovascular coupling について検討を進めたい。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

1, Nakamura T, Kajimura M, Morikawa T, Hattori K, Ishikawa M, Yukutake Y, Uchiyama S-I, and Suematsu M: Acute CO<sub>2</sub>-independent vasodilatation of penetrating and pre-capillary arterioles in mouse cerebral parenchyma upon hypoxia revealed by a thinned-skull window method. *Acta Physiol.* 203:187-196, 2011.

2, Morikawa T, Kajimura M, Nakamura T, Hishiki T, Nakanishi T, Yukutake Y,

Nagahata Y, Ishikawa M, Hattori K, Takenouchi T, Takahashi T, Ishii I, Matsubara K, Kabe Y, Uchiyama S, Nagata E, Gadalla MM, Snyder SH, Suematsu M. Hypoxic regulation of the cerebral microcirculation is mediated by a carbon monoxide-sensitive hydrogen sulfide pathway. *PNAS* 109:1293-1298, 2012.

[学会発表] (計6件)

- ① 石川眞実、加持春菜、海老原彰、草鹿元、田中裕一、森川隆之、中村智実、梶村眞弓、末松 誠. くも膜下出血直後の脳微小循環とアストロサイト 2 光子励起生体蛍光顕微鏡によるマウスでの観察. 第71回日本脳神経外科学会総会, 大阪, 2012年10月18日
- ② 石川眞実、伊古田雅史、山黒友丘、加持春菜、海老原彰、草鹿元、田中裕一. 内頸動脈・中大脳動脈閉塞時の患側健側脳循環予備能の解析. 第24回日本脳循環代謝学会総会, 広島, 2012年11月8日
- ③ 石川眞実、加持春菜、海老原彰、草鹿元、田中裕一、森川隆之、中村智実、梶村眞弓、末松 誠. GFAP-GFP マウスの脳微小循環とアストロサイトの観察 2 光子励起生体蛍光顕微鏡を用いて. 第24回日本脳循環代謝学会総会, 広島, 2012年11月9日
- ④ M Ishikawa, M Kajimura, T Morikawa, T Nakamura, H Kamochi, A Ebihara, G Kusaka, Y Tanaka, M Suematsu. Cerebral arteriolar responses immediately after MCAO and reperfusion. The 38 Annual Meeting of Japanese Society for Microcirculation Tokyo, 2013年2月8日
- ⑤ 石川眞実、加持春菜、海老原彰、草鹿元、田中裕一、森川隆之、中村智実、梶村眞弓、末松誠. 脳主幹動脈閉塞時の脳循環代謝予備能の解析. *Stroke2013* (日本脳卒中学会), 横浜, 2013年3月21日
- ⑥ 石川眞実、加持春菜、海老原彰、草鹿元、田中裕一、森川隆之、中村智実、梶村眞弓、末松誠. くも膜下出血直後の脳微小循環 GFAP-GFP マウスを用いた 2 光子励起生体蛍光顕微鏡に

よる観察. Stroke2013 (日本脳卒中  
の外科学会), 横浜, 2013年3月23  
日

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

ホームページ、自治医科大学研究シーズ  
[http://rseeds.jichi.ac.jp/research\\_seeds/a  
dmin/ResearchResultList.php?publicId=  
14opE7ws6jbhTHDMJfccJbIQj6kTVF](http://rseeds.jichi.ac.jp/research_seeds/admin/ResearchResultList.php?publicId=14opE7ws6jbhTHDMJfccJbIQj6kTVF)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石川眞実 (ISHIKAWA MAMI)  
自治医科大学医学部・准教授  
研究者番号: 60212859