

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：34204

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590288

研究課題名(和文) 脳梗塞における血管透過性亢進の影響と線溶因子の役割の新規モデルを用いた定量的検討

研究課題名(英文) Quantitative analysis of the roles of fibrinolysis system component on the vascular permeability after ischemic stroke by using new animal model

研究代表者

永井 信夫 (Nagai, Nobuo)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授

研究者番号：90260281

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：虚血に伴う脳血管透過性の亢進が脳梗塞の進行に及ぼす影響は明らかではない。本研究では新規マウス脳梗塞モデルを用いて、血管透過性が亢進した領域に虚血を付加すると脳神経細胞死が増加することを認め、血管透過性の亢進が脳梗塞を増悪することを実験的に示した。

一方、血栓の溶解や皮膚等の組織の修復に寄与する線溶系の因子のうち、プラスミノゲンの遺伝子欠損マウスにおいて同一の脳傷害を誘導した後の運動感覚機能の回復と脳梗塞後の梗塞サイズの縮小が対照野生型マウスに比べて遅延していることを認めた。これらの結果よりプラスミノゲンが脳梗塞後の神経機能の修復および壊死組織の除去に促進的に寄与することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Effect of the increase in vascular permeability (VP) on the outcome of ischemic stroke has been clarified. By using a new ischemic stroke model, we found the deterioration of ischemic stroke by combination of the increase in VP followed by whole brain hypoxia, indicating the deteriorating effect of VP on the ischemic stroke outcome.

We also studied the roles of plasminogen (Plg), a component of the fibrinolytic system by using Plg KO mice. Compared with WT mice, Plg KO mice showed a delayed recovery of both motor and sensory functions and the reduction of the damage size after induction of a ischemic brain damage which was highly reproducible among the group on day 1. These findings indicate that Plg accelerates both the recovery of both neurological dysfunction and histological improvement after ischemic stroke.

研究分野：生理学

キーワード：脳梗塞 血液脳関門 マウス病態モデル 線溶因子

1. 研究開始当初の背景

虚血性脳梗塞後の脳傷害の修復および神経機能障害の回復は、時間的・空間的に制御された病態生理学的反応(アストロサイトの活性化、ミクログリアの集積、血管新生、神経ネットワークの再編成など)を経て行われる。これらの反応の研究は、人の脳梗塞を模してマウスやラットの中大脳動脈あるいは内頸動脈を閉塞し脳梗塞を誘導するモデルが用いられてきたが、血管走行の個体差に起因する脳梗塞の傷害サイズ・部位の個体差が小さい。

申請者は、光化学血栓反応を応用して、個体間での部位とサイズのばらつきが非常に小さいうえ、任意の部位とサイズに虚血性脳傷害を誘導できるマウス定量脳傷害モデルを確立した。また本モデルを用いて、傷害後の病態生理学的反応は、大きい傷害ほどより顕著に認められることを示し、脳傷害サイズが異なる動物間では、傷害後の病態生理学的反応を定量的に比較検討することは困難であることを明らかにした(Nagai et.al. Brain Res. 2010; 1322:109-117)。

一方、脳梗塞後の傷害部位およびその周辺部位では血管透過性が亢進することが広く知られているが、我々は本モデルを用いて傷害1日後の急性期に血管透過性の亢進が傷害周囲部で血管新生に非依存的に起こること、傷害7-14日後の慢性期の傷害内部では血管透過性の亢進は血管新生に依存して起こるものの傷害周囲部のアストロサイトが分布する領域では新生血管の透過性は抑制されていること、また傷害内の新生血管の透過性には部位差があり脳表面に近いほど透過性が高いことを示し、脳梗塞後の血管透過性亢進の特徴を明らかにした(Yano et. al. Neuroreport 2011; 22: 424-427)。

脳梗塞に伴う血管透過性の亢進は、グルタミン酸やカリウムなどの神経障害性を持つ因子の血液中からの漏出を促進することから、脳梗塞の増悪要因とされる。この仮説は直接的な証明はなされていないものの、脳梗塞に伴う血管透過性亢進のメカニズムとその抑制による脳梗塞治療の可能性の研究は広く行われている。しかしながら、申請者は本モデルを用いた予備的検討より、傷害後1日に血管透過性が亢進する傷害周囲部では傷害後7日まで脳梗塞が広がらず、血管透過性亢進は脳梗塞の増悪に寄与しない可能性を示唆する結果を得ている(未発表データ)。線溶因子の1つであるプラスミノゲン(Plg)はプラスミノゲンアクチベーターによりプラスミン(Pli)に活性化され、血栓の主成分であるフィブリンを分解するとともに、細胞外マトリックス蛋白質の分解を介して組織のリモデリングに寄与する。また中枢神経系においては記憶・神経ネットワークの再構築・神経細胞死・ミクログリアの活性化への寄与が報告されている。さらに、プラスミノゲンの生理的限定分解により生成するアンギオ

スタチン(クリングルドメイン3-5ペプチド)は、血管新生抑制促進因子の活性を持つ。これらの知見より、脳梗塞後の血管新生および他の病態生理学的反応、さらに神経ネットワーク再構築を介した神経機能再生にPlgが寄与している可能性が強く予想される。しかしながら、マウス中大脳動脈閉塞脳梗塞モデルでは、誘導される脳梗塞はPlg遺伝子欠損(PlgKO)マウスでは対照野生型(PlgWT)マウスに比べて有意に大きい(Nagai et. al. Circulation 1999; 99: 2440-2444)ため、これらのマウスに同じサイズの脳梗塞を誘導して、その後の病態生理学的反応を定量的に比較検討することは困難である。そこで、申請者は定量脳傷害モデルを用いて、同じサイズの傷害をこれらのマウスの運動野と統合野を含む領域に誘導し、その後の病態生理学的反応と神経機能障害の回復を予備的に検討した。その結果、PlgWTマウスに比べPlgKOマウスでは脳傷害サイズの縮小の有意な低下、および脳傷害に伴う運動機能障害の回復の有意な遅延を認め、Plgが脳傷害修復および神経機能回復へ寄与することを示唆する結果を得ている(未発表データ)。

2. 研究の目的

本申請研究では、A)急性期に血管透過性の亢進する傷害周囲部における慢性期の梗塞の広がりおよびアポトーシス細胞の出現を継時的に測定し、血管透過性の亢進が脳梗塞の増悪要因とならないことを明らかにすることを目的とした。

さらに、B)脳傷害後の病態生理学的反応(傷害の縮小、アストロサイト活性化、ミクログリア集積、血管新生、神経細胞新生)をPlgWTマウスとPlgKOマウスの間で比較し、これらの反応におけるPlgの寄与を明らかにする。次に、傷害後の脳におけるPlgの発現部位・発現時期、およびその部位でのシナプス数の経時的变化を検討する。さらにその部位へのPli阻害剤投与による病態生理学的反応および神経機能回復の遅延を検証し、病態生理学的反応および神経機能修復におけるPlgの寄与を空間的・時間的レベルで明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

A)定量脳傷害モデルを用いてマウスに傷害を誘導後、急性期に血管透過性が亢進する傷害周囲部における慢性期に脳梗塞の拡大およびアポトーシス細胞の誘導を組織学的手法により検討し、血管透過性と脳梗塞の増悪の関連を検討した。

B)同モデルを用いてPlgWTおよびPlgKOマウスの運動野 統合野の領域に虚血性脳傷害を誘導した。その後、感覚機能および運動機能(歩行機能、バランス機能)の評価を行った。評価は2回/週の間隔で行い、vonFley試験で感覚機能を、足踏み外し試験および体持ち上げ試験でバランス機能の評価を行っ

た。足踏み外し試験は、マウスに幅 3cm の橋を渡らせ、その間に足を踏み外す回数からバランス機能を評価する試験である。体持ち上げ試験はしっぽをつまんで持ち上げられたマウスが体を左右に持ち上げる時間からバランス機能を評価する試験である。次に、同傷害誘導後 7 日までの脳の傷害サイズを測定するとともに、組織切片を作成し、ミクログリアの集積およびアストロサイトの活性化を組織学的手法により評価し、傷害修復反応を比較検討した。

さらに Plasmin の生理的阻害因子でその機能の制御に寄与する 2 antiplasmin ($\alpha 2AP$) の KO マウスと WT においても同モデルにより脳傷害を誘導し、病態生理学的反応および神経機能障害の経時的变化を組織学的手法および行動科学的手法により比較し、PIg の機能の解明を試みた。

4. 研究成果

A) 脳梗塞に伴う梗塞周辺部の血管透過性の亢進は傷害誘導後 8 時間まで拡大し、7 日まで経時的に縮小した。この血管透過性亢進部位での細胞死を検討したが、7 日まで細胞死は認められなかった。これらの結果より血管透過性の亢進自体は脳組織あるいは神経細胞の傷害を促進したい事が明らかとなった。一方、傷害誘導後 4 時間の透過性が亢進した状態で全脳虚血を 30 分間付与すると 4 日目の障害が拡大していることを認め、血管透過性の亢進が虚血性の神経細胞障害を促進することを明らかにした (図 1)。

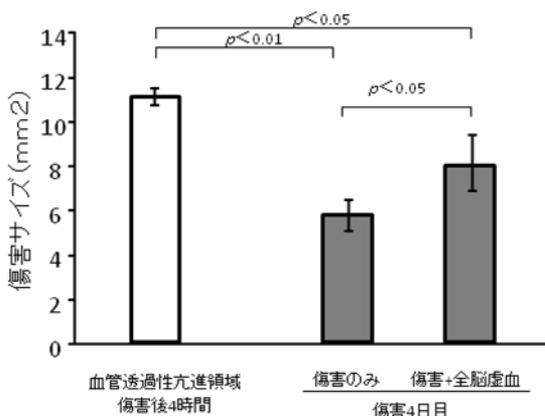


図 1

以上の結果より、血管透過性自体は神経傷害を促進することはないものの、脳梗塞の病態においては、血管透過性が亢進する原因が血管への虚血刺激であることから、脳梗塞に伴う血管透過性の亢進は脳梗塞を増悪する要因となることが示唆された。

B) 脳傷害誘導後の運動および感覚神経機能の評価において、傷害後の経時的な神経機能回復が PIgWT マウスおよび PIgKO マウスで明確に認められたものの、運動・感覚機能のスコアは傷害後 14 日において KO マウスで有意に悪

い値を示し、回復の速度が WT マウスに比べて KO マウスで有意に遅延していることを確認した (図 2、tail lift test)。

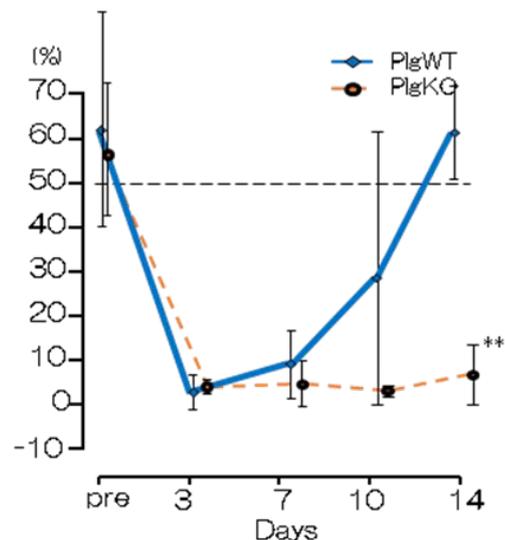


図 2 感覚機能回復

これらの結果より PIg は神経機能障害の回復に必須ではないものの、促進的に寄与していることが明らかとなった。一方、両マウスにおいて傷害サイズの経時的な縮小を認めたが、傷害 7 日目において KO マウスで有意に大きい値を示し、KO マウスでは縮小の速度は有意に遅延していることを示した。さらに組織学的検討により傷害周囲に集積するミクログリアの数が KO マウスで有意に減少していることを認めた。これらの結果より、PIg がミクログリアの集積の促進を介して傷害の修復に寄与していることを示唆した。

一方、 $\alpha 2AP$ KO マウスでは WT マウスに比べて神経機能回復が亢進している蛍光を認めたものの、PIgKO マウスと WT マウスほど顕著な差は認められず、神経機能回復における機能は認められなかった。しかしながら、傷害組織の縮小およびミクログリアの集積、特に貪食性ミクログリアの集積が $\alpha 2AP$ KO マウスで促進していることを認め、傷害部位の組織学的修復においては $\alpha 2AP$ が抑制的に寄与することを明らかにした。

これらの結果より、PIg が脳傷害後の神経機能障害回復および組織学的修復に促進的に寄与することが示された。また、Plasmin の阻害因子である $\alpha 2AP$ は組織学的修復には寄与するものの、神経機能学的修復における寄与は小さいことが明らかとなった。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 7 件)

Roles of alpa2-antiplasmin on repair responses after brain damage 山田雅香 永井信夫 第 90 回日本生理学会
脳梗塞に伴う障害部位周辺での血管透過性の亢進におけるプラスミンの関与 湯川直人、鈴木康裕、梅村和夫、永井信夫 第36回日本血栓止血学会
脳梗塞における組織型プラスミノゲン活性化因子(t-PA)による神経機能障害の回復への関与の検討 酒井祐輔、森田真弘、高島里美、大森智恵美、鈴木康裕、梅村和夫、永井信夫 第36回日本血栓止血学会
脳梗塞後の神経機能制御におけるプラスミノゲンの寄与の検討 大森智恵美、高島里美、鈴木康裕、梅村和夫、永井信夫 第36回日本血栓止血学会
血管内皮細胞での Tie-1 および Tie-2 の発現における tPA の作用 高島里美、岩前拓志、永井信夫 第36回日本血栓止血学会
血管内皮細胞表面のプラスミンの基質の検討 木村七海、長谷川慎、永井信夫 第36回日本血栓止血学会
脳梗塞後の修復における tPA の関与 永井信夫 第 92 回日本生理学会

(2)研究分担者 ()

研究者番号 :

(3)連携研究者 ()

研究者番号 :

〔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 :
出願年月日 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

永井信夫 (NAGAI, Nobuo)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授

研究者番号 : 90260281