

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：82502

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659578

研究課題名(和文) マウス中脳動脈閉塞モデルのインビボ分子機序とマイクロ形態計測による虚血病態の解明

研究課題名(英文) In vivo molecular mechanism and micro morphology of brain diseases in mice

研究代表者

菅野 巖 (Kanno, Iwao)

独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・主任研究員

研究者番号：10360356

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：低酸素飼育による脳組織病態と血管新生をPET、オートラジオグラフィ、免疫染色にて検討した。B6マウスを酸素濃度8～9%の低酸素チェンバーで4、7、10、14日間飼育した。PETではTSP0の発現を[C11]PK11195(PK)で、 $\alpha$ 3インテグリン発現を[Cu64]RAFT-RDG(RDG)で評価した。その結果、PK-PETでは4日目でTSP0の発現が最大になった。免疫染色でもこのことを確認した。RDG-PETは脳へ移行が低く評価は困難であった。RDGのオートラジオグラフィでのみ14日目に組織内に放射能が見られた。免疫染色ではインテグリンの発現のピーク時期を推定出来なかった。

研究成果の概要(英文)：We evaluated tissue pathophysiology and angiogenesis in the brain induced by hypoxia in mouse. B6 mice kept in 8-9% oxygen chamber for 0, 4, 7, 10, 14 days. Using PET, the TSP0 emergence in the brain was estimated by employing [C11]PK11195 (PK), and the endothelium integrin was estimated by employing [Cu64]RAFT-RDG (RDG). Autoradiography (ARG) was performed after RDG-PET. PK-PET revealed the SUV was peaked at 4th day, suggesting that microglia was maximally activated at 4th day. On the other hand, RDG-PET was difficult to evaluate the maximum peak date of radioactivity in the brain due to too little entrance of the RDG through BBB. RDG-ARG revealed radioactivity in the brain parenchymal tissue only in the 14th day, suggesting angiogenesis was occurred at least 14th day, however, it is not clear whether angiogenesis appeared earlier than 14th day.

研究分野：内科系臨床医学

科研費の分科・細目：放射線科学

キーワード：PET 低酸素飼育マウス TSP0発現 インテグリン発現 11C-PK11195 64Cu-RAFT-RGD オートラジオグラフィ 免疫染色

## 1. 研究の背景

(1) 脳疾患病態の PET によるマクロ的病態変化のミクロ的検証を得る疾患モデルとして当初計画した中大脳動脈閉塞による脳虚血モデルは既に多くの類似研究が行われていることを考慮して、脳虚血モデルに代わり低酸素モデルにおけるマクロ的病態変化とそのミクロ的検証を施行した。

(2) 低酸素モデルに関して、我々は 8~9% 低酸素チェンバー飼育マウスを用いて、4 週間まで経時的に追跡測定して、2 光子顕微鏡で血管が拡張し、ひげ刺激による LDF 賦活脳血管反応性の消失を報告した。さらに、1~2 週目で血管新生が起こることを報告した。本研究では、低酸素飼育に伴う血管新生に焦点を合わせ、それに前後する脳組織病態を検討した。

## 2. 研究の目的

低酸素飼育期間と血管新生に関わる脳組織病態の変化を、8~9% 酸素チェンバーで飼育したマウスを用いて、核医学的に検討し、その検証のために免疫染色的アプローチを行った。特に、低酸素飼育に伴う血管新生のタイミングとそれに伴う病態追跡を目的とする。

これまでの研究でグリア細胞の膨化が観察されているので本研究ではミクログリアの活性化を確認するため PET で  $^{11}\text{C}$ -PK11195 による TSPO 発現を測定することにした。また、血管新生についてはインテグリン  $\alpha_3$  の PET マーカーである  $^{64}\text{Cu}$ -RFAD-RGD 集積を測定した。それぞれの PET 測定を 0 から 3 週までの低酸素期間で実施し、それぞれのマーカーの経時変化を検討した。

## 3. 実験方法

### (1) 低酸素飼育

マウスを酸素濃度 8~9% のチェンバーで飼育した。低酸素期間は 0 日 (0d)、4 日 (0d)、7 日 (7d)、10 日 (10d)、14 日 (14d) とした。1 週間以上の飼育では 1 週間毎に床替えのため短時間、低酸素環境をブレイクして室内環境に移行した。

### (2) PET 測定

PET は非侵襲的であり低酸素飼育期間による変化を同一個体で経時的に追跡測定する計画で実施したが、PET 測定中はイソフレルアン麻酔下で最低 2 時間以上の拘束後の 8~9% の低酸素環境に耐えられず、PET 後に戻すことによる死亡事故が発生したため異なる低酸素期間の PET 測定は別個体で実施した。

使用 PET 装置は  $^{11}\text{C}$ -PK11195 (以下、PK-PET) は Focus200 で 4 匹同時測定を、 $^{64}\text{Cu}$ -RAFT-RDG (以下、RDG-PET) は Inveon で 2 匹同時測定を行った。いずれも Isoflerane 1.2~1.5% 麻酔下で実施した。トレーサー投与量は 500  $\mu\text{Ci}$ 、投与容積は 50~100  $\mu\text{L}$  であった。トレーサーは尾静脈からスキャン開始と同時に投与し、投与後にシリンジ残量放射能を計測し正味の投与量を算定した。個体毎の体重とともに脳内集積の SUV 評価に用いた。

PK-PET は 90 分ダイナミック測定を行った。RDG-PET は 60 分ダイナミック測定を行い、さらに、150 分から 180 分までのスタティック測定を追加した。

### (3) PET 画像解析

PET 測定画像は PMOD で解析した。個体毎に標準 MRI にレジストレーションを行い、代表的な領域ごとに共通の VOI を定めて、以下の解析を実施した。

PK-PET はダイナミック測定 30 分から 60 分までの積算値から SUV を計算した。RDG-PET は 150 分から 180 分までの積算値から SUV を求めた。

### (4) オートラジオグラフィ (ARG) 測定

$^{64}\text{Cu}$ -RAFT-RDG は新生血管に発現するインテグリンに結合すると予想されているが、PET 測定では個々の血管レベルの分解能は期待できないため、ARG を実施して放射能集積部位の詳細画像を検討した。PET 終了直後に左心腔から生食灌流した後に脳を摘出しドライアイス粉末中で瞬時凍結した。20  $\mu\text{m}$  厚に切片を作り、18~24 時間イメージングプレートに接触した。また、一部のマウスは PET 測定なしに ARG 測定専用  $^{64}\text{Cu}$ -RAFT-RDG を投与し、PET 測定マウスと同様に 3 時間後に生食灌流して ARG 処理を施行した。

### (5) 免疫染色

低酸素飼育期間毎に独立に準備したマウスをもとに免疫染色的に測定した。ミクログリアの活性化、インテグリンの発現、血管内皮細胞の分布を、それぞれ、Iba1、CD61、CD31 の抗体染色し蛍光撮影した。CD31 と CD61 は 2 重染色を行った。

## 4. 実験結果

### (1) PK-PET の SUV

PK-PET での SUV を低酸素飼育日数 = 0d, 4d, 7d, 14d でそれぞれプロットするといずれの領域でも 4d で最大を示した。すなわち、4d で TSPO 発現が最大 (= ミクログリアの活性化が最大) に達していた。

Iba1 の免疫染色では、4d の染色頻度が最

大で、活性化したミクログリアの大きな細胞体が多く見られた。それが、7dになると細い線状の染色が見られるが、膨化した丸い形状の染色は全く見られなかった。

## (2) RDG-PET および RDG-ARG

RDG-PET ではトレーサーの脳への取り込みがわずかで、脳組織外からのスピルオーバーが大きく、7dと14dの比較では有意な差異は現れなかった。RDG-ARG では、脳実質部への放射能集積がほとんど見られず、脳室腔のみに強い放射能分布が見られた。14d マウスにのみ大脳皮質部脳内実質に淡い放射能分布が見られた。しかし、他の低酸素期間の ARG では見られなかった。

免疫染色では CD31 による内皮細胞と CD61 による内皮細胞内インテグリンの発現の重なりあう血管状形態が見られた。これは 0d、7d、14d ほぼ同頻度で見られ、低酸素飼育により新生した血管を示唆しているか不明である。

## 5. 検討、まとめ

### (1) TSPO 発現

PK11195 による PET 測定で 4d が最大であることが示された。これはミクログリアの活性化に伴う TSPO の発現であることが免疫染色で Iba1 の染色密度が 4d で最大であったことと一致する。このことは血管新生に先立ち、脳組織上の酸素分圧低下のトリガーによりミクログリアの活性化が起こり、それが 7 日目になると組織が低酸素状態に順応して、ミクログリアが沈静化したためと考えられる。4d に見られたミクログリアの活性化とそれ以降に発生する血管新生との因果関係は現時点では不明である。

### (2) 血管新生

今回はマウスの体幹部腫瘍において血管新生のイメージングを確認している<sup>64</sup>Cu-RAFT-RDG を用いて、低酸素による脳における血管新生のイメージングを試みたが RDG-PET ではトレーサーが BBB を透過せず PET の SUV による評価は困難であった。このことは RDG-ARG においても、脳実質内にはほとんど放射能がなく、脳室脊髄腔のみに放射能が見られたこと、とも一致する。脳室脊髄腔の放射能が脳血管から直接脳脊髄腔へ移動したのか、脳室壁の脈絡叢内のものか、は不明である。

免疫染色における血管内皮と血管発現インテグリンを見るための CD31 と CD61 の重ね合わせの検討では、低酸素飼育日数 0d、7d、14d の 3 期間の検討では顕著な差異が見られず、免疫染色的に血管新生を確認することは出来なかった。

### (3) 結語

低酸素飼育マウスでは 4d で PK-PET により TSPO 発現が最大を示した。血管新生は RDG-PET では確認できなかったが、14d の RDG-ARG でのみ脳実質部における血管新生を示唆した。

## 6. 主な発表論文等

[雑誌論文] (合計 6 件)

Tajima Y, Kanno I, 他 9 名, Changes in cortical microvasculature during misery perfusion measured by two-photon laser scanning microscopy. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2014 May 21. doi:10.1038/jcbfm.2014.91. 査読有

Masamoto K, Kanno I, 他 8 名. Microvascular sprouting, extension, and creation of new capillary connections with adaptation of the neighboring astrocytes in adult mouse cortex under chronic hypoxia. *J Cereb Blood Flow Metab* 34: 325-31 2014 査読有

Kimura A, Kanno I, 他 8 名. Novel system using microliter order sample volume for measuring arterial radioactivity concentrations in whole blood and plasma for mouse PET dynamic study. *Phys Med Biol*, 58: 7889 - 7903, 2013. 査読有

Sekiguchi Y, Kanno I, 他 9 名、Measuring the vascular diameter of brain surface and parenchymal arteries in awake mouse. *Adv Exp Med Biol.* 2013; 789:4 19-25. doi: 10.1007/978-1-4614-7411-1\_56. 査読有

Masamoto K, Kanno I, 他 9 名, Hypoxia-induced cerebral angiogenesis in mouse cortex with two-photon microscopy. *Adv Exp Med Biol.* 2013; 789:15-20. doi: 10.1007/978-1-4614-7411-1\_3. 査読有

Hotta H, Kanno I, 他 9 名, Layer-specific dilation of penetrating arteries induced by stimulation of the nucleus basalis of Meynert in the mouse frontal cortex. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2013, 33:1440-7. doi: 10.1038/jcbfm.2013.92. 査読有

[学会発表] (合計 5 件)

田桑 弘之, 菅野 巖, 他 5 名, 覚醒マウス脳表における神経活動および脳

血流変化の同時計測システムの構築、レーザー学会第452回研究会「ニューロフォトンクス」、日本レーザー学会、2013-11-29

川口拓之、菅野 巖、他5名、二光子顕微鏡でのCBV測定、第3回核医学画像解析研究会、核医学画像解析研究会、2013-11-25

田桑 弘之、菅野 巖、他5名、脳賦活および脳機能抑制による細動脈、毛細血管、細静脈の血管径変化、第25回日本脳循環代謝学会総会、日本脳循環代謝学会、2013-11-02

Kanno I, 他11名、Reduced Response in Cortical Penetrating Artery but Sustained Response in Cortical Surface Artery to Whisker Stimulation in Chronic Hypoxia Mice、Brain & BrainPET 2013, ISCBFM, 上海、2013-05-23

Takuwa H, Kanno I, 他8名、Hemodynamic changes in crossed cerebellar diaschisis measured by Laser-Doppler flowmetry in awake mice、Brain & Brain PET 2013, ISCBFM, 上海、2013-05-23

[その他]

招待講演(合計1件)

菅野 巖、脳核医学と分子イメージング-核医学を目指す若い人たちへのメッセージ、特別講演、第53回日本核医学会学術総会、福岡市、2013-11-08

依頼原稿(合計1件)

菅野 巖、PET 今昔、巻頭言、Isotope News 722、2014

7. 研究組織

(1) 研究代表者

菅野 巖 (KANNO, Iwao)  
独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・主任研究員  
研究者番号：10369356