

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460912

研究課題名(和文) 大脳皮質下病変に関連する認知障害及び機能障害とアミノ酸トランスポーターの関与

研究課題名(英文) Relationship between white matter changes and cognitive/functional impairment :an association of amino acid transporter.

研究代表者

神崎 恒一 (KOZAKI, KOICHI)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：80272540

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：実験的に作成した低環流状態の脳では炎症マーカーが亢進し、アストロサイトやミクログリアの活性化を引き起こし、結果として虚血病変が形成されることが確認できた。行動変化としては、慢性脳低還流から皮質下病変を発症した若年マウスおよび60週齢を超えた高齢マウスでは、探索嗜好性や記憶力の低下が認められ、これは大脳皮質下病変を保有するヒトの臨床症状と同様であった。また性別によって行動変化に相違がみられた。

研究成果の概要(英文)：In a mouse model of chronic cerebral hypoperfusion, inflammation markers were raised and astrocyte (GFAP) and microglia (iba1) increased significantly. As a behavioral change after chronic cerebral hypoperfusion, a decline of novel preference and a decline of curiosity were observed in young mouse and adult mouse over 60weeks old. There was a difference of behavioral change after hypoperfusion between male and female mouse.

研究分野：老年医学

キーワード：大脳皮質下病変 慢性脳低還流

1. 研究開始当初の背景

大脳皮質下病変は脳の器質的変化であり、認知障害や老年症候群の発症、進展に關与することが報告されているが、その成因や臨床的意義については不明な点が多い。一方、アミノ酸トランスポーターの一つである LAT1 は脳に存在して血液脳関門を構成している。研究申請者はこれまでに動脈硬化病変形成時に LAT1 の機能を阻害することで病変形成が抑制されることを明らかにした。

さらに近年マウス慢性脳低還流状態を誘発する実験モデルが用いられるようになってきたため、本モデルを利用して大脳皮質下病変形成に対するリスクを検証するべく、研究を開始することとした。

2. 研究の目的

上述した背景およびこれまでの実験結果から、血液脳関門に豊富に存在する LAT1 の役割を解明することで、認知症、高齢者の機能障害の原因解明と予防に役立てることを目的とした。具体的には、LAT1 発現制御によって大脳皮質下病変形成および臨床症状の発症を制御できるかどうか検討することにした。大脳白質病変の成因や形成過程は不明であったため、Aging の影響や、性別検討などもおこなった。

3. 研究の方法

(1)マウス慢性脳低還流モデルの作製

マウス頸動脈に狭小コイルを巻きつけることで脳血流量を通常時の 60 ~ 70% 程度に抑制し、低還流状態を作製する。(Stroke 2004; 35: 2598-2603) 11-13 週齢の雄性 C57/BL6 マウス頸動脈に狭小コイルを装着し、7, 14, 28 日後における脳での酸化ストレスおよび炎症性サイトカイン (Interleukin-6, 高感度 CRP 等)、各種トランスポーター (LAT1 のほか glucose transporter, serotonin transporter, taurine transporter, organic cation transporter) の発現を検討することで

Blood-Brain-Barrier の傷害程度を評価する。

(2)低還流脳におけるタンパク発現

脳ホモジネートを用いた western blotting、病理切片を作製して免疫染色を行う。

(3)認知障害・行動障害評価

コイル装着 28 日後の object recognition test と Y maze test、その他行動観察を随時行う。

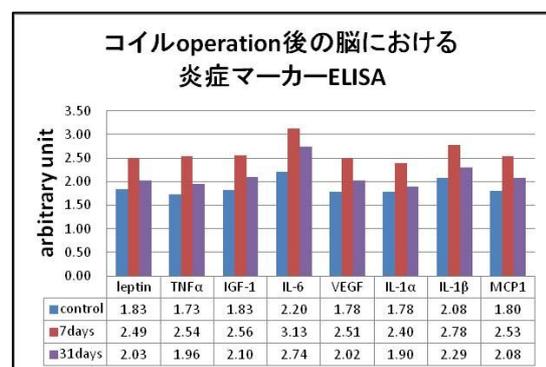
(4)皮質下病変の病理学的検討

病理切片を作製後、Luxol Fast Blue 染色によって髄鞘を染め、鏡検しスコア化することで脱髄の程度を評価する。

4. 研究成果

(1)マウス慢性脳低還流モデルの作製と傷害評価

11-13 週齢の雄性 C57/BL6 マウス頸動脈に狭小コイルを装着しマウス低還流状態を誘導、7, 14, 28 日後における脳での酸化ストレスおよび炎症性サイトカイン (Interleukin-6, TNF 等) の発現を、脳ホモジネートを用いた ELISA にて検討した。術後 7 日で脳内の炎症マーカー発現は非傷害脳に比べて上昇していた。



(2)低還流脳におけるタンパク発現

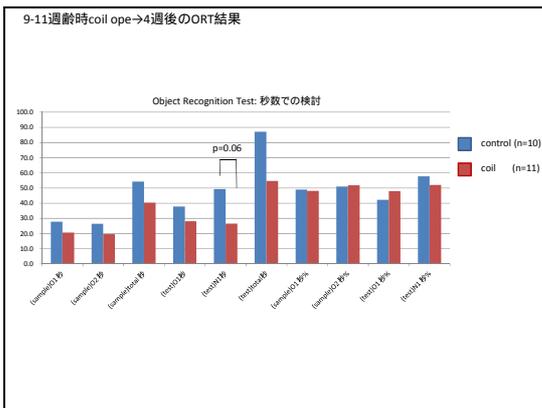
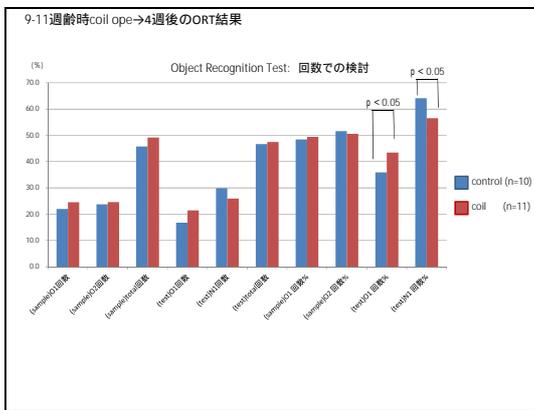
脳ホモジネートを用いた western blotting、病理切片を作製して免疫染色を行う。

(3)認知障害・行動障害評価

コイル装着後の行動変化として学習記憶試験および行動観察を行った。

< 学習記憶試験項目 >

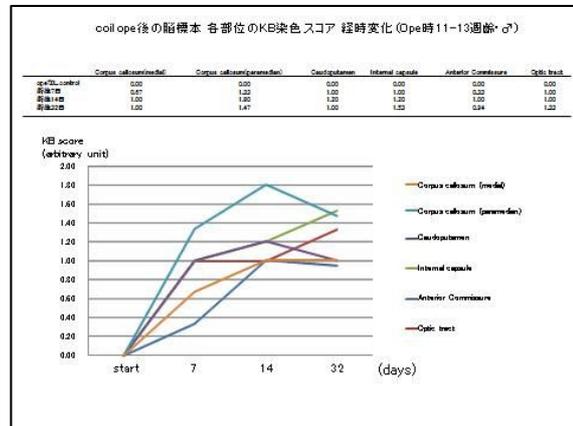
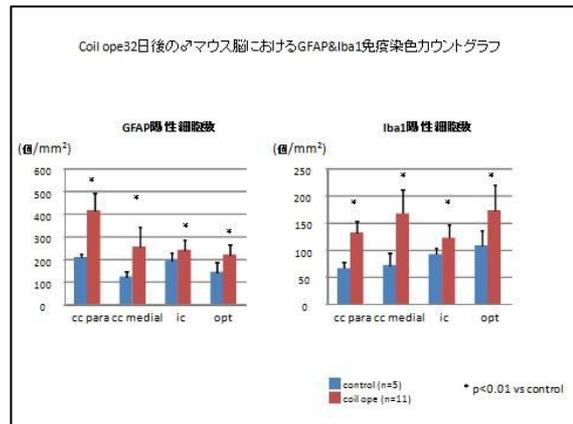
Object recognition test(新奇物体認識試験): 9 ~ 11 週齢の雄性マウスに対してコイル装着後 28 日目から 32 日目にかけて学習記憶試験として新奇物体認識試験を行った。test phase において非傷害コントロールマウス (n=10) に比べてコイル装着マウス (n=11) は新奇物体に興味を示さず (p=0.06)、オブジェクトへの総探索回数も少なかった (p=0.03)。すなわち、狭小コイル装着による慢性脳低還流状態で、若年マウスでは探索嗜好性や記憶力が低下していた。



(4)皮質下病変の病理学的検討

術後脳を摘出し、パラフィン切片作製後に脳標本を鏡検すると、7, 14, 28 日後と経時的に脳梁などにおいて Glial Fibrillary Acidic Protein(GFAP)免疫染色強陽性を呈した。これは非傷害脳と比べて顕著であった。また Luxol Fast Blue 染色を行うと、28 日後には脱髄によって示される大脳白質病変が脳梁、内包、線条体などで認めら

れた。病変の程度をスコア化し脱髄の程度を評価したところ、経時的に傷害スコアが上昇していた。すなわち、低還流脳では炎症マーカーが誘導され、アストロサイトやミクログリアの活性化を引き起こし、虚血病変が形成されることを確認した。なおトランスポーターの発言を確認するため LAT1,2 その他の免疫染色を行ったが、これまでに良好な染色結果が得られておらず、今後の検討課題である。

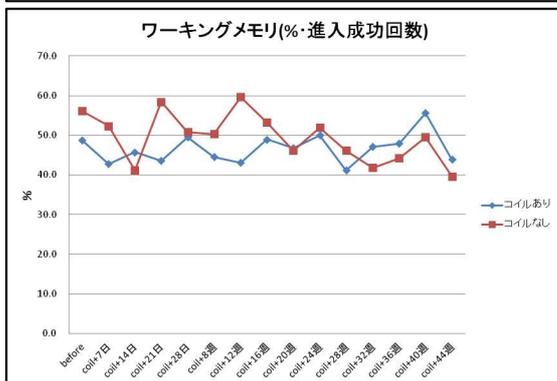


(5)慢性低還流による行動変化に対する加齢の影響

12 週齢の C57BL/6 マウス（雄性）の両側頸動脈に狭小コイルを巻き付け、脳低還流状態を誘導した。術前および術後 4 週間毎に Y maze test を施行し、自発行動量の評価およびワーキングメモリの評価を行った。さらに手術より 1 年経過した時点で学習記憶試験として新奇物体認識試験を施行した。

その結果、Y maze test において、コイル非装着マウスでは試験を実施する回数が進むに従って自発行動量が減少し、迷路に対する興味や意欲が薄れてきたのに対し、コイル装着マウスでは自発行動量の低下は認められなかった。一方、進入成功回数により表わされるワーキングメモリには統計学的な有意差は認められなかった。コイル非装着マウスで自発行動量が低下したのは、試験を繰り返すことによる学習効果のためと考えられる。しかしコイル装着術を受け、慢性脳低還流状態にある高齢マウスでは、長期にわたる継続的な刺激に対して順応しづらいことがわかった。

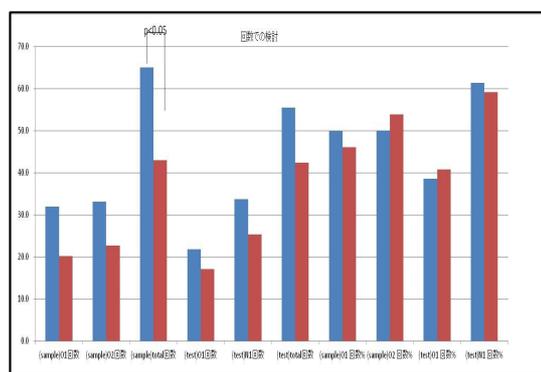
< 雄性 C57BL/6 マウスにおける検討 >



術後 1 年時点 (65 週齢) における新奇物体認識試験においては、sample phase 時

の総探索回数がコイル非装着マウスと比べてコイル装着マウスで有意に低かった (65 回 vs 43 回, $p=0.02$)。しかし test phase において新規オブジェクトを認識する割合には両群間で有意差は認められなかった。すなわち、慢性脳低還流状態にある高齢マウスでは、新規事案に対する意欲が低下するものの、短時記憶は保たれていた。

新奇物体に対する興味や意欲が低下するという事象は若年マウスでもみられており、これはヒトにおける大脳皮質下病変保有患者でうつ状態にある頻度が高いこととも合致した。

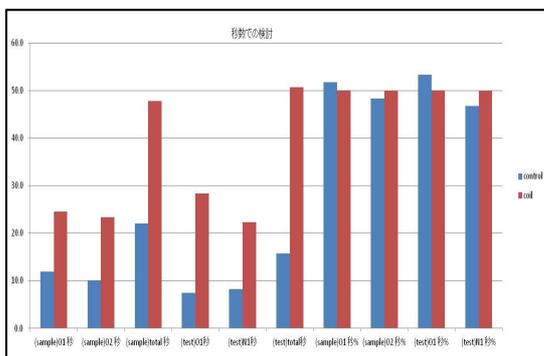


(6) 慢性低還流による行動変化に対する性別の影響

上記は雄マウスでの検討であるが、同様の検討を雌マウスに対しても実施した。コイル装着の有無による Y maze test の結果の相違は認められなかった。一方加齢雌性マウスに対する Object recognition test ではコイル装着群で有意に sample phase および test phase の総探索時間が長かった。

11-13 週齢の若年雌性マウスにコイル装着した際の結果と比較すると、若年雌性マウスでは慢性低還流によって意欲が低下したのに対し、加齢雌性マウスではコイル装着マウスの方がむしろ意欲が高いという結果であった。しかし全般に落ち着きのない行動であったことから、加齢雌性マウスでは低還流によってむしろ意欲の向上ではなく脱抑制、あるいは易不安性が亢進していた可能性も考えられる。

< 加齢雌性マウスでの新奇物体認識試験 >



以上の行動変化はヒトにおける滞納白質病変を持つ高齢者の臨床的症候と合致すると考えられた。病理学的な検討は今後さらに進めていきたい。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

神崎 恒一 (KOZAKI KOICHI)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：80272540

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

永井 久美子 (NAGAI KUMIKO)

杏林大学・医学部・実験助手

研究者番号：60398592