

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861162

研究課題名(和文)脳微小循環障害時の血栓形成におけるangiotensinの役割についての検討

研究課題名(英文)Role of angiotensin in thrombus formation by laser-induced cerebrovascular injury

研究代表者

丸山 元(MARUYAMA, Hajime)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：00646680

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：レーザー照射による血栓作成装置を用いてangiotensin type 1(AT1)およびtype 2(AT2)受容体が血栓形成に及ぼす影響をin vivoで定量評価可能であった。AT1受容体ノックアウトマウスでは血栓形成は抑制されたが、AT2受容体ノックアウトマウスでは血栓形成は亢進しており、AT1およびAT2受容体の血栓形成に関する働き的一端を生体用蛍光顕微鏡を用いてリアルタイムに確認することができた。

研究成果の概要(英文)：Observation of thrombus formation after laser irradiation of murine pial arteries showed that effects of angiotensin type 1(AT1) and type 2(AT2) receptor on the process of thrombus formation and platelet behavior could be evaluated in vivo. The present study suggested that the laser-induced thrombus formation in murine pial arteries was inhibited by AT1 receptor deficiency, and was promoted by AT2 receptor deficiency.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：脳微小循環 レーザー照射 マウス AT1受容体 AT2受容体

1. 研究開始当初の背景

Angiotensin は血管機能に大きな影響を与える分子として注目されており、主に angiotensin type 1 (AT1) および type 2 (AT2) 受容体を介した作用についての研究がなされている。

renin-angiotensin system の作用の主体となっているのは AT1 受容体であり、脳においては血管内皮細胞を含めて広く発現し、その阻害薬は種々の実験モデルにおいて脳血管機能保護に有効であることが知られている。これは AT1 受容体を阻害することで得られる「血管内皮保護作用」が、脳梗塞をはじめとする脳の病態に応用され得ることを示している。

一方、AT2 受容体は AT1 受容体に拮抗する作用を有しており、胎生後期には種々の組織で高率に発現しているが、生後は急速に減少することが知られている。脳においては血管内皮細胞など極一部でその存在が確認されているのみである。そのため、脳における AT2 の作用については未だ解明すべき点が多い。

過去の研究の多くは、実際に臨床応用されている angiotensin 受容体拮抗薬を用いての検索である。ところが、これらの薬剤は AT1 受容体と AT2 受容体の両者に影響を与えてしまう。したがって、純粋な AT1 および AT2 受容体の役割を確認するためには、AT1 および AT2 受容体のノックアウトマウスを用いての研究が望ましい。

また、これまでに報告されている実験モデルの多くは、内頸動脈や中大脳動脈で血流を遮断することで脳虚血状態を作成していた。一方、我々はレーザー照射により選択的かつ人工的に脳血管内皮を傷害し、内皮傷害部位における局所的血栓形成過程を顕微鏡直視下で観察するモデルを構築した。この内皮傷害モデルは、プラーク破綻による血管内皮傷害に類似したモデルであると考えられる。

2. 研究の目的

脳血管内皮傷害と AT1 および AT2 受容体の関連を調べることでそれぞれの役割を明らかにする。具体的には、選択的かつ人工的に脳血管内皮を傷害することで生じる血栓形成過程や脳血流障害の様子を蛍光顕微鏡下でリアルタイムに観察し、内皮傷害時に AT1 および AT2 受容体が血栓形成や脳血流に及ぼす影響を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 実験動物には、C57BL/6J マウスを背景とした AT1 受容体ノックアウトマウス、AT2 受容体ノックアウトマウス、野生型マウスを用いる。
- (2) マウスを chloral hydrate で麻酔した後、sphinx position に固定する。その際、大腿動脈にカニューレ挿入して血圧測定や動脈ガス分析用の採血ができるようにしておく。また、直腸プローブで体

温をモニターし、ヒートランプを用いて実験中の体温を 37 に保つ。

- (3) 頭皮切開にて頭蓋骨を露出させ、bregma (前項) から 1mm 後方 4mm 側方に直径 2.5mm の骨窓をドリルにて作成する。この際、硬膜は除去するものの、クモ膜および軟膜は除去しない。
- (4) 内頸静脈から carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) を注入し、血小板と血管内皮を標識する。尚、CFSE を注入しても血小板および血管内皮機能に変化はないとされている。
- (5) 生体用蛍光顕微鏡を用いて脳表の微小循環を観察しながら、血栓作成装置 (TS-KL/S2; Sankei, 1000mA, 9.8mW、diode-pumped solidstate laser 532 nm) から脳表の細動脈 (脳軟膜動脈) にレーザーを 4 秒間照射する。
- (6) 生体用蛍光顕微鏡にてリアルタイム直視下で野生型 C57BL/6J マウス、AT1 受容体ノックアウトマウス、AT2 受容体ノックアウトマウスにおける血栓形成過程を観察する。レーザー照射した脳軟膜動脈の完全閉塞率 (照射後に血栓が増大し血流が完全に遮断される割合)、レーザー照射 30 分後の照射部位における残存血栓の面積 (画像処理ソフトの Image J を使用して計測) を比較検討する。

4. 研究成果

(1) 血栓形成過程の観察

レーザー照射による血栓作成装置を用いて AT1 および AT2 受容体が血栓形成に及ぼす影響を in vivo で定量評価可能であった。

野生型 C57BL/6J マウスにおける血栓形成過程の一例を図 1~8 に示す。脳軟膜動脈にレーザー照射すると徐々に血栓が形成され、照射 30 分後にも血栓が残存している。

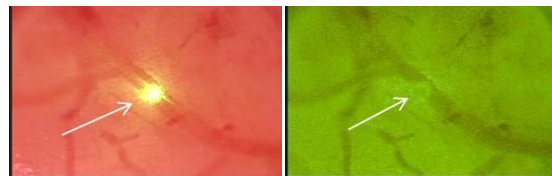


図 1 レーザー照射 図 2 照射 10 秒後

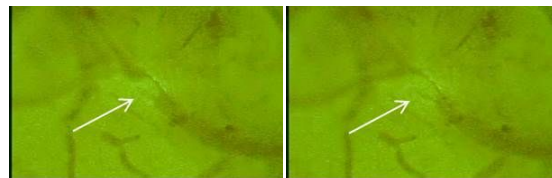


図 3 照射 20 秒後 図 4 照射 30 秒後

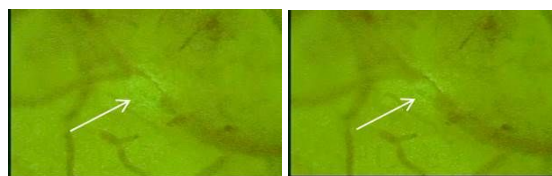


図 5 照射 40 秒後 図 6 照射 50 秒後

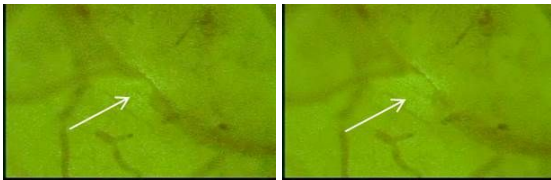


図7 照射 60 秒後 図8 照射 30 秒後

AT1 受容体ノックアウトマウスの血栓形成過程の一例を図 9~16 に示す。脳軟膜動脈にレーザー照射すると徐々に血栓が形成されるが、照射 30 秒後に血栓はほとんど見られなくなり、その後も血栓は形成されることなく経過している。

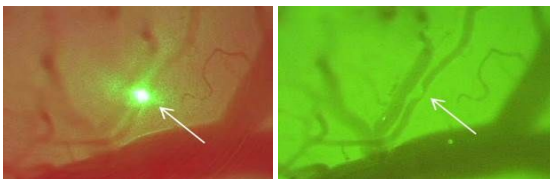


図9 レーザー照射 図10 照射 10 秒後

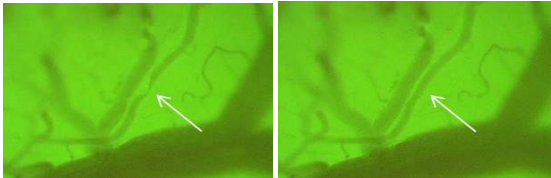


図11 照射 20 秒後 図12 照射 30 秒後

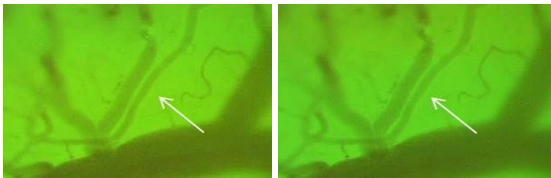


図13 照射 40 秒後 図14 照射 50 秒後

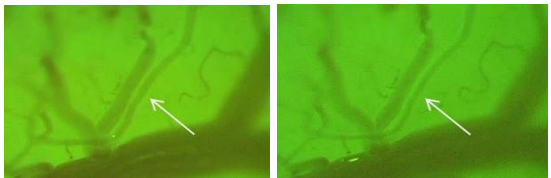


図15 照射 60 秒後 図16 照射 30 分後

AT2 受容体ノックアウトマウスの血栓形成過程の一例を図 17~24 に示す。脳軟膜動脈にレーザー照射すると徐々に血栓が形成され、照射 10 秒後に血管は完全閉塞している。その後も血管は再開通することなく完全閉塞の状態を経過し、照射 30 分後にも血栓が残存している。

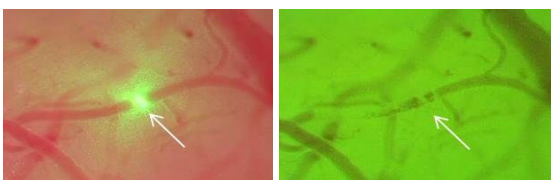


図17 レーザー照射 図18 照射 10 秒後

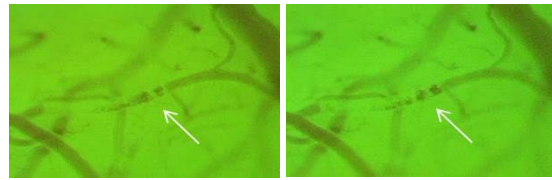


図19 照射 20 秒後 図20 照射 30 秒後

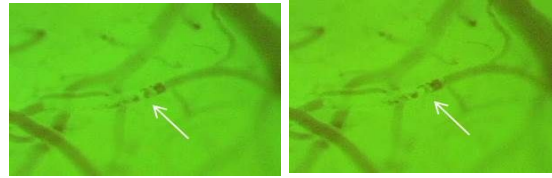


図21 照射 50 秒後 図22 照射 60 秒後

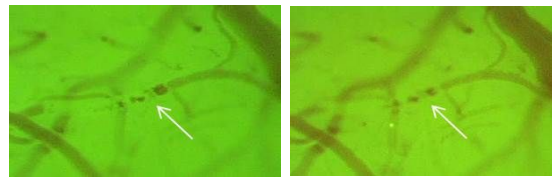


図23 照射 60 秒後 図24 照射 30 分後

(2)完全閉塞率

レーザー照射による脳軟膜動脈内皮傷害時の血管完全閉塞率は、AT1 受容体ノックアウトマウスでは野生型 C57BL/6J マウスよりも有意に低く、AT2 受容体ノックアウトマウスでは野生型 C57BL/6J マウスと有意差はなかった。

(3) レーザー照射 30 分後の残存血栓面積

レーザー照射 30 分後の脳軟膜動脈内皮傷害部位における残存血栓面積は、AT1 受容体ノックアウトマウスでは野生型 C57 BL/6J マウスよりも有意に小さく、AT2 受容体ノックアウトマウスでは野生型 C57BL/6J マウスよりも有意に大きかった。

今回の研究において、血管内皮傷害時に AT1 受容体ノックアウトマウスでは血栓形成が抑制されるが、AT2 受容体ノックアウトマウスでは血栓形成は抑制されず、むしろ亢進することが示された。AT1 受容体が刺激されると、一酸化窒素の産生減少を介してプロスタサイクリンの合成抑制やトロンボキサン A2 の産生増加が誘導され、その結果、血小板の凝集が促進することが知られている。また、血管傷害や脳虚血が生じると AT2 受容体の発現が増加し、AT2 受容体が刺激されると血管内皮細胞における一酸化窒素の産生を増加させて血小板の粘着・凝集を抑制することで抗血栓作用を発揮すると言われている。したがって、AT1 受容体ノックアウトマウスでは血管傷害時に AT1 受容体を介した作用が働かず血栓形成が抑制され、AT2 受容体ノックアウトマウスでは、血管傷害時に AT2 受容体を介した抗血栓作用が働かず、血栓面積が大きくなったと考えられる。

今回の研究で用いた実験モデルは血管内皮傷害から血栓が形成される過程をリアル

タイムで観察できるだけでなく、血栓形成に関する定量的な評価も可能である。したがって、今回の実験モデルを用いることで他のモデルマウスや各種薬剤でも血栓形成との関係を調べる際に有用性が期待できる。

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 1 件)

Fukuoka T, Hayashi T, Hirayama M, Maruyama H, Mogi M, Horiuchi M, Takao M, Tanahashi N. Platelet-endothelial cell interaction in brain microvessels of angiotensin II type-2 receptor knockout mice following transient bilateral common carotid artery occlusion. J Thromb Thrombolysis. 査読有. Volume 4, Issue 4, 2015, pp401-405. doi: 10.1007/s11239-015-1254-y.

[学会発表](計 1 件)

Maruyama H, Fukuoka T, Hayashi T, Hirayama M, Takao M, Tanahashi N. Laser-induced thrombus formation in angiotensin type 1 and type 2 receptor-knockout murine brain microvasculature observed on intravital fluorescence microscopy. 10th World Congress for Microcirculation. Sep.26.2015. 国立京都国際会館(京都府・京都市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

丸山 元 (MARUYAMA, Hajime)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：00646680