

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462206

研究課題名(和文) 大脳白質障害が及ぼす脳機能障害の病態解明と治療法開発のための基盤研究

研究課題名(英文) Fundamental study for pathophysiology of brain dysfunction and development of therapy in the rat model with white matter injury

研究代表者

今井 英明 (Imai, Hideaki)

東京大学・医学部附属病院・特任講師

研究者番号：70359587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：大脳白質障害の病態解明と治療法の開発を目的として、エンドセリン局所注入によるラット大脳白質モデルの手技を検証し最適化した。多角的に病態を評価し、ラクナ梗塞に近似した形態変化を示すことが判明した。本動物実験モデルの応用モデルとして、ストレス負荷による表現型を解析した。本モデルラットは、拘束ストレスを加えることにより、うつ様症状の一端を呈することが判明した。臨床現場にて仮説とされた大脳白質病変とストレス脆弱性の関連性が示唆された。さらに本モデルラットを用いて、新たな治療法として脳血管内皮細胞移植による白質障害の治療効果を検証した。MRIにより同一個体にて細胞移植による梗塞巣の縮小効果を確認した。

研究成果の概要(英文)：The model of rat white matter injury by stereotaxic injection of endothelin into internal capsule was evaluated and optimized in order to elucidate the pathophysiology of cerebral white matter disorders and develop therapeutic methods. After having evaluated the lesions comprehensively, we found morphological changes similar to lacunar infarct. Initially, we have applied restraint stress to the rat model for the induction of a psychological disorder corresponding to depression in this experimental animal. The rat model was found to present elements of "depressive" behavior, suggesting the association between cerebral white matter lesions and stress-vulnerability, a finding that may have clinical significance. Next, using this rat model, the therapeutic efficacy of brain microvascular endothelial cells (MVECs) transplantation for white matter disorders was examined in the same animals by MRI follow-up. We have confirmed the reduction of the lesion by the cell transplantation therapy.

研究分野：脳神経外科

キーワード：大脳白質障害 病態解明 ストレス脆弱性 うつ 細胞移植 再生 脳血管内皮細胞 エンドセリン

### 1. 研究開始当初の背景

大脳白質障害は、脳梗塞をはじめとして、脳腫瘍、外傷など脳外科的疾患と密接な関係がある。また高齢化社会において喫緊課題であるアルツハイマー病や老人性痴呆症、多発性硬化症などの変性疾患との関連も指摘されている。さらに現代社会において、大脳白質障害が、ストレス脆弱性を惹起するためうつ病との関連も示唆されており、白質障害の病態解明の重要性が認識されてきている。これら種々の白質障害疾患に対応すべく、新たな治療法の開発を目的として、白質障害における、局所的病態の解明と脳機能障害(運動麻痺)評価と、その投射関連の大脳皮質細胞体(白質障害と関連する細胞体(灰白質))への影響による脳機能障害(認知機能、うつ症状など)の病態解明をおこない、細胞移植による白質障害の機能を改善させる治療法の開発を目指す。

### 2. 研究の目的

大脳白質障害による脳機能障害の病態解明とその治療法の開発を目的とする。細胞移植による再生医療への可能性を探るための方法論を確立するための動物モデルにおける基礎研究を行う。

(1) 大脳白質障害を再現できるラット選択的白質障害モデルを作成する。(2) 局所的病態の解明と脳機能障害(運動麻痺など)評価する。(3) その投射関連の大脳皮質細胞体(白質障害と関連する細胞体:灰白質)への影響による脳機能障害(認知機能、うつ症状など)の病態解明をおこなう。(4) 白質障害とそれに関連する神経細胞体(皮質)の病態における脳機能障害の表原型モデル(拘束ストレスによるうつ症状モデル)となりうるかどうか検証する。(5) 白質障害に対する治療法の開発を目的に細胞移植による病態改善と脳機能改善の効果を評価する。

### 3. 研究の方法

【 】選択的白質梗塞(ラット白質脳梗塞)モデル作成と局所および関連部位(神経細胞体)における多角的病態評価

(A) 大脳白質障害における局所的な病態解明

(1) ラット内包障害モデルの作成:ラット大脳白質(内包)へ定位的にエンドセリンを注入し(血管収縮により)選択的な白質梗塞を作成する。合併症を最小限にし、再現性を向上させるための最適化を図る。

(2) 組織・形態学的評価を行う。H&E 染色、免疫組織染色により軸索、髄鞘、オリゴデンドロサイト、アストロサイト、血管の障害、浮腫について評価を行う。

(3) 白質障害の神経解剖学的部位の同定と体積評価を行う。

【 】大脳白質障害における脳機能障害の評

価

(A) 行動(運動・感覚)を制御するシステムに関して、皮質脊髄路が障害された場合の運動機能評価を行う。

(B) 情動反応や覚醒状態を調節するシステム(大脳辺縁系、脳幹網様体賦活系などの高次脳機能)に関して評価を行う。具体的には白質障害に拘束ストレスを加えたうつ病モデルによる評価系を用いる。

【 】大脳白質障害に対する細胞移植による治療法の開発

(A) 脳血管内皮細胞を内包障害部位に移植する。

初代培養系の脳血管内皮細胞移植による実験を行う。移植細胞は、GFP(green fluorescence protein)ラット大脳から微小血管内皮細胞の分離をし、培養した細胞を用いる(GFP 移植細胞はホスト脳においてその細胞が明確に区別できる)。これらの細胞を内包梗塞部位に定位的に移植して、経時的に白質障害を評価する。移植による治療効果を経時的に同一個体で追跡するために MR を用いる。

(B) 白質障害治療効果の検証する再生の評価をおこない細胞移植治療による効果を確認する。移植細胞治療により白質(軸索および髄鞘)再生および脳機能障害の改善を多角的に評価する。

### 4. 研究成果

【 】選択的白質梗塞(ラット白質脳梗塞)

(A) 大脳白質障害における局所的な病態解明

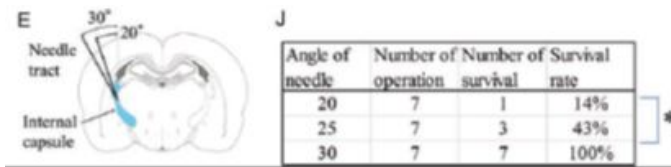
(1) モデル動物作成手法の最適化

先行課題にてエンドセリンの局所注入により内包に選択的に白質障害を作成することは判明していたが、その再現性と合併症には課題があった。ある一定の確率で呼吸不全により致命的な合併症を呈した。

そこで再現性の向上と合併症の回避を目的としてまず本モデルの最適化を行った。予備実験にて侵入経路が側脳室を通過することがあり、この場合にエンドセリンが脳室へ漏れ出ることにより呼吸不全等の合併症を呈することが判明した。

穿刺針の角度を変えることによりラットの手術後1週間の生存率は変化した。穿刺針の角度が20度の時の生存率は14%、25度の時は43%、そして30度の時は100%であった。死亡したラットは、全て術後1時間以内であり、一度しっかりと覚醒したラットは1週間後まで生存した。結果を表に示す。角度を30度にて手術を行った時の生存率は、20度の時と比較して有意差を持って高かった(図1論文1より)。

図 1

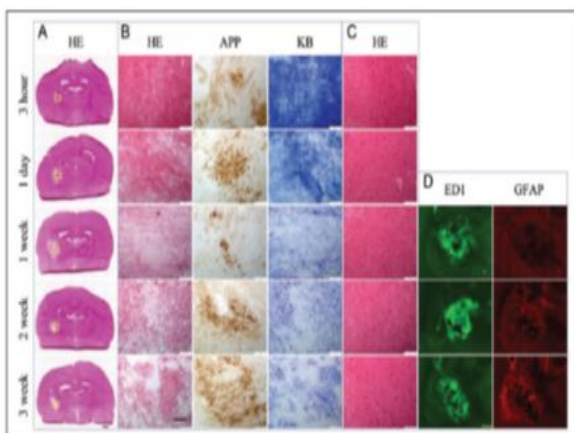


(2) 組織病理学的評価

細胞体の形態学的変化や白質の髄鞘の変化を観察するために Hematoxylin and eosin (HE) 染色、Kluver-Barrera (KB) 染色を施行した。さらに軸索障害、炎症反応、グリア瘢痕を評価するためにそれぞれ、アミロイド前駆蛋白 (Amyloid precursor protein; APP)、ED1、グリア線維性酸性蛋白 (Glial fibrillary acidic protein; GFAP) の免疫染色を行った結果を図 2 (論文 1 より) に示す。

HE 染色では、エンドセリン注入後 3 時間で、損傷部の染色性が対側と比較して減弱し始め、経時的に空胞化が顕在化した。軸索障害を検出する APP 免疫染色では、エンドセリン注入後 3 時間 (超急性期) で、神経軸索に免疫反応陽性を認め、この所見は弱拡大でも検知可能なほど顕著であった。それ以降の時間帯における観察では、これらの免疫陽性の軸索損傷部位は 3 週間まで持続した。髄鞘を染める KB 染色では、正常側白質である内包の染色性がより明瞭である一方、エンドセリン注入側では、損傷した髄鞘の染色性が経時的に減弱し、ミエリンの空胞化もみられた。活性化マイクログリアのマーカーである ED1 抗体陽性細胞はエンドセリン注入直後の急性期には見られなかったが、注入後 1 週間から 3 週間 (亜急性期から慢性期) で組織障害部位に集積し、2 週間の時点で最も多く集積した。さらにこの炎症細胞集積部位においては、注入後 2 週の時点から、GFAP 免疫染色陽性細胞が病変の周囲の領域に認められた。反応性のグリア形成が確認できた。

図 2



(3) 白質病変の体積

今回作製した病変は吻側から尾側に約 1.5mm にわたっており、白質病変の体積は  $1.83 \pm 0.29 \text{ mm}^3$  (平均  $\pm$  標準偏差) であった。実際の病変の広がりを図 3 (論文 1 より) に示す。限局した病変であることを確認した。

図 3



(4) 大脳白質 (軸索) おける関連 (投射) 部位の神経細胞体 (灰白質) での病態を解明する。

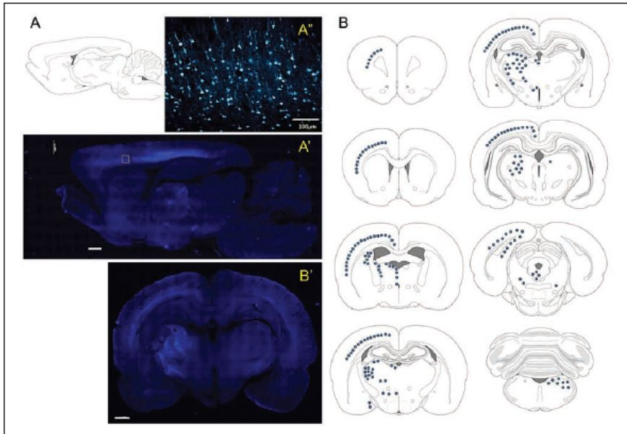
エンドセリンによる障害部位 (内包) に Fluoro-Gold (FG) を注入して軸索を逆光させて内包を通過する軸索のもとになる神経細胞体を逆行性に標識した。

大脳皮質、大脳基底核、扁桃核、視床、脳梁、海馬、小脳のスライドを図 4 (論文 1 より) に示す。FG は障害された内包の同側の大脳皮質 (運動野など) 基底核や視床に広く分布し、扁桃核や脳幹にも分布した。さらに対側の小脳脚や脳幹神経核にも一部分布した。一方、視床下部、海馬や嗅球には分布しなかった。

内包を通過する軸索 (白質繊維) としては皮質脊髓路だけでなく、大脳基底核への連絡路としても内包が関与していることがわかった。



図 4



#### 【 A 】 大脳白質障害における脳機能障害の評価

(A) 皮質脊髄路が障害された場合の運動機能評価を行う。

神経学的評価として、ladder test により運動機能の評価を行った。本実験では、大脳白質病変を作製した群において、手術前と比較し手術後 1 日の時点で病巣の対側下肢の運動機能が低下する結果が得られた。この運動機能の低下は手術後 3 日の時点では改善した。

本動物実験モデルの特徴として、内包の障害だけでは手術後早期に運動機能の低下をきたすが、その後は改善し明らかな左右差を認めない、すなわち運動機能障害は一時的で軽微なものであると言える。内包を中心とした白質病変では、感度の高い運動機能評価法を用いない限り運動機能の障害は認められない。

(B) 情動反応や覚醒状態を調節するシステム（大脳辺縁系、脳幹網様体賦活系など高次脳機能に関して評価を行う。具体的には白質障害に拘束ストレスを加えた。うつ病症状を呈するかどうか評価した。

本実験において作製したラット大脳白質病変モデルの特徴として、内包障害だけでは手術後数日から運動機能において明らかな異常所見は認めない。しかし、組織学的には大脳白質である内包において軸索と髄鞘が明らかに障害されており、さらにその軸索が障害された細胞体の存在は、前頭葉だけでなく大脳基底に広く分布することが判明した。以上の所見より、本ラットモデルは年齢的には高齢ではないが、病理組織所見、神経所見からは、大脳白質病変を持つ中高年患者の一病態（内在するストレス脆弱性：臨床からの仮説）の疑似モデルとなりうるかどうかを検証した。

ストレス負荷にはいくつかの種類があるが、今回我々は 1 日 2 時間の拘束ストレスを選択した。ラクナ梗塞 2 週間後から 1 日 2 時間

13 日間の拘束ストレスを行う群と行わない群を作成し、白質病変・ストレスの有無により 4 群に分けた。体重変化、行動試験、採血により評価を行った。

結果として最も顕著は症状として、対照群と比較して体重増加が著しく鈍化していることが認められた。体重増加の鈍化をうつ症状（食欲減退）の一つの指標とすると、結果は明確である。4 群間で比較すると、拘束ストレスだけで体重増加が鈍化することが明らかであり、かつ白質病変という器質的異常が存在することによりさらにこの現象が顕在化していた。体重増加の鈍化（おそらく食欲減衰に起因すると推測される）という症状でみるとうつ病症状の一側面を表している可能性がある。さらにうつ病症状の評価バッテリーである強制水泳試験の結果では、白質病変有り・拘束ストレス有りの群において、白質病変無し・拘束ストレス無しの群と比較すると、統計学的に有意差をもって無動時間の延長が認められた。うつ病の動物実験において、体重変化と強制水泳無動時間はうつ状態を示している指標として使われる。本実験においてもこれらに変化を認め、大脳白質病変と拘束ストレスにより、うつ状態の一面を表していると考えた。

#### 【 B 】 大脳白質障害に対する細胞移植による治療法の開発 大脳白質障害に対する移植細胞治療による治療法を開発する

先行する科研費申請課題では、神経軸索の再生を目的として、ラット選択的白質梗塞モデルを用いて血管内皮細胞移植による治療効果を検証した。血管内皮細胞（MVECs）移植により、ラクナ梗塞後の炎症細胞の活性化が抑制されること、さらにミエリンの再生が確認され、これに伴い運動機能が改善することを病理組織学的に報告した（Puentes S, et al, Brain Res. 2012 21; 1469: 43-53）。これは、研究手法の限界のために同一個体で治療効果を示すことはできなかった。

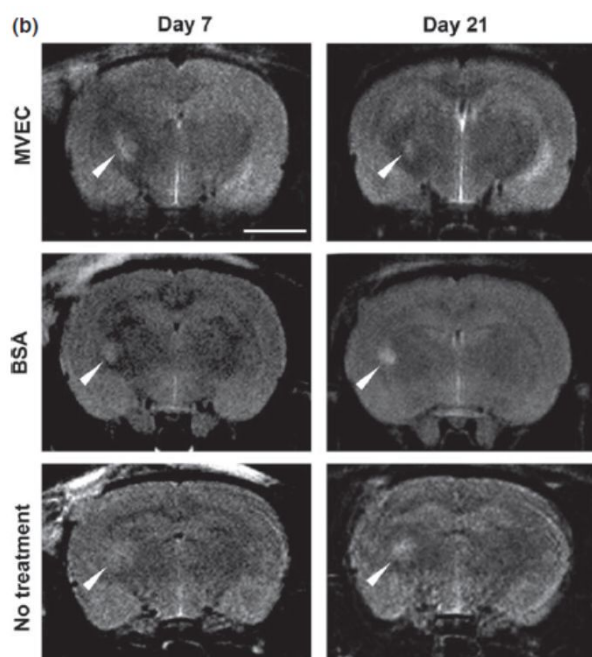
今回の科研費申請課題では、同一個体における脳梗塞巣の病変体積変化を解析するために小動物用 MRI を用いた。ラクナ梗塞後 7 日目に MVECs を内包に移植した。コントロールとしてウシ血清アルブミンを用いた。移植直前と移植後 7, 21 日目に MRI を撮影し、病変体積を計測し経時的体積変化を評価した（図 5 論文 6 より）。

MVECs 移植群はコントロール群と比較し、MRI T2 高信号病変の体積の有意な縮小を認めた。

さらに、血管内皮細胞移植（MVECs）による治療効果が、移植細胞からの分泌因子（エクソソーム）によりオリゴデンドロサイト前駆細胞（OPCs）への生存・増殖調節によることを明らかにした。細胞移植からの神経栄養因子による大脳白質障害における軸索再

生の可能性を示した。

図 5



#### 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 10 件)

1. Ono H, H Imai, Miyawaki S, Nakatomi H, Saito N. Rat white matter injury model induced by endothelin-1 injection: technical modification and pathological evaluation. **Acta Neurobiol Exp (Wars)**. 76(3):212-24. 2016
2. Imai H, Watanabe K, Miyagishima T, Yoshimoto Y, Kin T, Nakatomi H, Saito N. The outcome of a surgical protocol based on ischemia overprotection in large and giant aneurysms of the anterior cerebral circulation. **Neurosurg Rev**. 39(3):505-17. 2016
3. S. Miyawaki, H. Imai, T. Hayasaka, N. Masaki, H. Ono, T. Ochi, A. Ito, H. Nakatomi, M. Setou, N. Saito. Imaging mass spectrometry detects dynamic changes of phosphatidylcholine in rat hippocampal CA1 after transient global ischemia. **Neuroscience** 322: 66-77. 2016
4. Ochi T, Nakatomi H, Ito A, Imai H, Okabe S, Saito N. Temporal changes in the response of SVZ neural stem cells to intraventricular administration of growth factors. **Brain Res**. 1636:118-29. 2016
5. H Imai, S Miyawaki, H Ono, H Nakatomi, Y Yoshimoto, N Saito. The Importance of Encephalo- Myo- Synangiosis in Surgical Revascularization Strategies for Moyamoya Disease in Children and Adults. **World Neurosurg**; 83(5):691-9. 2015
6. Iijima K, Kurachi M, Shibasaki K, Naruse M, Puentes S, Imai H, Yoshimoto Y, Mikuni M, Ishizaki Y. Transplanted microvascular endothelial cells promote oligodendrocyte precursor cell survival in ischemic demyelinating lesions. **J Neurochem**. 135(3):539-50. 2015
7. S Miyawaki, H Imai, M Shimizu, S Yagi, H Ono, H Nakatomi, T Shimizu, N Saito. Genetic Analysis of RNF213 c.14576G>A Variant in Non-atherosclerotic Quasi-Moyamoya Disease. **J Stroke Cerebrovasc Dis** 24(5):1075-9. 2015.
8. Y Chen, Z Song, Y Wan, W Lin, X Hu, Y Wang, H Imai. Intermediate nerve neuralgia can be diagnosed and cured by microvascular decompression. **J Craniofac Surg**. 25:1187-9. 2014.
9. N Saito, T Kin, H Oyama, M Yoshino, D Nakagawa, M Shojima, H Imai, H Nakatomi. Surgical Simulation of Cerebrovascular Disease With Multimodal Fusion 3-Dimensional Computer Graphics. **Neurosurgery** 60:24-29. 2013
10. Miyawaki; H Imai, M Shimizu, S Yagi, H Ono, A Mukasa, H Nakatomi, T Shimizu, N Saito. Genetic Variant RNF213 c.14576G>A in Various Phenotypes of Intracranial Major Artery Stenosis/Occlusion. **Stroke** 44: 2894-2897, 2013

[学会発表](計 10 件)

1. H. Ono, H. Imai, S. Miyawaki, S. Miyata, H. Nakatomi, M. Mikuni, M. Fukuda, N. Saito. Development Of The Rat Vascular Depression Model **Brain** 2015 (Vancouver)
2. H. Imai, S. Miyawaki, H. Ono, H. Nakatomi, Y. Yoshimoto, N. Saito. Clinical Results And Analysis of Outcome Revascularization

- Pattern of Extensive Revascularization Surgery (TODAI Protocol) for Moyamoya Disease **Brain** 2015(Vancouver)
3. H Ono, H Imai, T Hayasaka, S Miyawaki, H Nakatomi, M Setou, N Saito. Imaging mass spectrometry provides the new insight into white matter injury rat model. **Neuro** 2014 (Yokohama)
  4. H Ono, H Imai, S Miyawaki, S Miyata, H Nakatomi, M Mikuni, M Fukuda, N Saito. Development of the rat depression model related to selective white matter injury. **Neuroscience** 2014 (Washington DC)
  5. H. Ono, H. Imai, S. Miyawaki, H. Horikawa, T. Ochi, A. Ito, S. Miyata, M. Kurachi, Y. Ishizaki, H. Yamagata, H. Nakatomi, M. Mikuni, N. Saito. A new rat model of stress-induced depression associated with age-related selective white matter injury. **Brain** 2013(Shanghai)
  6. H. Ono, H. Imai, T. Hayasaka, S. Miyawaki, H. Horikawa, T. Ochi, A. Ito, H. Nakatomi, M. Setou, N. Saito. Comprehensive analysis of selective white matter injury of the rat model by using imaging mass spectrometry and conventional histopathology. **Brain** 2013(Shanghai)
  7. S. Miyawaki, T. Hayasaka, H. Imai, H. Ono, H. Horikawa, T. Ochi, A. Ito, H. Nakatomi, M. Setou, N. Saito. Visualization and analysis of spatio-temporal molecular changes in hippocampus after transient global ischemia using imaging mass spectrometry. **Brain** 2013(Shanghai)
  8. S. Miyawaki, H. Imai, H. Ono, S. Takayanagi, H. Horikawa, T. Ochi, A. Ito, A. Mukasa, H. Nakatomi, N. Saito. Classifying intracranial major artery stenosis/occlusion based on the genotype of RNF213, the Susceptibility gene for moyamoya disease. **Brain** 2013 (Shanghai)
  9. H Ono, H Imai, S Miyawaki, S Miyata, Masash Kurachi, Y Ishizaki, H Nakatomi, M Mikuni, N Saito. Analysis of stress vulnerability related to selective white matter injury using rat model. **Neuro** 2013(Kyoto)
  10. H Imai, S Miyawaki, N Saito. Moyamoya disease from bed to bench and vice versa. **11th SMC Stoke Center Symposium** 2013 (Seoul)

〔図書〕(計 1 件)

1. H Imai, N Saito, M Macrae. Rat middle cerebral artery (MCA) occlusion models which involve a frontotemporal craniectomy. In: Experimental Neurosurgery in Animal Models. Neuromethods Volume 116 pp55-71. Humana Press Miroslaw Janowski (ed) 2016

〔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

今井英明 (IMAI HIDEAKI)

東京大学・医学部附属病院・特任講師

研究者番号：70359587

(2) 研究分担者

齊藤延人 (SAITO NOBUHITO)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：60262002

石崎泰樹 (ISHIZAKI YASUKI)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90183003

(3) 連携研究者

瀬藤 光利 (SETOU MITSUTOSHI)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：20302664

(4) 研究協力者

宮脇 哲 (MIYAWAKI SATORU)

小野秀明 (ONO HIDEAKI)