

平成 30 年 8 月 28 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09313

研究課題名(和文)慢性脳低灌流状態における微小脳循環調節機構の解明

研究課題名(英文)The compensatory micro circulation regulation mechanism against cerebral perfusion pressure decrease

研究代表者

矢田 健一郎(yata, kenichiro)

三重大学・医学系研究科・産学官連携研究員

研究者番号：40467361

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：頸部内頸動脈分岐部はアテローム動脈硬化の好発部位であり、その末梢灌流領域に脳梗塞を来す大きな原因となる。灌流圧低下に対する生体防御機構として、代償性脳循環調節機構が存在すると考えられているが、そのメカニズムに関しては、ほとんど知見が得られていない。そこで、今回の研究では、頸動脈狭窄病変マウスモデルを作成し、二光子顕微鏡を用いて、その代償性脳循環調節機構の解明を行った。代償性脳循環調節機構として、灌流圧低下に伴いその末梢血管で血管拡張が起きることを認めた。しかしながら、高度の灌流圧低下状態では、逆に末梢血管は収縮を起こしてしまうことが認められた。

研究成果の概要(英文)：Cervical carotid artery bifurcation is a predilection site of the atherosclerosis, which is a major cause of cerebral infarction. There is a compensatory circulation regulation mechanism against cerebral perfusion pressure decrease. However, the detail mechanism occurring under hypoperfusion condition remains poorly understood. In this study, we performed in vivo imaging for bilateral common carotid artery occlusion mouse brain using Two-photon laser-scanning microscopy. We elucidated that vasodilatation occurred with peripheral artery under mild cerebral hypoperfusion condition. However, we admitted that vasoconstriction occurred with peripheral artery under severe cerebral hypoperfusion condition.

研究分野：神経内科学

キーワード：脳灌流圧低下 代償性脳循環調節機構 二光子レーザー顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

アテローム血栓性脳梗塞は、脳を灌流する頭蓋内・外の主幹動脈のアテローム硬化を原因とする脳梗塞であり、近年、わが国でも生活様式の欧米化を反映し、このアテローム血栓性脳梗塞が増加傾向にあることが指摘されている。頸部内頸動脈分岐部はアテローム動脈硬化の好発部位であり、末梢の灌流圧低下に伴い、血行力学的に watershed infarction や脳室周囲の深部白質に terminal zone infarction を起こすことが知られている。その病態メカニズムに関しては、不明な点が多くまた確立した治療法もない。

2. 研究の目的

脳にはエネルギーを蓄えるメカニズムは存在せず、血流と代謝が常に一定になる様、脳循環調節機構（血管拡張/収縮）により厳密に血流がコントロールされている。神経細胞の活動性（代謝）亢進に伴う局所脳循環調節機構（functional hyperemia）に関しては、クリニカルレベルでの functional MRI や動物実験レベルでの各種 in vivo imaging を用いて精力的に研究が行われている。一方、狭窄性病変を原因とする低灌流状態においても代償性脳循環調節機構（脳循環予備能）が存在することが報告されている。これまでの報告結果からは、狭窄性病変に伴う低灌流状態では、狭窄部末梢の血流を少しでも維持する為に、末梢血管で代償性の血管拡張が起こると考えられている。局所脳循環調節機構に関しては、Astrocyte を介した血管拡張メカニズムが大きな役割を演じていることが報告されているが、しかしながら、脳虚血下での代償性の血管拡張下における Astrocyte の役割に関しては、ほとんど知見が得られていない。また、代償性脳循環調節機構がどこまでの灌流圧低下に対して適応できるのか、その破綻に至る灌流圧低下レベルに関しては、ほとんどわかっていない。代償性脳循環調節機

構を正確に評価することは、治療法の決定や、予後予測に重要なことであるが、臨床現場では、直接脳循環予備能を測定することは、不可能に近い。多くの場合、血管拡張性物質投与によっておこる血管反応性から、その残存血管拡張能を推定してきた。しかしながら、この血管拡張性物質による血管拡張性が、直接、生理的な代償性血管拡張能を評価しているのかどうかは、現在の所、ほとんど知見が得られていない。

低灌流状態における代償性脳循環調節機構を顕微鏡レベルで明らかにすることは、治療法の選択や治療法の開発においても重要なものである。今回の研究では、頸動脈狭窄病変マウスモデルを作成し、二光子顕微鏡を用いて、その代償性脳循環調節機構の解明を行った。

3. 研究の方法

(1) マウス頸動脈狭窄性病変モデル

両側の総頸動脈に外側から micro coil を装着させることにより頸動脈狭窄性病変を作成した（図1）。装着させる Micro coil の内径が異なるものを用いることにより、狭窄の程度を変え、灌流圧を段階的に低下させた。内径が 0.22mm、0.20 mm、0.18 mm、0.16 mm の micro coil を使用した。

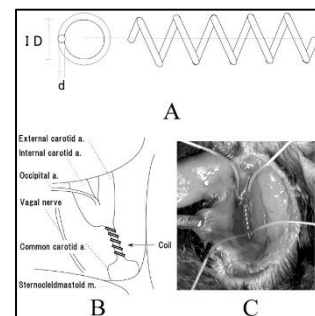


図1.慢性脳低灌流モデル

A: Micro coil

B,C: coil の装着の状態

(2) 二光子顕微鏡を用いた網羅的観察

二光子顕微鏡を用いた蛍光下での観察を行う為にグリーンマウス（c 57BL/6-Tg (CAG-EGFP)）を使用した。Sulforhodamine

101 投与にて Plasma labeling を行った。マウスの左頭頂葉に直径 4mm の cranial window を作成し、この Cranial window を通して二次元レーザー血流計と、二光子顕微鏡を用いて観察を行った。二光子顕微鏡システムは、冷却高感度 GaAsP(ガリウム砒素リン酸)検出器とレゾナントスキャナーを組み合わせるにより、より低侵襲性に高速 Scan を行える様に工夫し、脳表から脳深部 500 μ m まで volume scan を繰り返し撮影できる方法を用いた。

(3) 頸動脈狭窄性病変と脳血流・血管拡張性

各種 coil 径と末梢の血流低下の関係を明らかにする為に、coil 装着前後での血流変化を二次元レーザー血流計を用いて測定した。また、同様に、血管拡張性を明らかにする為に、coil 装着前後で二光子顕微鏡を用いて観察を行った。

(4) 脳低灌流状態における血管拡張性物質投与による血管拡張性

正常状態、各種灌流圧低下状態での血管拡張物質 (acetazolamide :ACZ) による血管の反応性を評価する為、ACZ (50mg/kg, IV) 投与前後の血流変化を二次元レーザードップラーにて測定した。同様に ACZ 投与前後の血管拡張性を二光子顕微鏡を用いて測定した。尾静脈にカテーテルを留置して、投与前から投与後までを連続した観察を行った。

(5) 慢性脳低灌流状態における Astrocyte の活性化

左頭頂葉に径 2mm の cranial window を作成し、surface apply にて Fluo4-AM を投与し Ca imaging を行った。二光子顕微鏡を用いて正常状態での観察を行い、その後、頸動脈狭窄性病変を作成して、再び、二光子顕微鏡を用いて観察を行った。

4. 研究成果

(1) マウス脳の 4 次元観察

グリーンマウスと SR101 を用いた蛍光化、高感度検出器と高速レゾナントスキャナーを用いた撮影方法により、マウス脳皮質領域をほぼ網羅的に 4 次元にて観察できる方法を確立した。高感度検出器と高速スキャナーを用いることにより、2 時間程度の連続した Volume Scan (図 2) が可能であった。

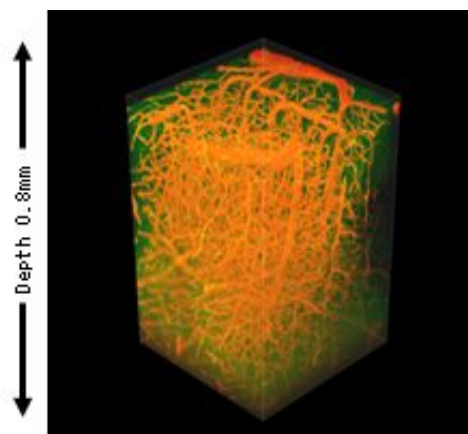


図2 Volume Data Scan

Volume Data を re-construction 処理を行うことにより、設定した volume of interest 内のすべての領域を 3 次元的に、多方向から観察することができた。3 次元処理を行うことにより、穿通動脈から、毛細血管へのつながりや、Astrocyte の end foot が毛細血管へ伸びる様子などを詳細に確認することができた (図 3)。

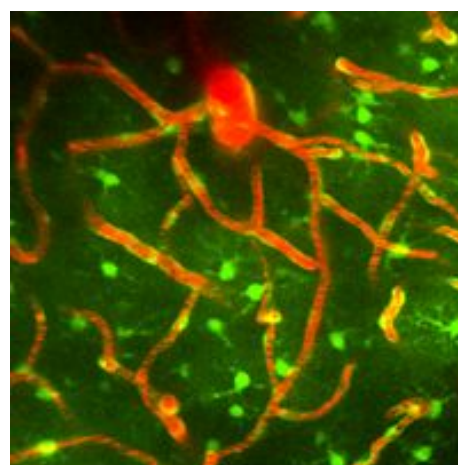


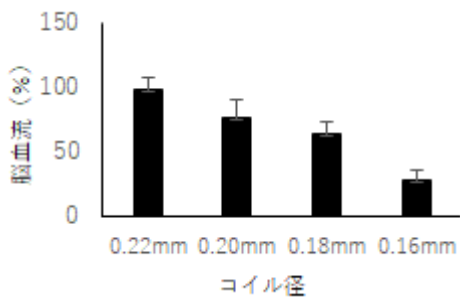
図3.脳深部の穿通動脈と毛細血管 (赤) Astrocyte (緑)

また、各 volume data すべての Time point

で re-construction 処理をさせることが可能であり、経時的に起きる軽微な形態学的変化をとらえるには最適な方法であると考えられた。

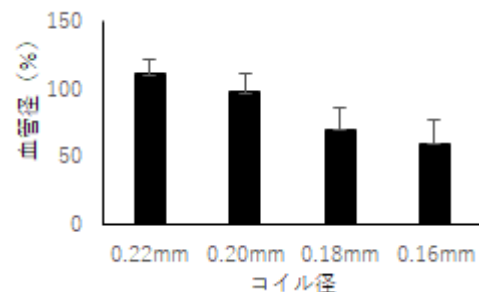
(2) 各種 micro coil と脳血流の関係

二次元レーザー血流計を用いて、各種 coil 径と血流低下の程度との関係を明らかにした。Micro coil 径が 0.22mm、0.20mm で作成した頸動脈狭窄性病変マウスでは、血流低下がほとんど見られなかった。0.16mm の Micro coil 使用マウスでは、血流低下は 50% 以下まで低下し、また、経過中に死亡するものも見られた。0.18mm 以下では、血流は維持できず、代償性脳循環予備能が破綻していると考えられた。



(3) 血流低下の程度と血管反応性

二光子レーザー顕微鏡を用いて、各種 coil 径と血管拡張性の程度との関係を明らかにした。Micro coil 径が 0.22mm、0.20mm で作成した頸動脈狭窄性病変マウスでは、代償性脳循環調節機構と考えられる血管拡張が認められた(図4)。Coil 径 0.18mm 以下のマウスでは、逆に血管収縮が起きることを認めた。代償性脳循環調節機構を超えた脳灌流圧低下状態では、もはや血管拡張機構は機能せず逆に血管は収縮してしまうことを確



認した。

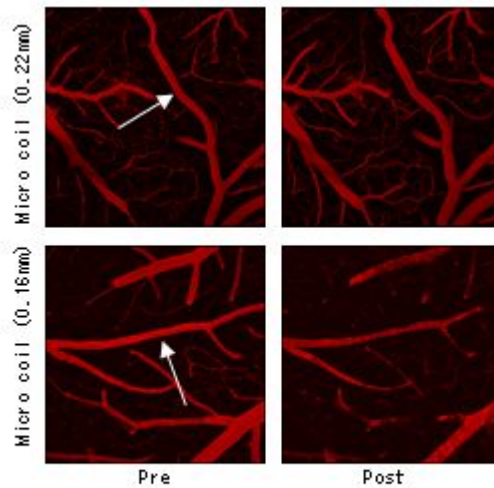
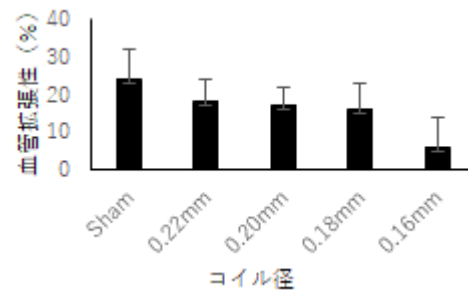


図4. 狭窄病変作成前後での血管径
上段 0.22mm coil、下段 0.16mm coil
矢印は、脳表細動脈

(4) 脳灌流圧低下状態での血管拡張物質投与に伴う血管反応性

coil 径を変えた異なる灌流圧低下状態での ACZ 投与による血管拡張性を確かめた。Sham 群と比較していずれの coil 群においても血管拡張性は不良であった。しかしながら、0.16mmcoil 使用群でさえも、わずかながら血管拡張性の反応が認められた。生理的な代償性脳循環予備能は、coil 径 0.20mm 前後で血管拡張の機能不全に陥ると考えられたが、ACZ は、生理的血管拡張を超えて、強力に血管拡張を来すことを認めた。



(5) 脳灌流圧低下状態での Astrocyte の活性化

代償性脳循環予備能における Astrocyte の活性化を確かめる為に Fluo4-AM による Ca Imaging を行った。Sham 群、Coil 群ともに、

狭窄病変作成前の観察では、カルシウム振動として Fluo4-AM の蛍光強度の動揺が Astrocyte に認められた (図 5)。また、Fluo4-AM はわずかながら、血管平滑筋にも取り込まれることを認めた。狭窄病変作成後の観察においては、0.22mmと0.20mmの coil 使用群においては、Ca 振動の状態に関して有意な変化をとらえることができなかった。0.18mmと0.16mmの Coil 使用群では、Ca 振動による蛍光強度の変動よりは、ベースとなる Astrocyte の蛍光強度が定常的に全体に亢進していることを認められた。また、血管収縮に伴い、血管平滑筋では Astrocyte の蛍光増加以上に著明な蛍光増加が認められた (図 5)。代償性脳循環予備能を超えた状態では、Astrocyte,血管平滑筋ともに細胞内 Ca の増加が認められ、異常な興奮状態にあることが認められた。

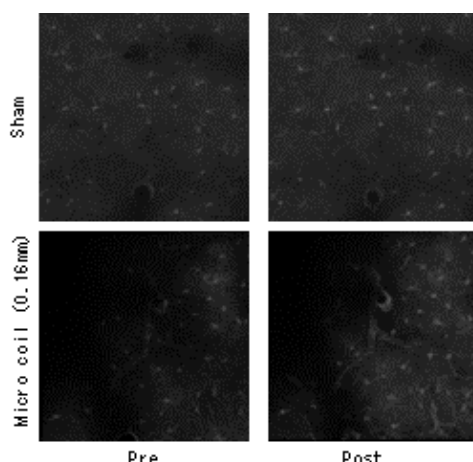


図5.狭窄病変作成前後でのFluo4-AMによるCa imaging

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 1 件)

名称：非ヒト哺乳類の脳梗塞モデルによる観察方法及び非ヒト哺乳類の脳梗塞モデルに

よる観察装置

発明者：矢田健一郎

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 **2017-158656**

出願年月日：2017年8月21日

国内外の別：国内

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〕

特許申請を予定していた為、積極的な学会発表や論文投稿を行うことができなかった。今後、論文投稿、学会発表を行う予定である。

6 . 研究組織

(1)研究代表者

矢田 健一郎 (YATA, Kenichiro)

三重大学・大学院医学系研究科・産学官連携
研究員

研究者番号：40467361

(2)研究分担者

富本 秀和 (TOMIMOTO, Hidekazu)

三重大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：80324648

及川 伸二 (OIKAWA, Sinji)

三重大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：10277006