

令和元年6月12日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09684

研究課題名(和文) 認知症疾患におけるRho-ROCKシグナルの機能解明

研究課題名(英文) Analysis of the function of Rho-ROCK signal in dementia disease

研究代表者

脇田 英明 (Wakita, Hideaki)

藤田医科大学・医学部・教授

研究者番号：80416172

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)：本研究では、認知症モデル動物脳の解析によりRho-ROCKシグナルの認知症における役割の解明を行った。血管性認知症モデルラットでは虚血性白質病変を生じる部位にROCK1、RhoB、LIM-kinase2陽性血管が増加していることを明らかにした。アルツハイマー病モデルマウスではA β 蓄積部位の海馬にROCK1、RhoB陽性血管、海馬周囲にLIM-kinase2陽性血管が増加することを明らかにした。脳表にもROCK1陽性血管を認めた。ROCK阻害剤のFasudilを血管性認知症モデルラットに投与し、ROCK1、RhoB陽性血管数の増加抑制効果と虚血性白質病変に対する保護効果を持つことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で血管性認知症におけるRho-ROCKシグナルの役割が解明され、血管性認知症における、今までにない新規の病態機序の分子メカニズムが提示された。本成果は、血管性認知症研究の発展に貢献すると考えられる。ROCK阻害剤投与により脳病変の抑止効果が認められ、血管性認知症の予防・治療法への臨床応用という点においても意義あるものとなる。また、アルツハイマー病のアミロイド排出機序とRho-ROCKシグナルの関連を解明した。本成果は、アルツハイマー病研究の発展に貢献するとともに、予防・治療法開発につながる成果でもある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we elucidated the role of Rho-ROCK signal in dementia disease by analyzing the brains of dementia model animals. In vascular dementia model rats, it was revealed that ROCK1, RhoB or LIM-kinase2 positive blood vessels were increased at the site of ischemic white matter lesions. We revealed that ROCK1 or RhoB positive blood vessels increase in hippocampus where accumulation of A β occurs, and LIM-kinase 2 positive blood vessels increase around hippocampus in Alzheimer's disease model mice. ROCK1 positive blood vessels were also found on the brain surface. The ROCK inhibitor Fasudil was administered to the rat model of vascular dementia. It was revealed that Fasudil has an inhibitory effect on the increase in the number of blood vessels with ROCK1 or RhoB positive. Fasudil has the protective effect against the ischemic white matter lesions.

研究分野：神経内科学

キーワード：血管性認知症 アルツハイマー病 Rho-kinase 認知症モデル動物 Rho LIM-kinase

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Rho-ROCK シグナルは血管平滑筋の収縮弛緩や白血球遊走、細胞接着などに関連し、近年では、脳虚血やアルツハイマー病を含む多くの神経疾患との関連が報告されている。申請者は、血管性認知症のモデル動物の慢性脳虚血モデルラット脳の病理解析で、虚血性大脳白質病変部位の脳血管に RhoB および ROCK1 が虚血導入早期から慢性期まで発現が上昇することを新たに発見した。一方、アルツハイマー病については、近年、血管周囲を経路とする アミロイド蛋白質の排出系(Perivascular drainage)についての研究に注目が集まり、血管病変による、この排出系の障害が アミロイド蛋白質の除去を低下させ、脳内アミロイドの蓄積を促進するとのメカニズムが想定されている (Weller RO et al. Acta Neuropathologica 2009)。実験的にも脳アミロイド血管症モデルマウスに慢性脳虚血を負荷すると脳アミロイド血管症が促進されることが報告されている。Perivascular drainage には血管平滑筋が重要な役割を果たしており、Rho-ROCK シグナルが血管平滑筋の収縮・弛緩に働き動脈硬化、血管攣縮に関与することと合わせて考えると、今回の慢性脳虚血による Rho-ROCK シグナルの誘導現象が脳内アミロイド排出系の中で、特に血管平滑筋に影響を及ぼし、脳内アミロイド蛋白質の蓄積に関与する可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究では研究の背景に示した慢性脳虚血と Rho-ROCK シグナルに関する研究成果を基盤として、アルツハイマー病および血管性認知症モデル動物の解析により Rho-ROCK シグナルの認知症における役割の解明を行うことを目的とする。血管性認知症モデル動物やアルツハイマー病モデル動物を用いて、病理学的・生化学的アプローチによる解析を行い、Rho-ROCK シグナルの詳細を明らかにし、Rho-ROCK シグナルのアルツハイマー病におけるアミロイド蓄積や血管性認知症の白質病変における役割の分子メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

血管性認知症のモデル動物として、ラットの両側総頸動脈永久閉塞モデルおよびマウスの片側総頸動脈の閉塞モデルを用いた。血管性認知症モデル動物の脳虚血導入 1日、3日、7日、14日、30日後の5群を作製し、それぞれの時点で安楽殺後、脳を取り出し、偽手術群を加えた6群について免疫組織化学、ウエスタンブロットを用いてRho-ROCKシグナル各構成分子の発現量の時間変化、発現部位の変化を解析した。免疫組織化学用には各群5匹の病理解析用に灌流固定をした脳のサンプルを使用した。ウエスタンブロット用には各群5匹の脳サンプルを作製した。発現部位の病理学的解析については、本モデル動物に特徴的な大脳白質病変、神経線維脱落を認める脳梁、内包、線条体白質、視索と海馬および本モデルでは病変が認められない大脳皮質を中心に病理学的解析を行った。免疫組織標本に対する画像解析を用いて、陽性血管密度を計測する半定量的方法で空間的、時間的な変化を評価することも合わせて行った。Rho-ROCKシグナルの時間的・空間的プロファイリングの解析に加え、Rho-ROCKシグナルの下流のエフェクター分子のMLCやLIM-kinase等の時間的・空間的プロファイリングの解析も行った。さらに、代表的なROCK阻害剤のFasudilを血管性認知症モデル動物に投与し、虚血性大脳白質病変やRho-ROCKシグナルに対する効果を検討した。

アルツハイマー病モデル動物については、脳アミロイド沈着前と沈着後での Rho-ROCK シグナル各構成分子の時間変化、発現部位の変化を明らかにした。免疫組織化学を用いて、アミロイド沈着部位の大脳皮質や海馬での Rho-ROCK シグナルやエフェクター分子の時間的・空間的プロファイリングの解明を行った。

4. 研究成果

1) 血管性認知症のモデル動物脳におけるRho-ROCKシグナルの時間的・空間的プロファイリング

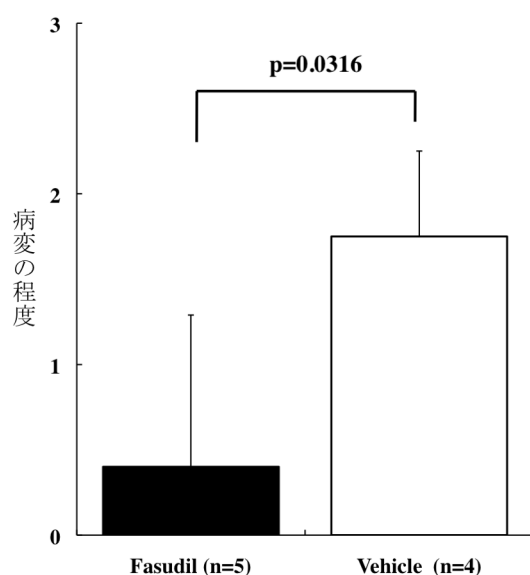
血管性認知症モデルラット脳において、虚血導入後7日目より視索、内包、線条体、脳梁、海馬などでROCK1陽性血管が増加し、30日後まで増加は持続した。RhoBでは虚血導入後1日目より視索、内包、線条体、脳梁、海馬、大脳皮質などで陽性血管が増加し、30日後まで増加は持続した。視索、内包、線条体、脳梁、海馬は本モデルで組織障害を示す部位であり、Rho-ROCKシグナルが組織障害機序に関与している可能性が示された。

Rho-ROCKシグナルの下流のエフェクター分子では、LIM-kinase2陽性血管が視索、内包などのRhoB、ROCK1陽性血管が増加している部位に、虚血導入1日後から30日後まで持続的に増加していることを明らかにした。一方、LIM-kinase1は血管性認知症モデルラット脳での増加は認められなかった。また、RhoA、ROCK2は血管性認知症モデルラット脳での増加は認められなかった。虚血性白質病変を生じる部位にLIM-kinase2陽性血管とRhoB、ROCK1陽性血管が増加していることより、血管性認知症モデル動物脳でのRho-ROCKシグナルにおいては、LIM-kinase2が主なエフェクター分子として機能していることを明らかにした。

2) 血管性認知症のモデル動物の白質病変に対する Fasudil の効果の検討

ROCK阻害剤のFasudilを血管性認知症モデル動物に投与し、脳病変に与える影響を検討した。ラットの両側総頸動脈永久閉塞モデルの腹腔内にFasudilを投与し、虚血性大脳白質病変を生じる脳梁病変について、保護効果を検討した。対照群のVehicle投与群と比較した。白質病変の程度は、Luxol fast blue染色を行った標本で、正常(0)、線維走行の乱れ(1)、白質内空胞形成(2)、髄鞘を持つ線維の消失(3)の4段階で病変を評価した。Fasudilは、虚血性白質病変に対する保護効果を持つことを明らかにした(図1)。また、Fasudil投与にて白質病変内のROCK1、RhoB陽性血管数が減少することも明らかにした。これらにより、Rho-ROCKシグナルが虚血性白質病変の成立機転に関与していることを明らかにした。また、ROCK阻害剤が虚血性白質病変に対して保護効果を持つことが明らかとなった。Rho-ROCKシグナルの慢性脳虚血や虚血性白質病変に関する役割の解明に関する報告はこれまでになく、世界で初めて行われた研究である。

図1 白質病変に対するFasudilの効果



3) アルツハイマー病モデル動物脳におけるRho-ROCKシグナルの解析

アルツハイマー病モデル動物は、Aβの脳内蓄積を示すアルツハイマー病モデルマウスのTg2576マウスを検討した。2歳齢のTg2576マウスの海馬でRhoB陽性血管、ROCK1陽性血管を認めた。

また、海馬周囲にLIM-kinase2陽性血管の増加を認めた。海馬はAβの蓄積を示す部位であり、Aβの脳内蓄積にRho-ROCKシグナルが関与している可能性が示された。さらに、アルツハイマー病モデルマウスの脳表にもROCK1陽性血管を認めることを確認し、アミロイド排出機序と、Rho-ROCKシグナルの関連を明らかにした。

アルツハイマー病モデル動物脳におけるRho-ROCKシグナルの解析について、これらの成果は世界でまだ報告がない。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

- 1) 脇田英明 慢性脳低灌流と認知症 最新医学 2019; 74: 32-37. 査読無
- 2) Shimada T, Shindo A, Matsuyama H, Yata K, Niwa A, Sasaki R, Ayaki T, Maki T, Wakita H, Tomimoto H Chronic cerebral hypoperfusion upregulates leptin receptor expression in astrocytes and tau phosphorylation in tau transgenic mice. Neuroscience Letters 2019; 704: 133-140. 査読有
DOI: 10.1016/j.neulet.2019.04.009
- 3) 脇田英明、富本秀和 認知症の治療の進歩 神経治療学 2017; 34: 491-494. 査読無
DOI: org/10.15082/jsnt.34.5_491
- 4) Wakita H, Shindo A, Tomimoto H What is the Aftermath of Cerebral Microembolism?
Journal of Alzheimer's Disease & Parkinsonism 2017; 7:375. 査読有
DOI: 10.4172/2161-0460.1000375

〔学会発表〕(計1件)

- 1) Takahashi Y, Wakita H, Mizutani K, Sonoda S, Tomimoto H
Spatial and temporal distribution of adiponectin in the rat brain under chronic cerebral hypoperfusion.
XXIII World Congress of Neurology Kyoto 2017

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：水谷 謙明

ローマ字氏名：Mizutani Kenmei

所属研究機関名：藤田医科大学

部局名：共同利用研究推進施設

職名：講師

研究者番号（8桁）: 30351068

(2)研究協力者 なし

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。