

令和 2 年 4 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10721

研究課題名(和文) 高感度MRIを用いた骨髄由来細胞動態追跡による脳梗塞病態進行メカニズムの解明

研究課題名(英文) The kinetics and role of immune cells in the ischemic stroke rats model

研究代表者

杉本 香奈 (Sugimoto, Kana)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：00581034

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、超高磁場11.7T MRI(磁気共鳴イメージング)を用いて、脳梗塞モデルラットにおける免疫細胞の細胞動態を撮影した。マウスでは脳虚血障害領域と細胞動態追跡画像を組み合わせることにより免疫細胞が浸潤する様子を観察することができたが、ラットでは観察することができなかった。次に、梗塞巣に集積する2種類のマクロファージが脳梗塞予後進展に及ぼす役割について解析した。その結果、この2種類のマクロファージの構成比率が脳梗塞の予後を大きく左右する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

本研究から、脳梗塞巣に集積する常在性マイクログリア由来マクロファージ(MG-M)及び骨髄由来の浸潤性マクロファージ(BM-M)の構成比率が脳梗塞の予後を大きく左右することを明らかにした。従って、今後は脳梗塞の予後を悪化させるMG-Mの構成比率の低下、または、MG-Mの機能抑制をターゲットとした治療法の開発を行うことが、脳梗塞の新規治療薬の開発につながると考えている。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we confirmed the transmigration of immune cells in the ischemic stroke mice model, but did not it in the ischemic stroke rats model using 11.7T MRI imaging. Next, we tried to evaluate the role of resident microglia-derived macrophage-like cells (MG-M) and bone marrow-derived macrophages (BM-M) in the ischemic brain. We found that MG-M signature genes were highly expressed in the ischemic core in aggravated rats, while BM-M signature genes were weakly expressed. These findings suggest that the distribution ratio between two macrophages may affect progress after stroke.

研究分野：脳神経科学

キーワード：脳梗塞 磁気共鳴画像法 免疫細胞動態 マクロファージ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞は日本人の死因で割合が高く、死亡しない場合でも機能障害が生じることの多い疾患である。しかしながら、有効な治療法は発症初期を対象としたもので、発症後時間が経過した後の治療法はほとんどない。従って、脳梗塞の病態進行のメカニズムを解明することが、発症後期でも効果的な治療法の開発に繋がる可能性がある。

研究協力者の森らは生体マウス中枢神経系内の細胞の移動を単一細胞レベルで連続的に追跡することのできる高感度 MRI (磁気共鳴イメージング) 技術を開発した (Mori et al. Sci Rep, 2014)。この技術は、脳内の免疫細胞動態を捉える新しい免疫活動評価手法であり、免疫細胞と病態形成の関係性及び病態形成機序の解明につながる可能性がある。

梗塞巣には脳梗塞発症後 3 日目から常在性マイクログリア由来マクロファージ (MG-MΦ) や骨髄由来の浸潤性マクロファージ (BM-MΦ) が集積し始める。これらの細胞が脳梗塞の病態進行にもたらす役割は非常に大きく、その分布と活性が、病態に大きく反映されるものと考えている。

2. 研究の目的

高感度 MRI 技術を用いて脳梗塞モデルラットの脳梗塞巣に集積する免疫細胞の細胞動態を捉え、この免疫細胞が脳梗塞の予後進展に及ぼす影響を分子細胞レベルで評価することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 脳梗塞モデルラットの作成

動物実験は大阪大学医学部動物実験のガイドラインに沿って実施した。MRI の実験では、7~8 週齢の雄性 Wistar ラットの右中大脳動脈を糸で結紮し、90 分後に再灌流を行った一過性局所梗塞モデルラットを用いた。それ以降の実験には、7~8 週齢の雄性 Wistar ラットの右中大脳動脈にスレッドを挿入し、90 分間後に再灌流する、一過性中大脳動脈閉塞 (tMCAO) モデルラットを用いた。

(2) MRI の造影剤の投与

超常磁性酸化鉄粒子 (superparamagnetic particles of iron oxide: SPIO) は生体毒性が少なく、かつ効率よく単球及びマクロファージなどの貪食細胞に取り込まれる 50~60 nm のカルボキシデキストラン修飾された粒子を用いた。鉄濃度にしてラット体重 1g あたり 0.14 mg 程度を静脈内投与した。

(3) 小動物用超高磁場 11.7T MRI の撮像

MRI は小動物用超高磁場 11.7T MRI を用いた。SPIO による造影効果を強調する T2* 強調画像法を Fast Low Angle Shot (FLASH) 法を用いて、平面分解能が 50 μm×50 μm、スライス厚が 300 μm 程度の高解像 MRI 画像を撮像した。

(4) 脳の水分含有量測定

tMCAO 施術 6 時間後及び 1~7、14 日目のラットの脳を摘出し、正中で右脳と左脳に分け、それぞれの重量を測定した。その後、100°C で 24 時間乾燥させ、再び重量を測定した。右脳、左脳それぞれにおける乾燥重量に対する湿重量の比を算出した。

(5) 定量リアルタイム RT-PCR

tMCAO 後 1~7 日目に脳を摘出し、2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) 染色を用いて梗塞巣、梗塞巣周辺領域、反対側の正常領域を判別した。各領域を採取し、cDNA 合成を行った。その後、リアルタイム PCR を用いて目的の mRNA の発現量を測定した。

(6) 統計解析

得られた結果の値は、平均値±SEM で示し、GraphPad prism 8 software を用いて解析を行った。統計解析は、One-way ANOVA 後、Dunnett 多重比較検定を行った。相関関係は Pearson の相関係数を用いて解析した。p < 0.05 を有意とした。主成分分析 (PCA) は SIMCA 15 software を用いて行い、そのデータは unit variance (UV) を用いて規格化した。

4. 研究成果

(1) 脳梗塞モデルラットを用いた小動物用超高磁場 11.7T MRI の撮像

右中大脳動脈を結紮し、90 分後に再灌流を行った一過性局所梗塞モデルラットを用いて MRI の画像を撮影した。施術 5 日目に SPIO を尾静脈から投与し、7 日目に MRI の撮影を行った。図 1. に示す通り、右の大脳皮質には梗塞巣が確認できたが、SPIO を取り込んだ免疫細胞は数個ほどしか認められなかった。しかしながら、脳梗塞モデルマウスを用いた実験では、免疫細胞動態を観察することができた (Mori et al. Sci Rep, 2014)。従って、免疫細胞動態実験にはラットよりもマウスを用いることが適していることが分かった。

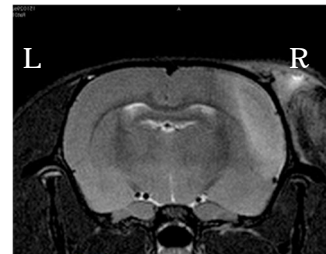


図1. 一過性局所梗塞モデルラットの MRI 画像

(2) 脳梗塞後の梗塞巣に集積するマクロファージの経時的変動

次に、一過性中大脳動脈閉塞モデルラットを用いて、梗塞巣に集積する MG-MΦ と BM-MΦ の出現変動を調べた。脳梗塞後 1~7 日目のラットから脳を摘出し、TTC 染色を用いて、梗塞巣 (コア)・梗塞巣周辺領域 (ペリ)・反対側の正常領域 (コントラ) の 3 領域における *Aif1* (*Iba1*) mRNA (マクロファージのマーカー) 発現量を調べた。その結果、図 2. に示す通り、脳梗塞 3 日目のペリ、5・7 日目のコアにおいて有意な増加が認められた。

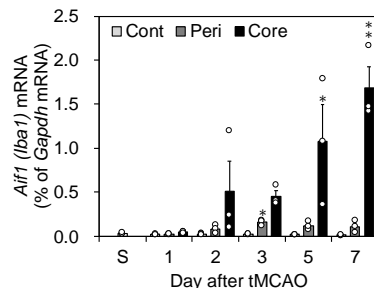


図2. 脳梗塞後の *Iba1* mRNA 空間・時間的発現変動

(3) 脳梗塞後の脳浮腫進行の経時的変動

次に、一過性中大脳動脈閉塞モデルラットを用いて、脳梗塞後 6 時間後から 1~7、14 日目の脳浮腫進行の経時的変動を調べた。その結果、脳梗塞後 1 日目から脳浮腫が生じ、7 日目にピークを迎えることが分かった (資料未記載)。

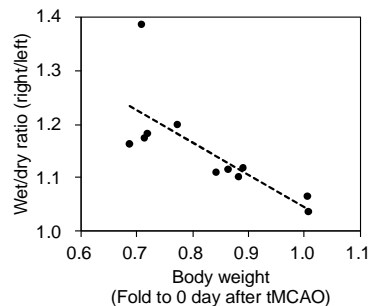


図3. 脳浮腫と体重増加率との相関関係

(4) 脳浮腫と体重増加率との関係性

脳梗塞後 2 日目の体重が梗塞前の体重と比べ、0.9 未満のラットのみを抽出し、脳梗塞後 7 日目の脳浮腫レベルと体重増加率との関係性を調べた。その結果、脳浮腫と体重増加率には負の相関関係 ($r=-0.07$, $p=0.0075$) があることが分かった (図 3)。従って、脳梗塞後の体重減少が著しい予後不良ラットでは、脳浮腫のレベルも高いことが明らかになった。

(5) 予後良好及び不良ラットにおける

脳梗塞巣に集積する MG-MΦ 及び BM-MΦ の発現変動と脳浮腫進行の経時的変動が類似していることから、これらの細胞が脳梗塞後の予後に大きく関与している可能性が考えられる。従って、これらの梗塞巣に集積する細胞が脳梗塞の予後にどのような影響を及ぼすのかを検討した。脳梗塞後 2 日目の体重が梗塞前の体重と比べ、0.9 未満のラット 11 匹を抽出し、脳梗塞 7 日目に脳を摘出し、TTC 染色後、コントラ及びコアを抽出した。その後、MG-MΦ の特異的遺伝子である *P2ry12*, *Tmem119*, *Olfml3*, *Gpr34*, *Pros1*, *Cx3cr1* 及び BM-MΦ の特異的遺伝子である *Ccr2*, *Mybl2* の mRNA 発現量を測定した (Kronenberg et al. Acta Neuropathol, 2018)。コントラに対するコアの発現量を用いて主成分分析を行った。図 4 に Rat. No.1~11 の score plot を示す。Rat. No. は体重増加率が低いものから順番に番号を割り当てた (例えば、体重増加率が最も低かったラットは No. 1)。この結果から、体重増加率が低いラット (No. 1~5) では principal component 1 (PC1) が positive area にプロットされた。一方、体重増加率が高いラット (No. 6~11) では PC1 が negative area にプロットされた。更に、図 5 の主成分分析の loading plots の結果から、MG-MΦ の特異的遺伝子群 (赤色) は PC1-positive area にプロットされ、BM-MΦ の特異的遺伝子群 (青色) は PC1-negative area にプロットされた。これらの結果から、MG-MΦ の特異的遺伝子群は体重増加率の低いラット群で高発現しており、BM-MΦ の特異的遺伝子群は体重増加率の高いラット群で高発現していることが分かった。

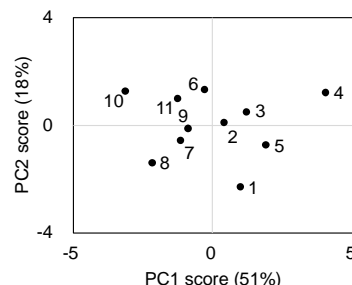


図4. 主成分分析の score plots

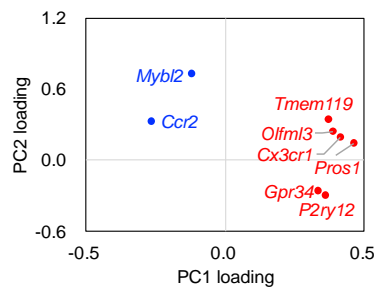


図5. 主成分分析の loading plots

以上の結果から、梗塞巣に集積する MG-MΦ と BM-MΦ の構成比率が脳梗塞の予後を左右している可能性が示唆された。

< 引用文献 >

- Kronenberg, G., Uhlemann, R., Richter, N., Klempin, F., Wegner, S., Staerck, L., Wolf, S., Uckert, W., Kettenmann, H., Endres, M., Gertz, K., 2018. Distinguishing features of microglia- and monocyte-derived macrophages after stroke. Acta Neuropathol 135, 551–568.
- Mori, Y., Chen, T., Fujisawa, T., Kobashi, S., Ohno, K., Yoshida, S., Tago, Y., Komai, Y., Hata, Y., Yoshioka, Y., 2014. From cartoon to real time MRI: In vivo monitoring of phagocyte migration in mouse brain. Sci. Rep. 4, 4–10.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Chihpin Yang, Kana Sugimoto, Yukie Murata, Yuichiro Hirata, Yu Kamakura, Yoshihisa Koyama, Yohei Miyashita, Kentaro Nakama, Kazuma Higashisaka, Kazuo Harada, Ryuichi Katada, Hiroshi Matsumoto	4. 巻 10
2. 論文標題 Molecular mechanisms of Wischnewski spot development on gastric mucosa in fatal hypothermia: an experimental study in rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1877
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-58894-8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Kana Sugimoto, Chihpin Yang, Yukie Murata, Rina Gono, Yuichiro Hirata, Teiji Harada, Yohei Miyashita, Kazuma Higashisaka, Kazuo Harada, Ryuichi Katada, Hiroshi Matsumoto
2. 発表標題 The spatial and time-dependent changes of various miRNAs expression in the ischemic rat brain
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yukie Murata, Kana Sugimoto, Chihpin Yang, Rina Gono, Teiji Harada, Yohei Miyashita, Kazuma Higashisaka, Kazuo Harada, Ryuichi Katada, Junya Tanaka, Hiroshi Matsumoto
2. 発表標題 Role of activated microglia/macrophages in brain edema formation after brain infarction
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村田幸咲, 杉本香奈, 楊志斌, 郷野里奈, 平田雄一郎, 宮下洋平, 東阪和馬, 原田和生, 片田竜一, 松本博志
2. 発表標題 脳梗塞後の脳浮腫形成にもたらす活性化microglia/macrophagesの役割
3. 学会等名 第66回日本法医学会学術近畿地方集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村田幸咲, 杉本香奈, 楊志斌, 片田竜一, 松本博志
2. 発表標題 Role of microglia on astrocytes aquapoin-4 expression under oxygen-glucose deprivation
3. 学会等名 第103次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 楊志斌、杉本香奈、村田幸咲、平田雄一郎、鎌倉悠宇、宮下洋平、東阪和馬、原田和生、片田竜一、松本博志
2. 発表標題 低体温死におけるWischnewski斑形成の機序解明
3. 学会等名 第65回学術近畿地方集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Chihpin Yang, Kana Sugimoto, Yuichiro Hirata, Yu Kamakura, Ryuichi Katada, Hiroshi Matsumoto
2. 発表標題 Molecular mechanisms of Wischnewski spot under hypothermia: An experimental study in rats
3. 学会等名 24th Congress of the International Academy of Legal Medicine (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 楊志斌、杉本香奈、平田雄一郎、鎌倉悠宇、片田竜一、松本博志
2. 発表標題 低体温下におけるWischnewski斑 形成の機序解明 Organotypic胃スライス培養法による実験的検討
3. 学会等名 第64回学術近畿地方集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kana Sugimoto, Yuki Mori, Yoshihisa Koyama, Yuichiro Hirata, Yu Kamakura, Chihpin Yang, Makiko Takahashi, Ryuichi Katada, Hiroshi Matsumoto
2. 発表標題 Prevention of stroke-related death: an experimental study on one protective mechanism of oxytocin for injured neurons in the rat stroke model
3. 学会等名 10th International Symposium Advances in Legal Medicine (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yuichiro Hirata, Kana Sugimoto, Yu Kamakura, Motonori Yoshida, Ryuichi Katada, Hiroshi Matsumoto
2. 発表標題 Heat stress changes Cx43 disposition, leading to develop arrhythmia
3. 学会等名 10th International Symposium Advances in Legal Medicine (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Chihpin Yang, Kana Sugimoto, Yuichiro Hirata, Yu Kamakura, Ryuichi Katada, Hiroshi Matsumoto
2. 発表標題 Molecular Mechanisms of W-spot under hypothermia: an experimental study in rats
3. 学会等名 10th International Symposium Advances in Legal Medicine (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kana Sugimoto, Yuki Mori, Yoshihisa Koyama, Yuichiro Hirata, Yu Kamakura, Chihpin Yang, Makiko Takahashi, Ryuichi Katada, Hiroshi Matsumoto
2. 発表標題 Expression of oxytocin receptor in a rat stroke model
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 杉本香奈、森勇樹、平田雄一郎、鎌倉悠宇、高橋真樹子、片田竜一、松本博志
2. 発表標題 一過性脳虚血モデルラットにおけるmiRNAの経時・空間的発現変動の網羅的解析
3. 学会等名 第101次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kana Sugimoto, Yuki Mori, Hidekazu Tanaka, Yuichiro Hirata, Yu Kamakura, Makiko Takahashi, Ryuichi Katada, Hiroshi Matsumoto
2. 発表標題 Expression of oxytocin receptor in ischemic lesions of rat brain: one protective mechanism of oxytocin for injured neurons
3. 学会等名 第94回日本生理学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kana Sugimoto, Yuki Mori, Hidekazu Tanaka, Yuichiro Hirata, Yu Kamakura, Ryuichi Katada, Hiroshi Matsumoto
2. 発表標題 Expression of oxytocin receptors in the peri-infarct tissue of rat brain: protection of oxytocin for injured neurons
3. 学会等名 第39回日本神経科学大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 杉本香奈、片田竜一、田中秀和、平田雄一郎、鎌倉悠宇、吉田原規、高橋真樹子、望月薫、五十嵐一雄、松本博志
2. 発表標題 ラット脳におけるイオンチャネルの発現量に及ぼすエタノールの影響
3. 学会等名 第100次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----