

令和 4 年 5 月 9 日現在

機関番号：17102
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2019～2021
 課題番号：19K09530
 研究課題名(和文)慢性脳低灌流による脳白質障害・認知障害への活性酸素種産生酵素Nox4の役割の解明

研究課題名(英文)Effect of Nox4, a major NADPH-dependent reactive oxygen species-producing enzyme, on cerebral demyelination and cognitive impairment due to chronic cerebral hypoperfusion

研究代表者
 脇坂 義信(WAKISAKA, Yoshinobu)
 九州大学・大学病院・講師

研究者番号：50631694
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Nox4ノックアウト(KO)マウスでは慢性脳低灌流により、脳梁の高度脱髄、血管新生抑制、オリゴデンドロサイト前駆細胞(OPC)増加抑制、アストロサイト・ミクログリア浸潤抑制、空間認知力低下を認めた。そのためNox4がアストロサイトやミクログリア浸潤を促進させて栄養因子を放出させることでOPC分化・増殖を促し、脱髄を抑制させる可能性が示唆された。ただしcuprizoneによる薬剤誘発性脳脱髄モデルでの検討では、Nox4-KOマウスでは脱髄後の再髄鞘化が促進される結果を認めた。Nox4による脱髄への影響は2つの脱髄モデルで相反する結果であったがその機序は未だ不明であり今後の検討課題と考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性脳低灌流による脳白質障害は認知症の発症や病態増悪の要因となるが、脳白質障害の発症や進展を抑制する有効な治療法は未だ確立していない。今回、慢性脳低灌流下ではNox4は脳保護的に作用して脱髄の改善を示したが、一方で薬剤誘発性脱髄ではNox4は脱髄遷延をもたらすことを見出した。Nox4による脳白質障害の発症・進展を抑制する機序をさらに詳細に検討し、今後の認知症治療の開発につなげたい。

研究成果の概要(英文)：Genetic deletion of Nox4 enhances demyelination, suppresses angiogenesis and infiltration of astrocyte and microglia, reduces differentiation and proliferation of oligodendrocyte precursor cells (OPC), and impairs spatial cognition following chronic cerebral hypoperfusion. Thus, Nox4 could repress demyelination by promoting differentiation and proliferation of OPC through trophic factors released by infiltrating astrocytes and microglia. However, in the cuprizone (CPZ)-induced demyelination model, genetic deletion of Nox4 enhances remyelination through increasing phagocyte capacity of microglia and macrophage. Therefore, we have found contradicting effects of Nox4 in 2 demyelination models. It will be a near future study to investigate the discrepancy of effect of Nox4 between demyelination by chronic cerebral hypoperfusion and CPZ.

研究分野：急性また慢性の脳血管障害また認知症の病態解明

キーワード：慢性脳低灌流による脳脱髄 薬剤誘発性脳脱髄 Nox4 脳血管性認知症 ミクログリア マクロファージ
 アストロサイト オリゴデンドロサイト前駆細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒトの脳組織において軸索や髄鞘により構成されている大脳白質の占める割合は大きい。頸動脈狭窄などに起因する慢性脳低灌流により大脳白質は障害を受け、脳血管性認知症や Alzheimer 病の病態進行と密接に関連する。これまで慢性脳低灌流では、髄鞘を形成する主要細胞であるオリゴデンドロサイトの細胞死が惹起され、その過程に酸化ストレスが関与すること、また BBB での物質の取込と排出の制御、炎症細胞浸潤の制御、脳血流制御などにおいて重要な役割を果たす脳血管周皮細胞が脱落し BBB 透過性が亢進すること、そして脳血管周皮細胞がオリゴデンドロサイト前駆細胞の分化・再髄鞘化を促す可能性が指摘されてきている。

(2) 申請者らは、マウス脳梗塞モデルを用いて、脳梗塞急性期には梗塞周囲領域の脳血管周皮細胞に Nox4 の発現が亢進すること、脳血管周皮細胞の生存には内皮細胞から分泌される血小板由来成長因子(platelet-derived growth factor: PDGF)と脳血管周皮細胞に発現する PDGF 受容体 α を介したシグナル伝達が重要な役割を果たしていること、脳血管周皮細胞脱落が BBB 破綻の原因となることを報告した。さらに脳血管周皮細胞に Nox4 を過剰発現させたマウスでは、BBB 破綻が助長され脳梗塞が悪化すること、急性脳虚血では脳血管周皮細胞での活性酸素種の産生が脳虚血の病態の悪化に関与することを明らかにしてきた。

(3) このように急性脳虚血において Nox4 発現亢進に起因する酸化ストレスにより脳血管周皮細胞脱落と BBB 破綻をきたして病態を悪化させることから、慢性脳低灌流においても Nox4 発現亢進により脳血管周皮細胞脱落・BBB 破綻をきたし、またオリゴデンドロサイト前駆細胞の分化を抑制し再髄鞘化を阻害することで、大脳白質病変が発症する可能性を考えた。この仮説に基づき予備的実験として少数の Nox4 ノックアウトマウスとその野生型マウスに対して両側頸動脈を緩徐に狭窄させて慢性脳低灌流モデルを作成し脳組織を評価した。当初は Nox4 発現抑制により脳白質病変が軽減することを予想したが、実際には Nox4 発現抑制により脳白質での脱髄増悪を認めた。そのため急性脳虚血とは異なり、慢性脳低灌流では Nox4 は脳保護的に作用している可能性があると考えられる。しかしながらそのメカニズムは依然として不明である。

2. 研究の目的

慢性脳低灌流では急性脳虚血とは異なり、Nox4 は脳白質の脱髄を抑制して脳保護的に作用する可能性が予備的実験から推測されるが、その機序は不明である。そこで本研究では、慢性脳低灌流の環境下における脳周皮細胞での Nox4 発現変化が、大脳白質障害や運動/認知機能に及ぼす影響を明らかにした上で、脳白質病変と関わりが強い脳血管周皮細胞の喪失・BBB 破綻・脳側副血行の形成良否について、また再髄鞘化に関わるオリゴデンドロサイトやその前駆細胞の発現・増殖・分化にどのような変化が起きるのかを明らかにする。そして低酸素負荷で脳血管周皮細胞において生じるシグナル伝達機構を解明する。

3. 研究の方法

脳血管周皮細胞での Nox4 遺伝子改変マウスとその野生型マウスに対して慢性脳低灌流または cuprizone (CPZ) によって生じる大脳白質病変の程度や広がり、また運動機能と認知機能の差異を解析する。

- (1) 使用するマウス：Nox4 ノックアウト(KO)マウスとその野生型マウス。
- (2) マウス慢性脳低灌流による脳脱髄モデルの作製：マウスの両側内頸動脈にアメロイドコンストラクターを装着して緩徐に頸動脈を狭窄させて慢性脳低灌流を作成し、組織学的な脳白質変性を誘導する。脳血流低下は二次元で血流を連続的に測定するレーザー血流計を用いて確認する。
- (3) CPZ による薬剤誘導性脳脱髄モデルの作製：マウスに 4 週間 CPZ 含有餌を摂食させた後、通常の餌を 2 週間摂食させる。
- (4) 大脳白質病変の評価：慢性脳低灌流作成 28 日後の脳を摘出し、脳梁膨大部の脱髄性変化の有無や白質粗鬆化の程度を Klüver-Barrera 染色と MAG 免疫組織染色で半定量的に評価し、Nox4 発現レベルと大脳白質障害の程度の間関連を検討する。
- (5) 運動機能と認知機能の評価：慢性脳低灌流作成の前、7・14・21・28 日後に運動機能を rota-rod 試験と wire hang 試験を用いて、認知機能評価を Y 字迷路試験と新規物体認識試験を用いて評価し、Nox4 発現レベルと運動機能・認知機能との関連を検討する。
- (6) 培養細胞：Nox4-KO マウスとその野生型マウスから初代培養アストロサイト、初代培養オリゴデンドロサイト前駆細胞(OPC)、初代培養ミクログリア、骨髄由来マクロファージを作製して、Nox4 の欠損による各細胞の増殖や分化能を評価する。またミエリンを貪食したミクログリアやマクロファージの培養細胞上清を培養 OPC に添加して、OPC の分化能・増殖能を評価する。

4. 研究成果

- (1) 慢性脳低灌流による脳脱髄モデルに対する Nox4 の影響

脳表での脳血流： Nox4-KO マウスまたその野生型マウスともに脳慢性低灌流を誘導後に脳表で測定する脳血流の低下を認めたが両群間で脳血流低下に有意差を認めなかった。

脳梁での脱髄： 慢性脳低灌流を誘導して 28 日後に脳梁の脱髄を評価したところ、Nox4-KO マウスでは野生型マウスに比較して脱髄が有意に高度であり、また髄鞘構成蛋白の MBP の発現も有意に抑制されていた。

脳梁での血管新生： 慢性脳低灌流によって脱髄を誘発した後に脳梁での血管新生の程度を Lectin 免疫染色で評価すると、Nox4-KO マウスは野生型マウスに比較して脱髄後の血管新生が有意に低下していた。

脳梁での OPC 発現： 慢性脳低灌流によって脱髄を誘発した後に脳梁での OPC 発現を PDGFR 免疫染色で評価したところ、野生型マウスでは OPC 発現の有意な増加を認めたが、Nox4-KO マウスでは OPC 発現の増加を認めなかった。

脳梁でのアストロサイトとミクログリアの発現： 慢性脳低灌流によって脱髄を誘発した後に脳梁でのアストロサイト発現とミクログリア発現をそれぞれ GFAP 面積染色と Iba1 免疫染色で評価したところ、野生型マウスではアストロサイトとミクログリアの発現の有意な増加を認めたが、Nox4-KO マウスではアストロサイトとミクログリアの発現に有意な増加を認めなかった。

慢性脳低灌流誘導後の認知機能： Wire hang test で評価した運動機能は Nox4-KO マウスと野生型マウスの間で有意差を認めなかった。一方で Y 迷路試験で評価した空間作業記憶は Nox4-KO マウスにおいて有意に低下していた。

ここまでの結果で、Nox4 は脱髄巣へアストロサイト発現とミクログリア浸潤を促進させて栄養因子を放出させることで OPC の増殖を促し、それにより OPC が分化して髄鞘が再形成することで空間認知機能が改善する可能性が考えられた。

しかしながら、Nox4-KO マウスとその野生型マウスから作製した OPC 初代培養細胞に対して培養アストロサイト上清と培養ミクログリア上清を添付しても OPC の増殖能に有意差を認めなかった。そのため、慢性脳低灌流マウスでの OPC 増殖において脳血管新生や脳血流が影響を与えている可能性も考えられた。

一方で、CPZ はオリゴデンドロサイトに直接作用して脱髄を誘発することが知られている。そこで CPZ による薬剤誘発性脱髄モデルを用いて Nox4 の作用を検討した。

(2) CPZ による薬剤誘発性脳脱髄モデルに対する Nox4 の影響

脳梁での脱髄： 脱髄の程度をミエリン蛋白の MBP とオリゴデンドロサイトのマーカーである GST で評価したところ、CPZ 投与 4 週間後の Nox4-KO マウスと野生型マウスで有意に発現が低下していたが両群間で有意差を認めなかった。しかし CPZ 投与中止 2 週間後の再髄鞘化は Nox4-KO マウスにおいて有意に亢進していた。同様に qPCR で評価した脳梁での *Mbp* と *Mag* の発現も Nox4-KO マウスで有意に発現が亢進していた。

脳梁脱髄巣での OPC 発現： 野生型マウスと比較して Nox4-KO マウスでは脳梁脱髄巣内で CPZ 投与開始 4 週間後の時点で PDGFR 陽性 OPC が、また CPZ 開始 4 週間後とその後の再髄鞘化の過程において OLIG2 陽性細胞 (OPC とオリゴデンドロサイトのマーカー) の増加が顕著であった。

OPC の分化・増力： Nox4 欠損は初代培養 OPC の分化や増殖に影響を与えていない。

脳梁脱髄巣でのミクログリアとマクロファージの発現： 野生型マウスと比較して Nox4-KO マウスでは脳梁脱髄巣内で CPZ 投与開始 4 週間後の時点で Iba1 陽性細胞 (ミクログリア、マクロファージ) の発現が亢進していた。一方で CPZ 投与中止 1 週間後の再髄鞘化の過程では Iba1 陽性細胞の発現は低下していた。

ミクログリアとマクロファージによる栄養因子の産生： 野生型マウスと比較して Nox4-KO マウスでは脳梁脱髄巣での栄養因子 (*Trem2*, *Igf1*, *Pgrn*) の発現が CPZ 投与 4 週間後、また再髄鞘化の過程で有意に亢進していた。

ミクログリアとマクロファージの貪食能： 野生型マウスまた Nox4-KO マウスから作製した培養ミクログリアと骨髄由来マクロファージ (BMDM) での検討で、Nox4 欠損ミクログリアや BMDM はミエリンデブリスの貪食能が有意に強く、ミエリンデブリスの貪食によって栄養因子 (*Trem2*, *Igf1*, *Pgrn*) の発現が亢進していた。

マクロファージと OPC の関連： ミエリンを貪食させた野生型マウス由来の培養 BMDM 上清を添加させた培養 OPC と比較して、ミエリンを貪食させた Nox4-KO マウス由来の培養 BMDM 上清を添加させた培養 OPC は OLIG2 陽性 OPC やミエリン蛋白の MBP の発現が亢進していた。

以上の結果から、Nox4 の欠損はミクログリアとマクロファージによるミエリンデブリスの除去と栄養因子の発現を亢進させることで、CPZ による薬剤誘発性脱髄発生後の再髄鞘化を促進させることを見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山中圭
2. 発表標題 活性酸素種産生酵素Nox4はマウス脳慢性低灌流モデルにおける脱髄病変形成を抑制する
3. 学会等名 第62回日本脳循環代謝学会学術集会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------