

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16500

研究課題名（和文）炎症型血管周囲ミクログリアと高血圧による脳血管障害をつなぐシグナル伝達機構の解明

研究課題名（英文）Analysis for signaling mechanisms linking inflammatory vessel-associated microglia and hypertensive cerebral small vessel disease

研究代表者

小泉 崇 (Koizumi, Takashi)

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：50867455

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、高血圧により引き起こされる脳小血管障害における血管周囲ミクログリアの関与の解明である。まず慢性高血圧モデルラットを用い、血圧上昇過程で変化する遺伝子を網羅的に解析した。その変化する遺伝子群中で血管周囲へとミクログリアを引き寄せうる候補遺伝子Xを選定した。次に免疫組織学的に評価により分子Xの発現細胞が血管内皮細胞とアストロサイトであること、ならびにその受容体Xがミクログリア上で経時的に増加することを確認した。また培養細胞を用いた化学走化性試験により分子Xがミクログリア遊走に関わる事を確認した。本研究結果から分子Xを介してミクログリアが血管周囲へと引き寄せられる事が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高血圧性脳小血管病は血管性認知症を引き起こし得る。高齢化社会における認知症発症予防は喫緊の課題であり、高血圧性脳小血管病は予防可能な疾患となりうる。しかしながら、その発症メカニズムには不明な点も多く、単に降圧治療を行っただけでは進行が予防できない事がある。これまでの報告並びに我々の研究結果から、高血圧性脳小血管障害には神経炎症が関わっている事が示唆される。さらに本研究結果から分子Xが神経炎症を引き起こすきっかけである可能性がある。引き続き分子Xの関与を詳細に調べることで高血圧性脳小血管病発症予防、ひいては認知症予防のための新たな治療ストラテジーを提供できることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to elucidate the involvement of vessel-associated microglia in cerebral small vessel disease(cSVD) caused by hypertension. First, using a chronic hypertension model rat, we comprehensively analyzed genes that are altered during the process of blood pressure elevation. We chose a candidate gene X among them, which could attract microglia to the perivascular area. Next, the distribution of molecule X and its receptor X were evaluated immunohistochemically to confirm that the expression of receptor X increased over time on microglia and that molecule X is involved in microglial migration using cultured tissue in a chemotaxis assay. The results of the present study indicated microglia could migrate toward vessels via Molecule X. For future studies, we do further administrate the inhibitor of Molecule X to rat models to confirm that vascular injuries could be suppressed.

研究分野：脳神経学

キーワード：高血圧性脳小血管病 ミクログリア 神経炎症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳内に存在する主な免疫担当細胞として、脳実質中に存在するミクログリアと血管周囲に存在するマクロファージが知られている。先行研究から、脳血管障害におけるこれらの免疫担当細胞の関与が示唆されている。たとえば、遺伝的に高血圧を発症するモデルラット (SHRSP) や、脳梗塞モデルラットを用いた研究では、血管構造の破綻時に活性化したミクログリア、マクロファージが存在することが報告されている。しかしながら、これらの細胞の活性化の詳細な機序や血管障害との因果関係についてはほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

本研究の主目的は『慢性高血圧で生じる血管破綻の背景にある細胞間クロストークを解明すること』である。申請者のこれまでの研究により、慢性高血圧ラットでは、血管破綻が生じる以前からミクログリアが脳小血管壁に接着をし始めることを見出した。そこで これらの細胞動態の分子的背景および②血管障害との因果関係に関して、明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、孤発性高血圧のモデル動物として既に確立した Deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt ラットを用いる。また、以下の実験ではコントロール群、DOCA-salt 投与 1 週目 (DOCA1W), 2 週目 (DOCA2W), 3 週目 (DOCA3W), 4 週目 (DOCA4W) のラット脳を組織学的・生化学的検討に用いる。

高血圧早期に血管周囲へミクログリアを遊走させる因子 X の選出

(方法) 血圧上昇過程で血管内皮細胞 血管周囲ミクログリアにおいて発現が増加する分子を探索する。まず始めに、DOCA 処理各週数のラット脳 (n=4, 各グループ) から髄膜動脈 (Pia artery) を含んだ脳軟膜を剥離・採取し、血管および血管内に含まれる遊走性マクロファージを分画・回収する。これを出発材料に炎症関連分子を中心とした DNA マイクロアレイ解析を行い、遺伝子発現レベルを比較することで候補シグナル分子 X を選定する。

選定した因子 X によりミクログリア遊走が促されるのか、化学走化性試験を行う。またその際ミクログリア上に因子 X に対する受容体が発現しているのかも評価する。

因子 X 阻害による血管障害抑制効果の評価

分子 X の阻害剤の細胞培養実験ならびにモデル動物への脳室内投与を行い、高血圧モデルラット脳での血管周囲ミクログリア増加の抑制並びに血管破綻の抑制がみられるかを確認する。

4. 研究成果

- 1. 高血圧早期に血管周囲へミクログリアを遊走させる因子 X の選出

血管画分を用いた DNA マイクロアレイ解析の結果、コントロール群と比較して DOCA 処理群 (DOCA1W, DOCA2W, DOCA3W) で 1444 遺伝子の発現増加を認めた。さらに Gene Ontology 解析およびパスウェイ解析で 10 遺伝子へと絞りこんだ。文献的報告からケモカインの一種である CCL-2 を候補遺伝子として選出した。

この CCL-2 が血管側から発現され、ミクログリアの血管側への遊走を促すことを示すために、まず免疫組織学的に CCL-2 の発現部位、ならびにその受容体である CCR2 の発現を評価した。その結果、DOCA 処理 2 週目より CCL-2 は血管内皮細胞と脳表に近い部位に存在するアストロサイトでの発現を認めた。また CCR-2 についてはアストロサイトおよび実質ミクログリアでの発現を認めた。DOCA 処理 3 週目より血管周囲のミクログリアでの CCR-2 発現が優位増加することを確認した (図 1)。

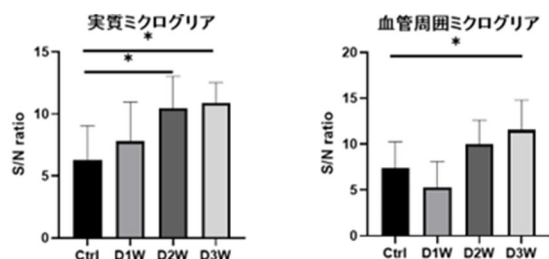
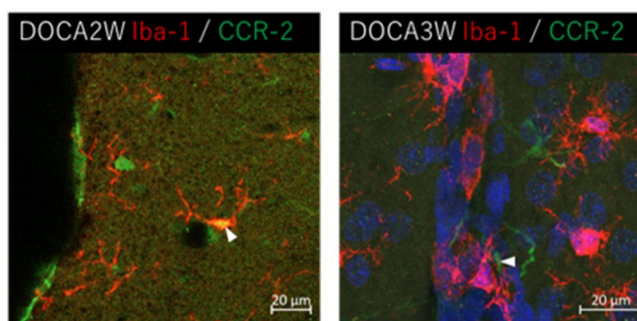


図1. ミクログリア上でのCCR-2の発現 (矢頭) は実質ミクログリアではDOCA処理2週目より、血管周囲ミクログリアでは3週目より発現が増加した。*p<0.05 (Dunnett検定)

-2. CCL-2 によるミクログリア遊走能の評価

CCL-2 にミクログリア遊走能があることを検証した。ミクログリア様細胞である BV2 細胞を用いてミリセル (Millicell®) μ -Migration アッセイキットによる化学走化性試験を行った。その結果 CCL-2 濃度の高い側へと BV2 細胞が移動する様子がタイムラプス画像で確認された。またその BV2 細胞表面上での CCR2 発現が増加していることを確認した。

CCL-2 阻害による血管障害抑制効果の評価

CCR-2 の特異的な阻害剤とされる RS102895 を用いてミクログリア遊走が抑制され、血管破綻の抑制がみられるかを評価した。BV2 細胞を用いた実験では、化学走化性試験を行う 1 時間前に阻害剤を添加して実施したところ、ミクログリアの遊走性が優位に阻害された。

引き続き DOCA モデルラットに対して、RS102895 を脳室内投与した群と PBS のみを投与した群 (n=2) での DOCA 処理 2 週目時点での血管周囲ミクログリア数の比較を行ったところ阻害剤投与群での減少が確認された (図 2)。(論文作成中)

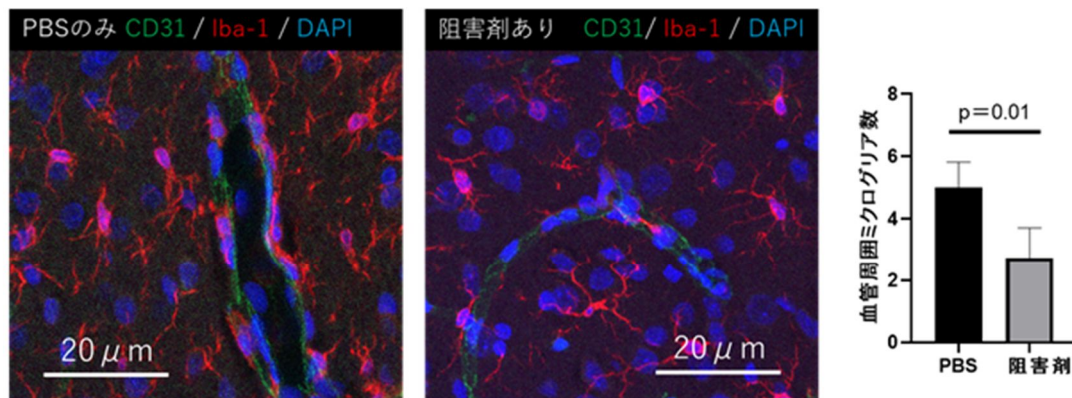


図 2. DOCAモデルラットへのRS102895脳室内投与は血管周囲へのミクログリア遊走を抑制する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Takashi Koizumi
2. 発表標題 Vessel-associated microglia precede cerebrovascular changes in a chronic hypertension model
3. 学会等名 第64回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小泉 崇
2. 発表標題 慢性高血圧ラットにおいて一過性増殖能を獲得した血管周囲ミクログリアは脳血管障害に先んじて炎症性形質を呈する。
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小泉 崇
2. 発表標題 ミクログリア遊走時におけるマトリックスメタプロテアーゼの関与についての検討。
3. 学会等名 第98回日本解剖学会近畿支部学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小泉 崇
2. 発表標題 Vessel-associated microglia precede cerebrovascular changes in a chronic hypertension model
3. 学会等名 第64回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小泉 崇
2. 発表標題 高血圧性脳血管障害における血管周囲へのミクログリア遊走時のMMP-9発現について.
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会.
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小泉 崇
2. 発表標題 高血圧、ミクログリアからみた白質病変
3. 学会等名 第39回日本認知症学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takashi Koizumi
2. 発表標題 Diabetes and Obesity promote activation-dynamics of Vessel-Associated Microglia in hypertensive rats.
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2020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
---------	---------