

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16585

研究課題名（和文）マウス脳虚血モデルにおける血管内皮透過性亢進機序の検討

研究課題名（英文）Investigation of the mechanism of increased vascular endothelial permeability in a mouse model of cerebral ischemia

研究代表者

塚田 直己（Tsukada, Naoki）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・研究員

研究者番号：80868563

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、*in vivo* において血管透過性を評価することが出来る実験系を確立し、血管透過性亢進メカニズム・病態を解明することである。上記研究目標実現のために血管内皮細胞が蛍光標識されたTie2-GFPマウスに脳血管透過性を亢進する刺激を加え、頭窓を作成し、二光子顕微鏡を使用し、観察した。血管透過性亢進の評価はrhodamine dextranの血管外（神経実質）への拡散を蛍光強度から定量化して行った。脳定位固定トロンピン皮質下注射およびシャムオペ群それぞれで15例ずつ観察を行い、rhodamine dextranの神経実質の蛍光強度に有意な差が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的は、血管透過性亢進メカニズム・病態の解明に取り組み、最終的に血管透過性制御による脳血管障害、あるいは神経疾患に対する新たな治療法を確立することである。本研究により、二光子顕微鏡下での*in vivo*・リアルタイム・反復評価可能な脳血管内皮透過性評価モデルを確立した。*in vivo* で脳血管透過性に着目した脳虚血モデルは存在せず、この確立は血管内皮細胞の透過性亢進が関与する多くの病態・疾患に応用が可能であり、幅広い研究分野への波及が期待される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to establish an experimental system that can evaluate vascular permeability *in vivo* and to elucidate the mechanism and pathology of increased vascular permeability. In order to achieve the above goal, Tie2-GFP mice, in which vascular endothelial cells were fluorescently labeled, were stimulated to increase cerebral vascular permeability, and the head window was created and observed using a two-photon microscope. Vascular permeability enhancement was evaluated by quantifying the diffusion of rhodamine dextran outside of blood vessels (neuroparenchymal) from the fluorescence intensity. Fifteen cases were observed in each of the stereotaxic thrombin subcortical injection and sham-operated groups, and significant differences were observed in the fluorescence intensity of rhodamine dextran in the neuroparenchymal substance.

研究分野：脳卒中

キーワード：脳血管透過性 *in vivo* 二光子顕微鏡 マウスモデル 脳虚血

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳卒中は全世界で死因の2位、寝たきりの原因の1位と報告されている。また、平成28年度国民生活基礎調査によれば、脳血管障害、及び認知症は、要介護状態となる原因疾患の第一位、第二位を占め、大きな問題となっている。血栓溶解療法や血管内治療など超急性期脳梗塞治療の進歩が目覚ましい一方で、脳梗塞の発症予防は、いまだ抗血栓療法と血圧管理に依存し、新規治療法は久しく開発されていない。脳血管障害の治療で解決すべき課題は多く、脳血管性認知症に至っては治療法が存在しない。安全性と有効性を両立した脳血管障害、さらには脳血管性認知症に対する治療の確立は喫緊の課題である。脳血管障害および脳血管性認知症の高リスク患者では、病理学的に血管内皮細胞間の間隙が拡大し、血管内皮透過性が亢進することが1970年頃から知られていた。頭部MRIによる評価でも、同様の高リスク患者群で脳血管透過性が亢進していることが報告された(Topakian, 2010.)。このように脳梗塞、脳出血、脳血管性認知症の発症・病状悪化に、脳血管透過性の亢進の関与が示唆されているが、しかし、脳血管透過性が亢進するのか、そのメカニズムは解明されたとはいえない。

「血管透過性が亢進するメカニズムはどういったものであるのか、そのメカニズムの人為的コントロールは可能であるのか、血管透過性亢進の抑制が脳血管障害および脳血管性認知症への治療につながるのか」

この問いを解明することが本研究を始めた当初の動機である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、血管透過性亢進メカニズム・病態の解明に取り組み、最終的に血管透過性制御による脳血管障害、あるいは神経疾患に対する新たな治療法を確立することである。

二光子顕微鏡下での *in vivo*・リアルタイム・反復評価可能な脳血管内皮透過性評価モデルを確立することで、血管透過性亢進メカニズム・病態を解明する。*in vivo* で脳血管透過性に着目した脳虚血モデルは存在せず、この確立は血管内皮細胞の透過性亢進が関与する多くの病態・疾患に応用が可能であり、幅広い研究分野への波及が期待される。また、本邦における脳血管障害および血管性認知症に伴う社会的な負担、影響は高齢化の進展に伴い増大しており、当研究により新たな脳血管障害、脳血管性認知症の治療を確立できれば、その社会的意義は大きい。

このモデルを用いて *in vitro* で血管透過性亢進抑制効果が確認されている RhoK 阻害薬、MLCK 阻害薬の *in vivo* における血管透過性亢進抑制効果の評価、および2型糖尿病治療薬であるものの脳梗塞予防効果を有する可能性が示されているピオグリタゾンや GLP1 受容体作動薬の神経保護機能の有無、血管透過性への影響の評価を行う。

糖尿病治療薬と脳心血管イベントの抑制効果について行われた研究では、ピオグリタゾンと GLP1 受容体作動薬は脳卒中再発を有意に抑制するとのデータが示されている。2型糖尿病での積極的な血糖コントロールは、脳卒中リスクを低下させることはなかったことが報告されていることから、脳卒中予防効果は血糖コントロールによるものではなく薬剤そのものの作用によるものと考えられる。この二剤のように既存薬として使用され、脳卒中予防効果が期待されるものの、その機序が不明な薬剤を当研究室の *in vivo* 血管透過性亢進評価モデルを用いることで、血管透過性の側面から分析する。上記の薬剤に限らず当モデルを用いて様々な薬剤を評価し、新規治療開発の一助としたい。

3. 研究の方法

血管内皮細胞が蛍光標識された Tie2-GFP マウスを用い、血管透過性亢進誘発のために、*in vitro* 研究で解析済のトロンピンや抗 1 インテグリン抗体 (Ha2/5 抗体) の皮質下への stereotaxic injection を用いた。

血管透過性が亢進した後、左頭蓋骨に観察窓(頭窓)を作成し、中大脳動脈領域、あるいは注射部位近傍の皮質を二光子顕微鏡(OLYMPUS FV1200MPE)を用いて、生存麻酔下で直接観察した。二光子顕微鏡により脳表から 500 μ m の深部まで連続して三次元観察可能であり、動脈・細動脈・毛細血管レベルでの変化を生体内で連続的に評価した。皮質下への stereotaxic injection と頭窓作成による侵襲の影響を排除するため、二光子顕微鏡による観察は stereotaxic injection の2日後に行った。血管透過性亢進の評価は二光子顕微鏡を用いて rhodamine dextran の血管外(神経実質)への拡散を蛍光強度から定量化して行った。

分子量 4.4KDa、10KDa、22KDa、70KDa の rhodamine dextran を用いて、どの分子量のものを用いれば血管透過性の評価をより適切に行えるかを同定した。この過程においては、脳虚血よりも脳血管透過性亢進を強く惹起すると考えられるトロンピンの脳実質への投与群と生理食塩水の脳実質への投与群を比較して血管透過性亢進の評価を行った。

4. 研究成果

実験系確立にあたり、まず、脳血管透過性を亢進する刺激はトロンピンの脳への直接注入で固定し、血管透過性の評価をより適切に行える rhodamine dextran の分子量の同定を行った。分子量 4.4KDa、10KDa、22KDa、70KDa のものを用いて実験、比較し、10KDa の rhodamine dextran が血管透過性の評価が適切であることを同定した。また、トロンピンの脳への直接注入を行う際の部位、深さ、二光子顕微鏡を用いて観察を行うタイミング等を精査し、安定的、効率的に脳血管内皮透過性亢進を評価出来る実験系の確立を行った(図1)。脳定位固定トロンピン皮質下注射およびシャムオペ群それぞれで15例ずつ観察を行い、rhodamine dextran の神経実質の蛍光強度

に有意な差が認められた（図1）。この結果をまとめ、2023年度の脳循環代謝学会での発表を予定している。また、作用機序はことなるが、トロンピンと同様に脳血管透過性を亢進させる HA2/5 抗体の直接注入や永久閉塞モデルでの観察を行っている。

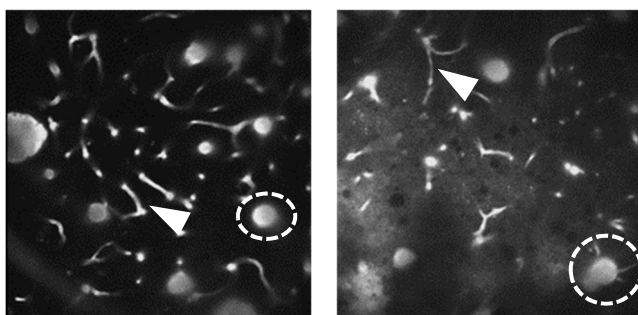


図1 vehicle投与 thrombin投与

◁細動脈 ○穿通動脈

右図thrombin投与の血管外のもやは、漏出したrhodamine。黒抜けは神経細胞。

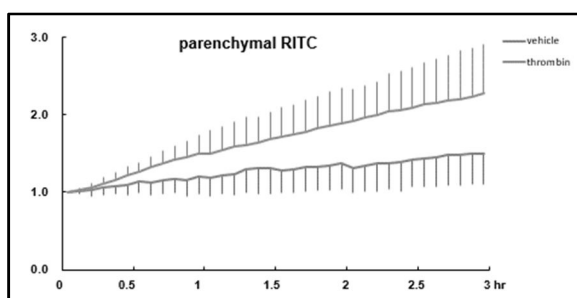


図2 thrombin 投与 (n=14) vs vehicle 投与 (n=12) stereotaxic injection 2日後の rhodamine 蛍光強度。3時間の経時比較。Rhodamine 投与群は有意に蛍光強度が高い。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------