

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 30 日現在

機関番号： 14101
 研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2010 ～ 2012
 課題番号： 22590929
 研究課題名 (和文) 慢性脳低灌流状態における内皮細胞・血液脳関門障害の病態解明
 研究課題名 (英文) Impairment of neurovascular unit under chronic hypoperfusion

研究代表者

矢田 健一郎 (YATA KENICHIRO)
 三重大学・大学院医学系研究科・産学官連携研究員
 研究者番号： 40467361

研究成果の概要 (和文)：慢性脳低灌流下での、内皮細胞、血液脳関門障害のメカニズムを二光子レーザー顕微鏡を用いて観察を行った。慢性脳灌流状態では、深部毛細血管では、leukocyte capillary plugging, 脳表の髄膜血管では leukocyte rolling and adhesion が認められた。

研究成果の概要 (英文)：To understand the role of chronic cerebral hypoperfusion in cerebral small vessel disease, repeated longitudinal in vivo imaging was performed by using two-photon microscopy. Under chronic hypoperfusion, leukocyte plugging in deep capillary and leukocyte rolling and adhesion in pial vessel were detected.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：神経分子病態学, small vessel disease, chronic cerebral hypoperfusion, Two-photon microscopy, capillary plugging, rolling and adhesion

1. 研究開始当初の背景

脳小血管病（ラクナ梗塞、深部白質病変）は、脳血管性認知症、脳血管性パーキンソンニズムの大きな病因と考えられているが、その詳細はほとんどわかっていない。今後、超高齢化社会を迎えるにあたり、その症例数は激増することが予測され、その病態を解明することは、急務である。

2. 研究の目的

脳小血管病は、その名のごとく、病変の主座が、脳の小血管 (lipohyalinosis, arteriolosclerosis and cerebral amyloid angiopathy) にあり、この脳小血管障害に伴う

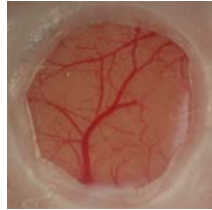
慢性脳低灌流がその白質病変形成には大きな役割を担っていると考えられている。しかしながら、その詳細な病態に関してはほとんどわかっていない。その慢性に経過する病態上、その病態解明には、長期にわたる観察が必要不可欠である。今回の研究では、二光子レーザー顕微鏡を用いた、長期にわたり、繰り返し観察可能な in vivo model を確立し、このモデルを用いて、慢性脳低灌流状態における脳病態を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

慢性脳低灌流モデル

二光子レーザー顕微鏡下での観察の為、Green fluorescent protein transgenic mice [GFP-Tg mice; C57BL/6 TgN(b-act-EGFP)Osb] を使用。このマウス脳では、二光子下では、血管内皮細胞、周皮細胞、星細胞、白血球、血小板などは、蛍光陽性として観察可能、その形態から個々の細胞の同定が可能である。慢性脳低灌流状態は、両側の総頸動脈に外側から microcoil を装着させることにより作成した。

左頭頂葉に 4 x 4mm の開頭を行い、カバーガラスとデンタルセメントを用いて windows を作成した。この window を通し二光子レーザー顕微鏡を用いて長期間にわたる繰り返しの観察を行った。



慢性脳灌流前、直後、一週間後、二週間後と一カ月にわたり、繰り返しの観察を行った。SR101 投与にて Plasma Labeling を行った。

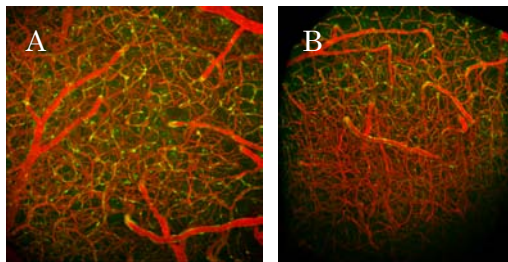
脳血流評価

二次元レーザー血流計にて慢性脳低灌流状態での血流低下を評価した。また、二光子レーザー顕微鏡下で line scan を行うことにより、動脈の in flow velocity と静脈の out flow velocity を測定した。

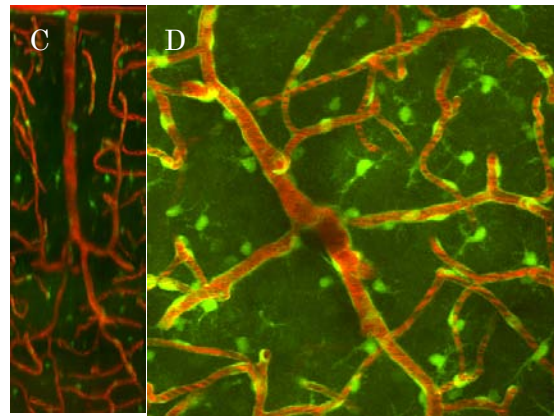
4. 研究成果

1) 二光子レーザー顕微鏡を用いた長期 Follow model

今回作成したモデルでは、脳表から 600 μ m 程度までの深度を約一カ月にわたり、繰り返し観察可能であった。

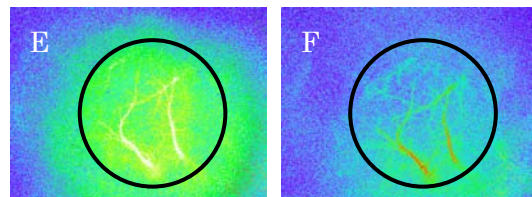


深度 600 μ m までの maximal intensity projection image (A) と 3D reconstruction image (B). 脳表から深部までわたる microvasculature が鮮明に認められる。SR101 plasma labeling : Red, astrocyte Pericyte : Green. この microvasculature の中で、細動脈を脳表から、600 μ m の深部まで連続観察することにより、artery から capillary にかけての動脈の全体像を詳細に観察することが可能であった。また、astrocyte と pericyte が形成する neuro-gila-vasculaer unit を詳細に観察することが可能であった。



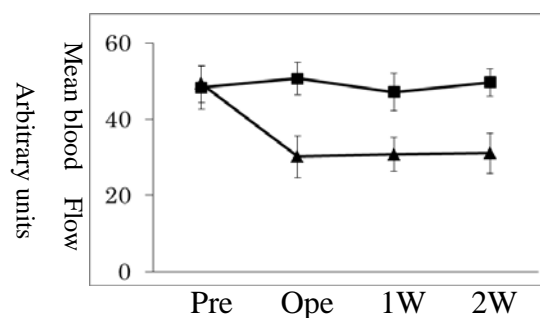
脳表から深部までわたる細動脈全体像 reconstruction image (D), 細動脈の深部分岐部での maximal intensity projection image (E)。arteriole から capillary にかけて血管構造が詳細に観察された。また Astrocyte と pericyte で構成される、neuro-glia-vascular unit が詳細に観察された。

2) 慢性脳低灌流状態における脳血流変化
Cranial window を通して、脳血流の変化を二次元レーザードップラー血流計を用いて測定した。両側頸動脈狭窄により 50% 程度の血流低下が観察期間中継続して認められた。

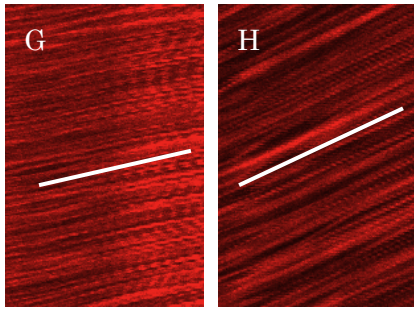


狭窄前 (E) と狭窄後 2 週間 (F) の二次元レーザードップラーイメージ。

脳血流変化

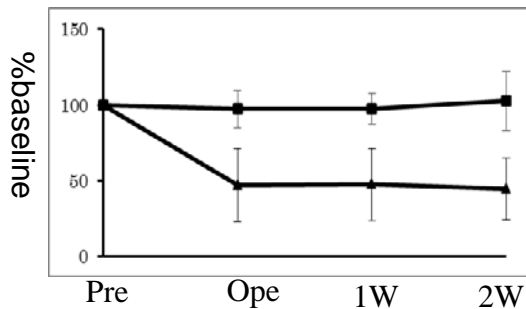


3) inflow velocity と out flow velocity
二光子レーザー顕微鏡を用いて、流入動脈の Velocity と流出静脈の Velocity を測定した。



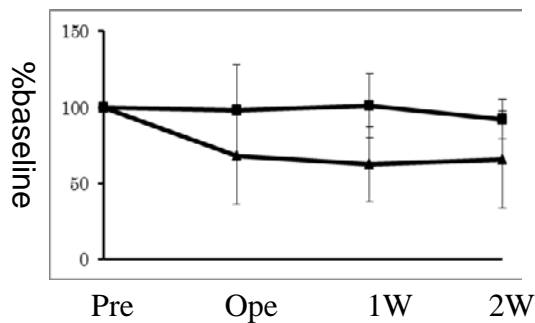
狭窄前 (G) と狭窄 2 週間後 (H) の line scan image. 白線の傾きが velocity を示す。

In flow velocity (pial small artery)



Pial artery の in flow velocity は、狭窄前または、Sham コントロールと比較して 45% 程度の低下を認めた。

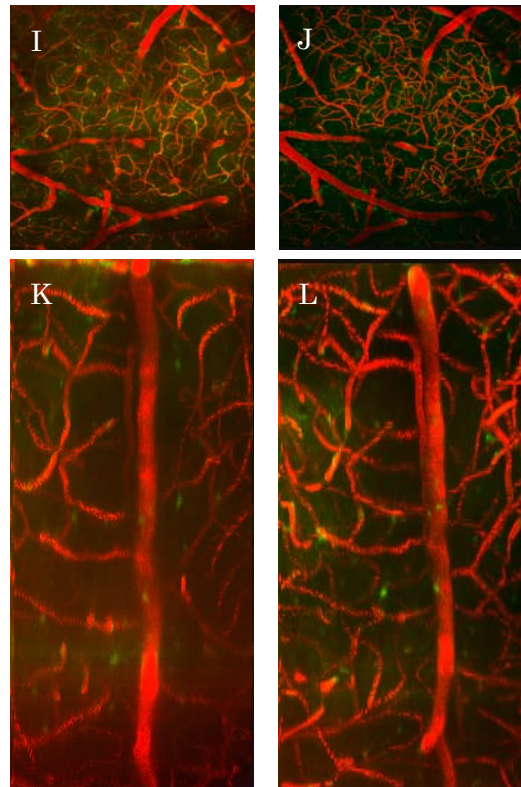
Out flow velocity (pial small vein)



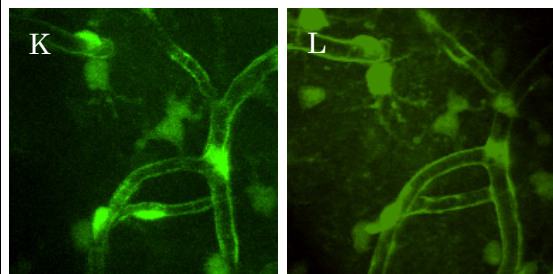
Pial small vein の out flow は狭窄前または、Sham コントロールと比較して 60% 程度までの低下を認めた。

4) 慢性脳低灌流状態における Neuro-glia vascular Unit の変化

慢性脳低灌流状態における穿通血管の形態変化、Capillary の退縮または血管新生、astrocyte と pericyte の形態変化の経時的変化を観察した。



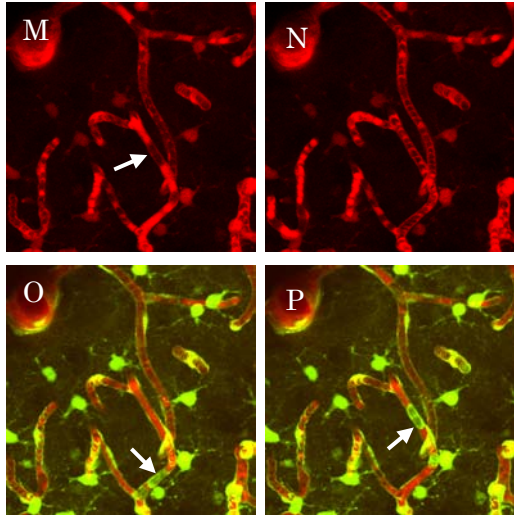
狭窄前 (I)、狭窄 2 週間後 (J) の脳表の microvasculature image. 狭窄前 (K)、狭窄 2 週間後 (L) の穿通動脈の 3D 血管像。Capillary の退縮や新生、穿通動脈の形態的变化 (elongation, meandering, tortuousness) などは慢性脳低灌流下での明らかな変化は認められなかった。



狭窄前 (K)、狭窄 2 週間後 (L) の astrocyte と pericyte の形態学的変化、ともに GFP 陽性の細胞として観察される。慢性脳低灌流下では明らかな形態学的変化は認められなかった。今回の研究では、皮質から皮質深部にかけての経時的変化を観察した。脳小血管病の脳実質の組織学的障害病変としては、皮質下の深部白質病変が主と考えられており、この為、皮質には形態学的変化は認められなかったと考えられる。

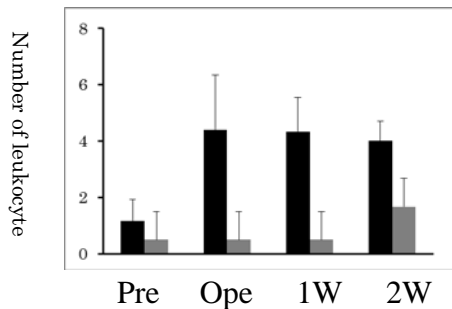
5) 慢性脳低灌流状態における capillary plugging.

慢性脳低灌流下における、深部皮質の hemodynamics の経時的变化を観察した。慢性脳低灌流下では、Capillary に著明な leukocyte の plugging が認められた。

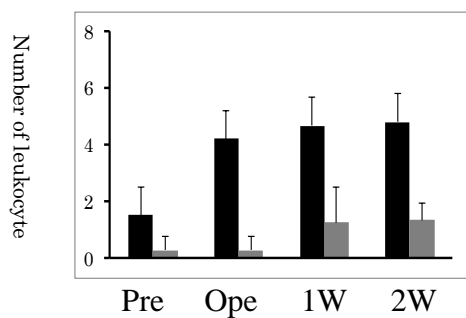


正常な循環状態 (N) では、plasma labeling された血漿の中に赤血球が蛍光陰性の球体として観察された。慢性脳低灌流状態では、Capillary に Plugging した白血球が観察された (M、矢印)。Plugging を起こした、白血球は、また GFP 蛍光陽性として観察される (O、矢印)。Plugging を起こした白血球は、完全に capillary を閉塞する訳ではなく、少しずつ、末梢に移動していく (P、矢印は、O と同一の白血球の 100 秒後の画像)。

細動脈周囲の capillary plugging の頻度

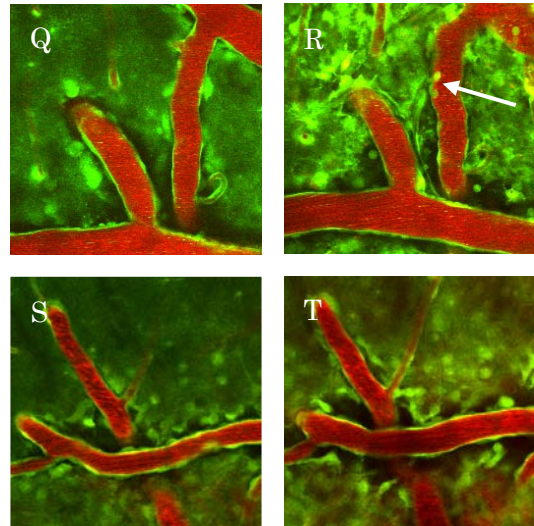


細静脈周囲の capillary plugging の頻度



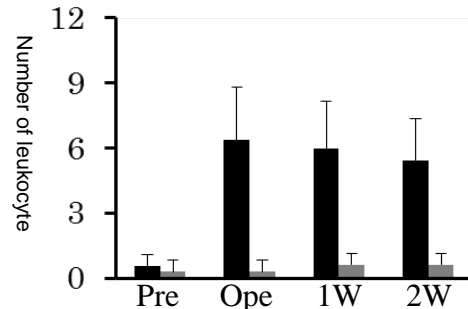
6) 慢性脳低灌流状態における白血球の rolling と adhesion

慢性脳低灌流下における、皮質血管の hemodynamics の経時的变化を観察した。慢性脳低灌流状態では、脳表の血管で白血球の rolling と adhesion が認められた。

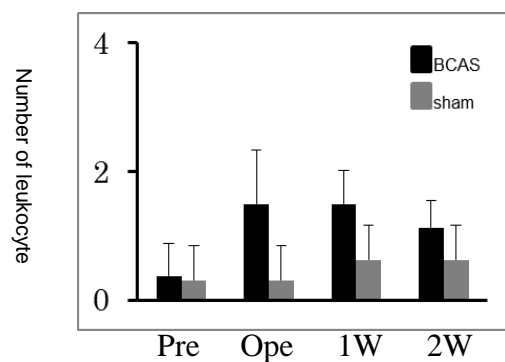


脳表の細動脈と細静脈画像。狭窄前 (Q)、狭窄 2 週間後 (R) の画像。白血球の rolling と Adhesion が細静脈を中心に認められた。Sham 群の手術前 (S)、手術後 2 週間 (T) では、いずれの状態でも rolling と adhesion はほとんど認められなかった。

細静脈の rolling と adhesion の頻度



細動脈での rolling と adhesion の頻度



脳小血管病の病態として、小血管病変に伴う慢性脳低灌流がその病態形成における重要な役割をはたしていると考えられている。今回の、研究では、慢性脳低灌流状態では、白血球の活性化が起り、これがCapillaryを閉塞することにより、さらなる循環障害を起していることが認められた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- 1) Niwa A, Matsuo K, Shindo A, Yata K, Tomimoto H. Clinical and neuropathological findings in a patient with familial Alzheimer disease showing a mutation in the PSEN1 gene. *Neuropathology*, 査読あり、2013;33:199-203
- 2) Dong YF, Kataoka K, Toyama K, Sueta D, Koibuchi N, Yamamoto E, Yata K, Tomimoto H, Ogawa H, Kim-Mitsuyama S. Attenuation of brain damage and cognitive impairment by direct renin inhibition in mice with chronic cerebral hypoperfusion. *Hypertension*. 査読有 2011;58:635-42.

[学会発表] (計 3 件)

- 1) 矢田健一郎、2012年4月27日 福岡
第37回 日本脳卒中学会
2 光子励起レーザー顕微鏡を用いたマウス慢性脳低灌流状態における微小循環動態の評価
- 2) 矢田健一郎、2011年5月18日 名古屋
第52回日本神経学会
2 光子励起レーザー顕微鏡を用いた頸動脈閉塞症の微小循環動態のreal time観察。
- 3) 矢田健一郎、2011年3月25日 東京
第36回日本脳卒中学会
2 光子励起レーザー顕微鏡を用いたマウス頸動脈狭窄性病変モデルにおける血行動態の評価

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢田 健一郎 (YATA KENICHIRO)
三重大学・大学院医学系研究科・産学官
連携研究員
研究者番号： 40467361

(2) 研究分担者

富本 秀和 (TOMIMOTO HIDEKAZU)
三重大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号： 80324648