

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 29 年度

受付番号 259

氏 名 服部 頼 都

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地：ニューヨーク（国名：アメリカ合衆国）2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。選択的白質梗塞モデルを使用した脳梗塞の病態解明と新規治療法の開発3. 派遣期間：平成 29 年 4 月 1 日 ～ 平成 31 年 3 月 19 日

4. 受入機関名及び部局名

Weill Cornell Medicine, Feil Family Brain and Mind Research Institute5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1～4 に記入の上、併せて提出すること。

これまで新規脳虚血治療法の開発がほとんど失敗に終わった原因の一つに、**既存の脳虚血モデル動物が脳灰白質を中心とした脳虚血モデル**であったことが挙げられる。しかし、実臨床では過半数の脳梗塞患者は脳白質に脳梗塞を発症しており、その機序は、灰白質と異なり、白質は髄鞘を構成する脂質が豊富であることから、脂質過酸化などの**酸化ストレス**が脳傷害を増強する。さらに、活性酸素の一種スーパーオキシド (O_2^-) は、一酸化窒素 (NO) と反応するとパーオキシナイトライト ($ONOO^-$) を生成し、脂質過酸化、DNA 傷害などを加速させ、本来血管拡張物質である NO の脳保護効果を消失させる、という仮説が提唱されているが、この仮説を元にした新規治療薬は依然見いだせていない。

両側総頸動脈狭窄慢性脳低灌流モデルは、脳白質に虚血傷害を示すことから、そのモデルを使用して、**両側総頸動脈狭窄 (BCAS: bilateral common carotid artery stenosis) 手術**後の酸化ストレスの推移、炎症性変化（アストロサイトの発現）の推移などを確認することとした。

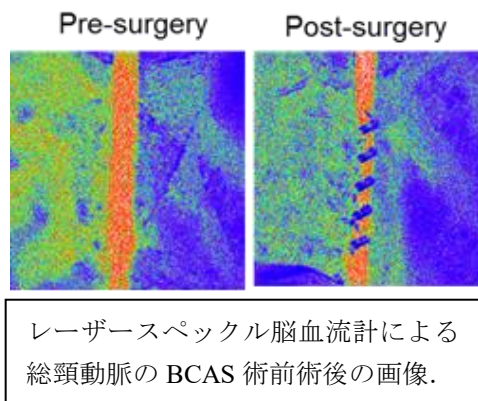
まず、BCAS 術後の脳血流 (CBF) 推移を確認した。図 1, 2 は総頸動脈 (CCA) を狭窄させる金属製の微小コイル (内径 0.18 mm) の装着前と装着後の画像と CCA の直径である。そして CBF については、術後早期より術前の約 75% 程度まで低下を認めた。その後、徐々に軽度の回復を認め、慢性脳低灌流も再現できた (図 3)。

次に、このモデルの表現型を確認するために認知機能実験を行った。この行動実験を行った理由は、新規治療候補薬投与後に行動、認知機能が改善するかどうかを確認するためのコントロール実験である。その結果、参照記憶は BCAS マウスで障害されず、作業記憶のみ障害を認めた (図 4, 5)。

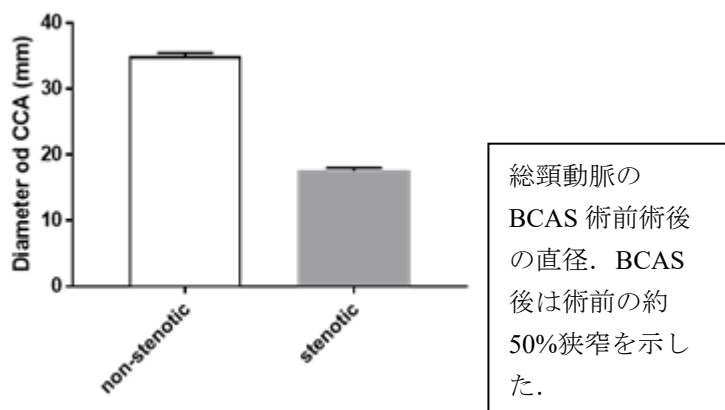
BCAS 術後の脳白質の虚血障害を確認するために、脳白質の大部分を占める脳梁 (CC) のクリューバー・バレラ染色を行い、BCAS 群のみ CC の菲薄化を認めた (図 6)。またグリア増生の程度・変化を確認するために、GFAP 抗体を用いた蛍光免疫染色を用いてアストロサイトの変

化を確認した。大脳灰白質では BCAS 術後のアストロサイトの増生を認めなかったが、大脳白質では、術後 14 日まで緩徐に増生し、その後の 2 週間では横ばいであった。さらに、大脳白質の酸化ストレスの増生、変化を確認するために、8-OHdG 抗体を用いた蛍光免疫染色を行い、急激に CBF が低下した術後早期に酸化ストレスの増加を認め、その後やや低下した (図 7)。また、大脳白質のパーオキシナイトライト (ONOO⁻) の増生、変化を確認するために、3-NT 抗体を用いた免疫染色を行い、酸化ストレス同様に術後早期に増加を認め、その後緩徐に低下をする経過であった (図 8)。

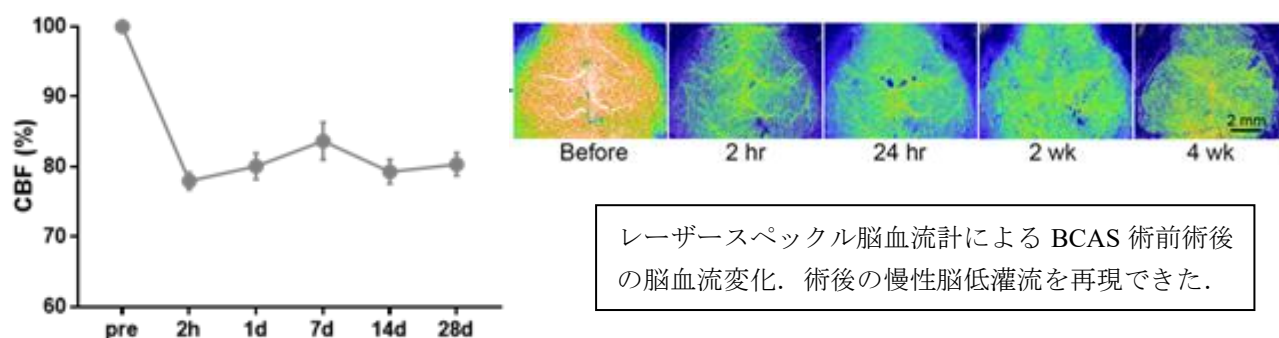
(図 1)



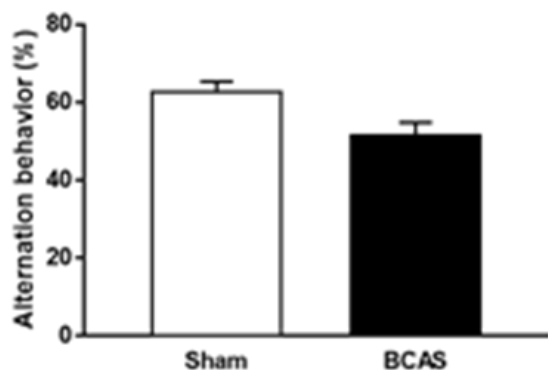
(図 2)



(図 3)

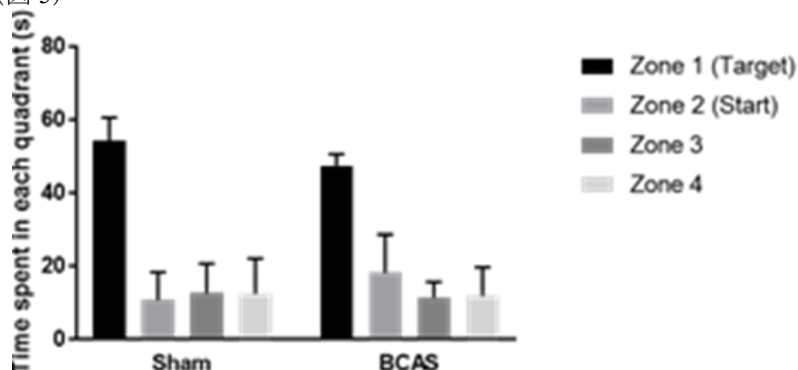


(図 4)



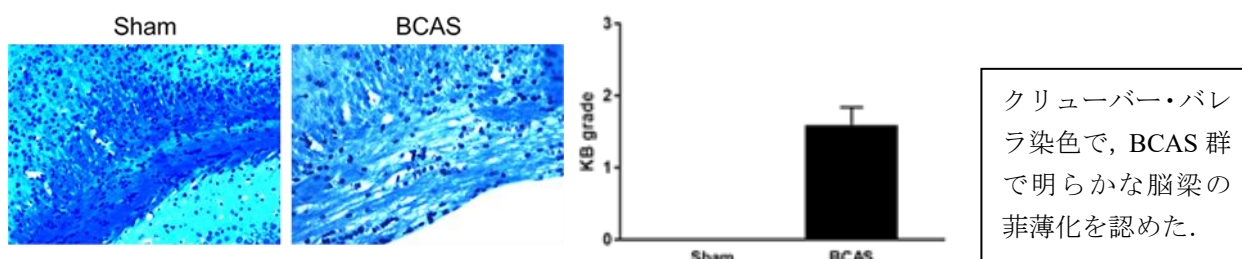
Y 迷路試験にて、BCAS 群のみ作業記憶低下を認めた。

(図 5)

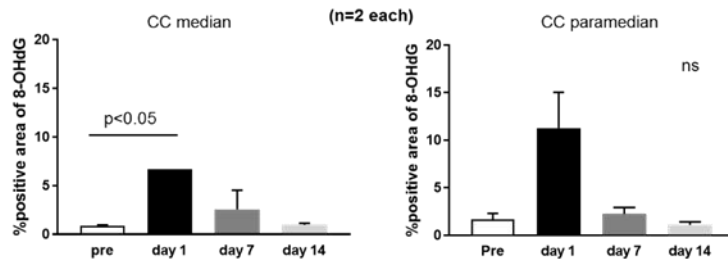
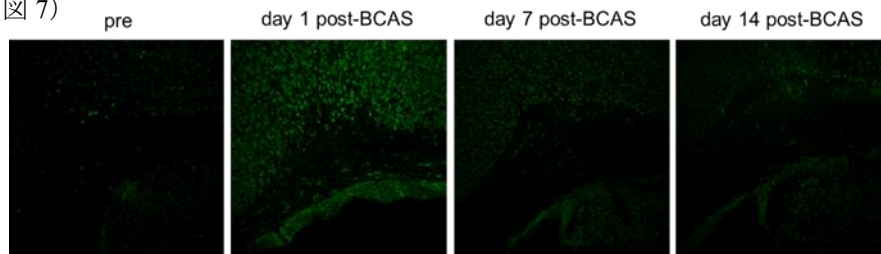


Barnes 迷路試験では、BCAS 群と偽手術群で差を認めず、BCAS 群で参照空間記憶障害は認めなかった。

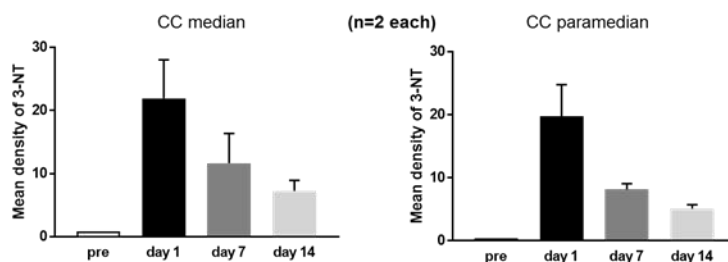
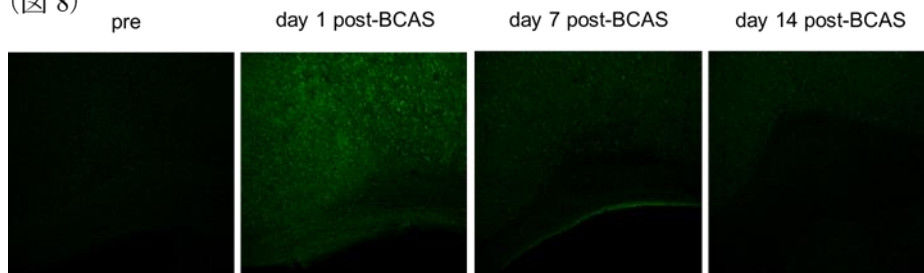
(図 6)



(図 7)



(図 8)



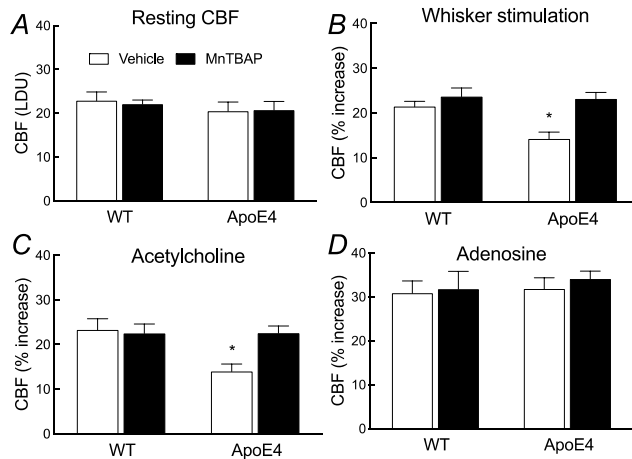
BCAS マウスの術前後の
 脳白質（脳梁）における
 酸化ストレス（図 7）
 パーオキシナイトライト
 （図 8）を免疫組織化学で
 定量した。双方とも術直
 後で最も増加しており、
 慢性期に至るにつれて
 徐々に低下する。

上記より、虚血性脳白質傷害は、スーパーオキシド、パーオキシナイトライトによる酸化ストレスに伴って増悪し、作業記憶にも影響を与えることが判明した。

そこで、われわれは、虚血性脳白質傷害の増悪に関与するファクターとして、脳血管基底膜に存在している **perivascular macrophage** に注目した。perivascular macrophage は酸化ストレスの発生源となりうるということがにわかに報告され始めており (Park *et al*, *Circ Res* 2017)、これを脳内から除去することが、虚血性脳白質傷害によって生じる脳梗塞、血管性認知症の新規治療法になりうると仮説を立て検証することとした。その際に、われわれは元来、ヒト ApoE4 遺伝子を組み込んだマウス (ApoE4-TR) は、野生型マウス (WT) と比較して酸化ストレスをより多く発現することが分かっており (図 9)、虚血性脳白質傷害治療において、ヒト ApoE4 遺伝子を手掛かりに治療法の探索を行った。

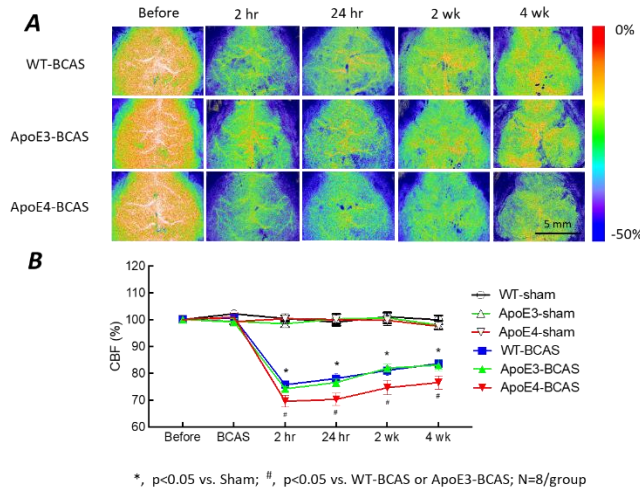
そのために、まずは WT, ApoE3-TR, ApoE4-TR そのものに BCAS 手術を行い、虚血性脳白質傷害を惹起した。BCAS 手術後の CBF 推移を図 10 に示す。ApoE4-TR は、BCAS 手術直後から 1 か月間、CBF はより低下した。しかし、この脳血流はレーザースペックル脳血流計にて測定したものであり、脳表血流しか測定できないため、脳白質の深部の CBF 推移は依然不明である。共同研究者の Prof. Chris Schaffer の研究室は、深部である脳白質の CBF を測定できる 3-photon microscopy を所有しており、それを活用して深部の脳白質の CBF を測定した。図 11 より、ApoE4-TR は、BCAS 術後、脳白質においても、ApoE3-TR と比較して有意に CBF が低下していることが証明された。その CBF 低下に応じて、BCAS 術後の ApoE4-TR の脳白質は有意に菲薄化しており、髄鞘も有意に障害されていた (図 12)。さらに、BCAS 術後の ApoE4-TR で、ApoE3-TR, WT と比較して有意な作業記憶障害を認めた。

(図 9)



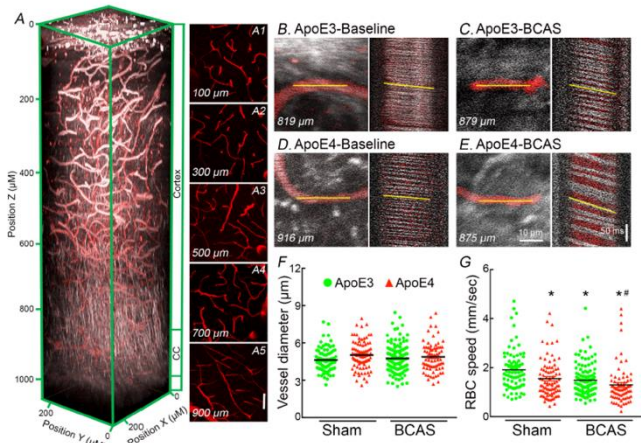
Free radical scavenger の MnTBAP を脳表に灌流し、各種刺激による脳血管反応性を確認した。安静時 CBF に関しては、MnTBAP 脳表灌流後も変化は認めなかったが (A), neurovascular function の指標となる whisker stimulation (B), 血管内皮のアゴニストである アセチルコリン (C) を脳表灌流すると、ApoE4-TR で障害を受けていた血管反応性が WT と同様の血管反応性にまで改善した。血管平滑筋に関与するアデノシン (D) は変化しなかった。

(図 10)



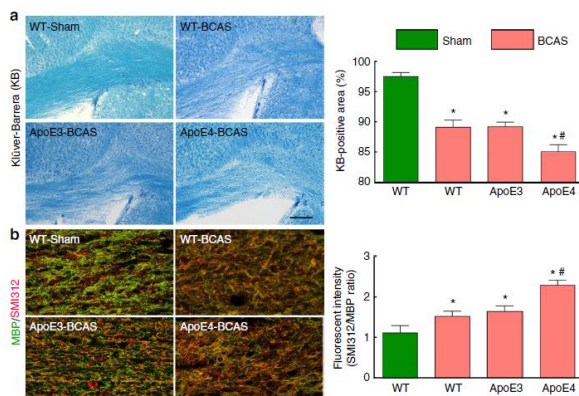
レーザースペックル脳血流計による脳表血流の推移を左図に表している。BCAS 手術直後から 1 か月間、一貫して、ApoE4-TR マウスの脳表血流が最も低下している。

(図 11)



3-photon microscopy による大脳白質 CBF 測定。 (A) 脳表から大脳白質までの全体図とそれぞれの深度における脳血管構造 (A1-A5)。A5 の深さが白質に相当するが、白質血管は比較的直線的であることから灰白質と区別できる。 (B-E) 血管内赤血球移動を line scan にて追跡。 (F) ApoE3-TR と ApoE4-TR の間で血管径は BCAS 手術前後で変化は認めなかった。 (G) BCAS 手術後、ApoE4-TR で有意に赤血球速度 (CBF に相当) が低下した。

(図 12)



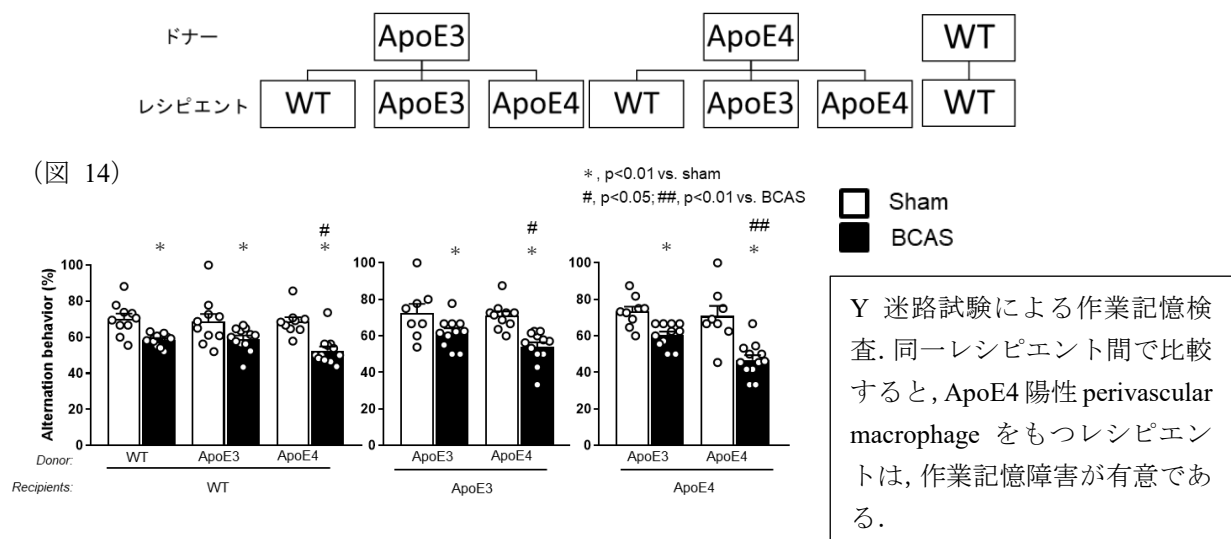
BCAS 術後の ApoE4-TR において、クリューバー・バレラ染色 (KB) で最も白質が菲薄化し、myelin basic protein (MBP; 緑色), SMI312 (赤色) の二重蛍光免疫染色にて、髄鞘の障害も著明であった。

以上より、ApoE4-TR では、酸化ストレスが過剰に発現しているため、大脳白質の脳血流がより低下し、虚血性大脳白質傷害が加速しうることを示すことができた。この結果は、2018 年に Nature Communication より報告を行った(本報告者は co-first author)。また、2019 年 2 月に行われた American Heart Association による International Stroke Conference にて、Vascular Cognitive Impairment Award を受賞した。

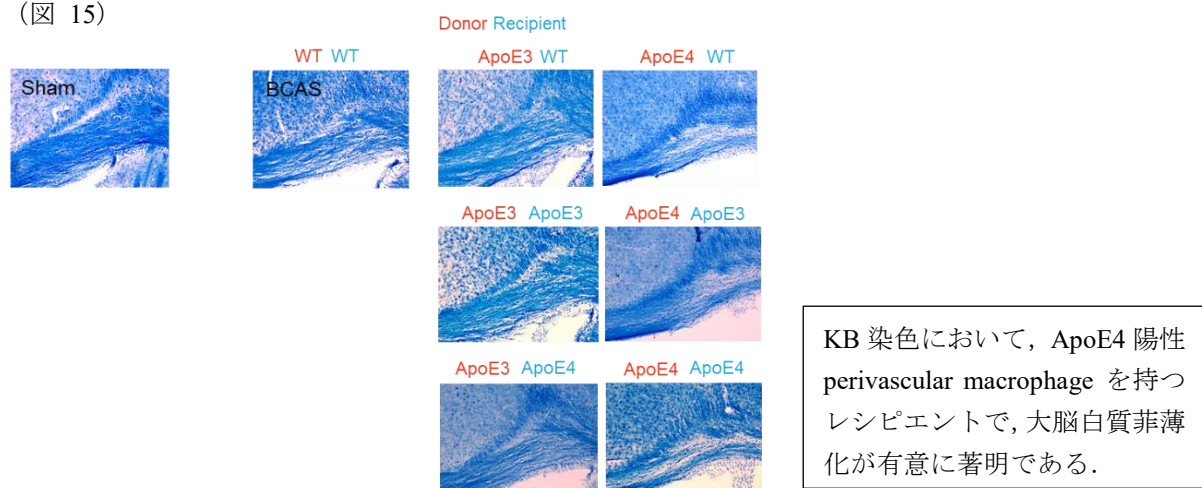
以上より、上記のメカニズムとして、より広範な虚血性大脳白質傷害を持ちうる ApoE4 キャリアでは、perivascular macrophage による酸化ストレスが特に増加しており、perivascular macrophage の除去が虚血性大脳白質傷害の新規治療法となりうると仮説を立て、探索を進めることとした。

われわれはすでに、perivascular macrophage は骨髄移植にてドナーからレシピエントに移植できることを報告している (Faraco *et al*, *J Clin Invest* 2016)。WT, ApoE3-TR, ApoE4-TR をドナー、レシピエントとして骨髄移植を行い (図 13), WT もしくは ApoE3-TR をコントロールとした。各群で BCAS を施行して、認知機能変化、大脳白質の病理学的検索、脳血流変化を探索した。移植される perivascular macrophage の数は、WT, ApoE3-TR, ApoE4-TR のいずれがレシピエントであっても受容能力に差は認めなかった。まず、認知機能の変化を確認した。作業記憶は、ApoE4 ドナー由来の perivascular macrophage を持つレシピエントで有意に障害されていた (図 14)。次に、病理学的検索を行った。前述の study 同様に、KB 染色と MBP 染色を行い、ApoE4 ドナー由来の perivascular macrophage を持つレシピエントで、有意に大脳白質菲薄化を示し、それに応じて髄鞘の障害を認めた (図 15, 16)。この認知機能障害、大脳白質傷害の原因を調べるために、CBF 変化を確認した。CBF 変化においても、一貫して、ApoE4 陽性 perivascular macrophage を持つレシピエントで有意な CBF 低下を認めた (図 17)。このことから、perivascular macrophage が、CBF 低下による虚血性大脳白質傷害、認知機能障害において重要な役割を果たしていることが十分に認識できる。

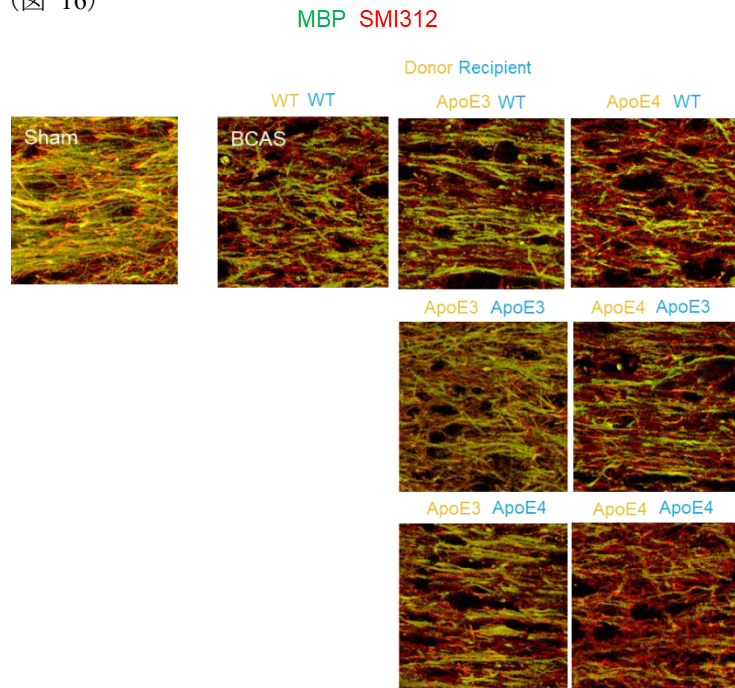
(図 13)



(図 15)

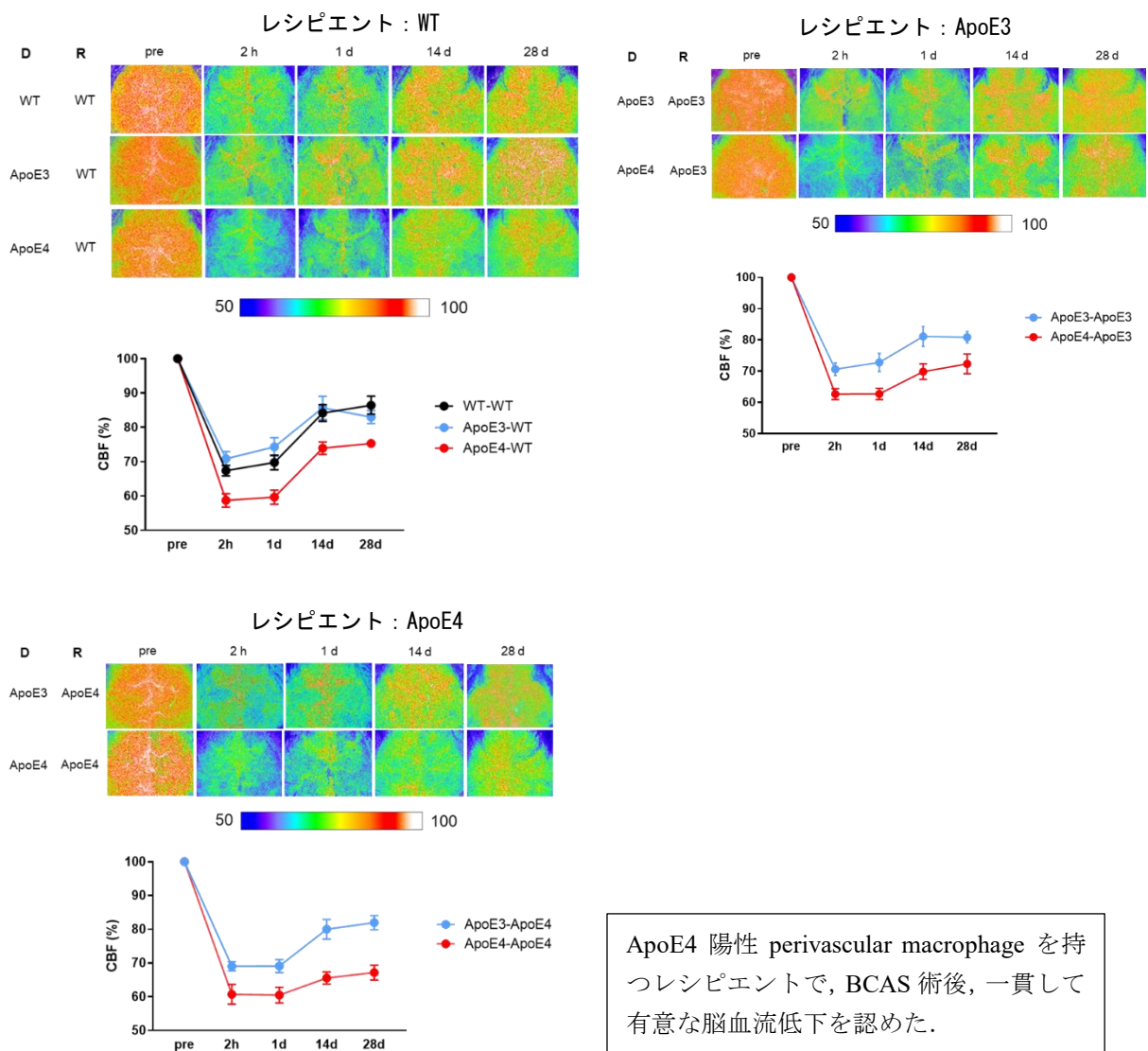


(図 16)



myelin basic protein (MBP ; 緑色), SMI312 (赤色) の二重蛍光免疫染色において, ApoE4 陽性 perivascular macrophage を持つレシピエントで, 髄鞘の障害が著明であった。

(図 17)



perivascular macrophage を除去することで、酸化ストレスの発生を抑制し、本来血管拡張物質である一酸化窒素の脳保護効果をいかに発揮させることができる可能性がある。

この研究は現在進行形であるが、2019 年 5 月の日本神経学会学術大会と 2019 年 7 月の Brain にて、この研究の現状を発表する予定である（受理済）。