

学 位 論 文 の 要 旨

広島大学大学院統合生命科学研究科
生命医科学プログラム
学生番号 D194634
氏 名 田中 美樹

論文題目

脳梗塞後に生じる血管原性浮腫の形成および進行におけるミクログリアの役割
(A role of microglia in the formation and progression of vasogenic edema after ischemic stroke)

論文要旨

脳梗塞は脳血管の閉塞により脳の血液循環が障害される疾患であり、重度の神経機能障害をもたらすことで生涯にわたり患者の生活の質 (quality of life; QOL) を悪化させる。その罹患率は極めて高いうえ高齢化進行による患者数の急増が危惧されており、患者の QOL 向上は全世界において喫緊の課題である。QOL 向上のためには急性期の治療が重要である。しかし、2022 年現在、最も有効な治療法である静注血栓溶解療法や血栓回収療法は適用条件が厳しいため、9 割以上の患者は適応外 (禁忌) となり血流回復による治療が不可能である。

脳梗塞発症後、虚血の持続により種々の二次障害が生じ、病態が重症化する。なかでも脳浮腫は脳実質に過剰量の水分が蓄積するものであり、脳体積増大による脳機能低下や脳ヘルニアを発生させることで患者の転機を著しく悪化させる。脳浮腫の軽減は非常に重要な臨床課題であるが、詳細な病態形成メカニズムは不明であるために根治療法は存在しない。脳浮腫は水分の蓄積場所により 2 つに大別される。血管原性浮腫は血液脳関門 (blood brain barrier; BBB) の機能障害により細胞外腔に水分が蓄積する浮腫であり、脳体積増加の直接的な原因となる。主な研究対象はアクアポリン 4 (aquaporin 4; AQP4) などの水チャネルやイオントランスポーターであり、水の流入抑制を狙いとしている。しかし、これらの因子は水の排出経路としても機能するため顕著な効果は期待しがたい。

水の流入制御に代わる治療法として、炎症制御がある。血管原性浮腫の病態形成には BBB の機能障害が重要であることから、血管透過性亢進に関与する因子の発現制御が有効だと考えられる。虚血後には中枢神経系の免疫細胞ミクログリアや、好中球、T 細胞、B 細胞などの末梢からの浸潤細胞により種々の血管透過性亢進因子が産生される。しかし、永久虚血下ではこれらの浸潤細胞の増加は認められず、治療効果が乏しいことが動物モデルを用いた研究により報告されている。さらに、脳梗塞患者の脳組織標本を用いた病理解析においても顕著な活性化を示すのはミクログリアであることが報告されている。上述の背景を踏まえ、永久虚血下において生じる血管原性浮腫の形成および進行過程を精査し、特にミクログリアに着目して有望な治療標的を見出すべく、2015 年より研究を開始した。

第2章では、永久虚血下において生じる脳浮腫の形成過程を時空間的に解析した。脳浮腫を評価する際には、一般的に、乾湿重量測定法が用いられる。しかしこの手法は脳水分量を算出できるのみであり、脳浮腫の動態については明らかにできない。そこで、生体内に存在する水素原子核（プロトン）の空間分布を解析することにより水分量の多い領域を描出できる核磁気共鳴画像法（magnetic resonance imaging; MRI）を用いた。T2強調画像（T2-weighted image; T2WI）によりマウス脳を撮像すると、線条体を含む虚血中心部において水分量が上昇をはじめ、時間経過により浮腫範囲が増大することが明らかになった。トリフェニルテトラゾリウムクロライド（2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride; TTC）染色により脳虚血後の死細胞塊（梗塞巣）を同定すると、浮腫が生じた領域ではその後に梗塞巣が形成されることが判明した。さらにT2WIとTTC染色画像の重ね合わせにより血管原性浮腫を描出した結果、血管原性浮腫は虚血6時間後から虚血中心部において生じ、時間の経過とともに虚血辺縁部へと進行することが判明した。

第3章では、第2章で明らかにした血管原性浮腫の形成過程におけるミクログリアの役割を調べた。浮腫形成前後の各タイムポイントにおいてIba1とCD68の二重免疫蛍光染色や炎症性因子の発現解析を行い、ミクログリア活性状態を評価した。その結果、ミクログリアは虚血中心部において顕著な活性化をはじめ、時間経過とともに虚血辺縁部へと活性化が進行する様子が認められた。炎症性因子による内皮細胞への影響を調べるため、マウス脳微小血管内皮細胞bEnd.3を培養した。TNF- α とIL-6を処置すると、タイトジャンクションタンパク質（tight junction proteins; TJPs）発現が顕著に低下しており、これらの炎症性因子が血管透過性を亢進させることで血管原性浮腫が形成されることが示唆された。さらに、ミクログリア活性化抑制による血管原性浮腫への影響を検討するためミノサイクリン（minocycline; MINO）を投与すると、MINO投与群では血管原性浮腫の進行が顕著に抑制され、虚血24時間後の神経機能障害が有意に改善された。

第4章では、虚血後の炎症制御因子として芳香族炭化水素受容体（aryl hydrocarbon receptor; AhR）に着目した解析を行なった。炎症下においてAhRは、外部環境に応じて相反する炎症反応を惹起する。しかし、虚血性脳浮腫に対する作用は不明であるため、神経炎症および血管原性浮腫におけるAhRの役割を検討した。虚血後マウス脳では、AhR下流標的遺伝子である薬物代謝酵素CYP1A1や炎症関連因子IL-1 β 、TNF- α およびCOX-2が発現上昇した。AhR阻害剤CH223191を投与すると、これらの遺伝子の発現増加や血管原性浮腫の形成、および神経障害度が抑制され、AhR阻害により虚血後の脳障害が改善することが示された。THP-1マクロファージにAhRリガンドを処置すると、特に炎症条件下においてNADPH oxidase (NOX) サブユニットp47phoxが有意に発現上昇した。アポシニン処置によるNOX活性の抑制、またはSuper oxide dismutase (SOD) 処置によるスーパーオキシドの除去を行うと、AhRリガンドにより誘導されるTNF- α 発現が減少した。また、AhRリガンドはマウス初代ミクログリアにおいてp47phoxの発現を惹起した。したがって、p47phoxは酸化ストレスとそれに続く炎症に重要である可能性がある。永久虚血マウスでは、虚血によりミクログリアでのP47phoxの発現が上昇した。pMCAOによって誘導された脂質過酸化は、CH223191によって抑制された。これらの結果より、虚血後の神経炎症および血管原性浮腫の発生には、p47phoxの発現上昇とそれに続く酸化ストレス亢進が関与することが示唆された。

本研究では永久虚血下において生じる脳浮腫の時空間的な形成過程を精査し、虚血中心部から虚血辺縁部へと血管原性浮腫が進行する様子を明らかにした。また、血管原性浮腫の形成に先行してミクログリアが活性化の様相を呈し、血管透過性亢進因子による内皮細胞タイトジャンクションタンパク質（tight junction proteins; TJPs）の発現低下により血管原性浮腫が形成され

る可能性を示した。さらに、ミクログリアの炎症制御因子として AhR に着目し、AhR-NOX2 経路を介した神経炎症の抑制により血管原性浮腫を軽減できることを明らかにした。研究により得られた成果は、脳虚血における AhR の病態生理学的役割の一端を示すものであり、脳浮腫の治療薬開発に資する基礎的知見を提供するものである。