

大血管性脳梗塞モデルの作成と遺伝子治療の脳機能による評価（2）

分担研究者 小野文子（社団法人 予防衛生協会）
協力研究者 川原信隆（東京大学 脳神経外科）
飯島 明（東京大学 医学部附属病院）
大宅宗一（東京大学 大学院）
土田順子（医薬基盤研 霊長類医科学研究センター）
和田直巳（山口大学農学部 獣医生理学）
斉藤直之（社団法人 予防衛生協会）

研究要旨

血管性脳障害に対する治療法の開発は世界的な急務であり、ヒトへの応用を考えた場合、脳の構造と機能がヒトと類似した霊長類モデルは不可欠である。血管性脳障害に対する遺伝子治療法開発において、スナネズミで得られた成果をヒトに臨床応用するためには、サルを用いた安全性、有効性評価が不可欠である。

20 頭のカニクイザルを用い、全脳虚血、中大脳動脈虚血、マイクロビーズによるラクナ梗塞、ローズベンガルによる局所脳梗塞を作成し、梗塞部位周辺の組織について病理検索をおこなうとともに、タンパクおよび遺伝子発現の変化の解析に材料を採取した。また、有効性評価のためのモデル系の作出と評価系の確立を行い、ベクターの有効性評価に有用なシステムの構築を進めている。

キーワード：カニクイザル、脳梗塞、MRI、全脳虚血

A. 研究目的

超高齢化社会の到来を目前にして、老人病の克服は緊急の課題となっている。なかでも血管性痴呆症は患者数の多さ、高齢者の QOL の低下や孤立化をもたらすだけでなく、社会的な負担も著しく増大させる最も深刻な疾患であることから、新規治療薬の探索や、遺伝子治療・再生医療などの新医療技術開発へ向けた研究が進められている。我々はこれまでにスナネズミの内頸動脈結紮による脳梗塞モデルを用いて GDNF 搭載センダイウイルスベクターによる遺伝子治療を行い、梗塞 4 時間後のベクター投与でも神経細胞死を防止できること、梗塞後 28 日の評価でも有効であるという成果を得ている。本研究ではスナネズミで得られた成果をヒトへ応用するための前臨床試験として、カニクイザルの脳梗塞モデルを作成し、センダイウイルスベクターを用いた脳梗塞遺伝子治療の有効性と安全性を評価することを目的とする。

B. 研究方法

1. 動物

カニクイザル 20 頭（3~22 歳、雌雄）を用いて脳梗塞モデルの作成を行った。

中大脳動脈閉塞、マイクロビーズおよびローズベンガルによるラクナ梗塞モデルは別項に述べたので、全脳虚血モデル作成方法について述べる。

手術前に pre-ischemia の MRI を撮影（T1WI, T2WI）。血液検査・CSF 採取、行動観察、ビデオ撮影、食物回収試験およびアップルテストを実施した。

麻酔導入はケタミン 8-10mg/kg、アトロピン 0.05mg/kg im を前投与し、isoflurane 0.8%/酸素 50%・N₂ 50% で維持した。梗塞作成中は、脳温は、正中頭頂部での頭蓋骨温を測定し、赤外線ランプで 37-38℃ に調整した。

伏在静脈に静脈ラインを確保し、適宜血圧をみながら電解質溶液の点滴を 10-30 ml/hr の範囲で調節した。左大腿動脈に留置するシースもしくは尾動脈を A-line として観血的血圧測定を行った。EtCO₂ と血液ガスの結果を参照し呼吸数および換気量を調整した。

頭部皮下電極を設置し脳波測定し、虚血開始

時間と脳波平坦化時間を記録した。

血管内手術は、左右の femoral artery を露出し、それぞれに 4F シース挿入し、カテーテルが挿入されたら、静脈ラインよりヘパリン 500 単位 iv。その後術中は 1 時間に 1 回 100 単位静注で維持した。

親カテで aortography を行い、左右の総頸動脈の走行を確かめる。ここで、

① 左総頸動脈が右腕頭動脈から分岐→右腕頭動脈起始部と左鎖骨下動脈の 2 カ所にバルーンを留置。

② 左総頸動脈が大動脈弓から分岐する場合は、右 femoral artery からのカテを右腕頭動脈、左 femoral artery からのカテを左鎖骨下動脈へ留置。さらに、左頸部に皮膚切開を加え、頸部で左総頸動脈にクリップをかけられる状態にする。

上記の catheter の配置が終了したら、血圧を確認し 8-20 分間の閉塞を行った。閉塞中、脳波の平坦化、瞳孔の散大を確認し、血圧上昇が認められた場合は、シースから脱血して安定した血圧を維持した。

C. 研究結果

1. 脳梗塞モデル作成および材料提供

これまで、本研究班において、20 頭のカニクイザルを用いて脳梗塞モデル作成および病理および蛋白解析への材料提供を行った。

(Table 1)。中大脳動脈再灌流モデルについては 7 例を用いてモデル系確立の検討を行い、安定したモデル系を確立することができた(他章にて報告)。マイクロビーズによるラクナ梗塞モデルでは 4 例中 2 例において評価に適切な梗塞モデルが確立でき、行動学的評価を実施した。死亡した 2 例中 1 例目はカテーテル導入部からの出血が誘引であり、4 例目は術前より不整脈が認められていたことから、手術の侵襲負荷とともに重度脳浮腫を誘発した可能性が考えられた。

ローズベンガルによる局所脳梗塞作成において、死亡した 2 例ではローズベンガルの代謝が遅延したことによる多臓器への負荷が原因と考えられた。

術後の血清酵素、GPT, GOT, LDH 及び CPK において生存した動物、死亡した動物とも術後顕著な上昇が認められた。しかし、生存した動物においておずれも 1 週間以内に術前の値に回復しており、一過性の組織障害による変動と考えられた (Fig. 1)。

これら死亡した動物を含め実験に用いた動物において、病理学的検索及びタンパク及び遺伝子検索用に材料を採取し、解析を行った。

全脳虚血モデル系確立のために、4 例のカニクイザルを用いた。1 例では虚血が不十分で完全な全脳虚血時間を得ることができず、症状は軽微で MRI 画像上及び組織学的検索においても異常所見は認められなかった。

カニクイザルの血管走行において、左総頸動脈の分岐に個体差があることが判明したため、虚血作成前に血管造影を行い血管走行の確認を行った。4 例中 3 例では左総頸動脈が右腕頭動脈から分岐しているためバルーンによる虚血は右腕頭動脈起始部と左鎖骨下動脈の 2 カ所に留置することで行った。#005 では左総頸動脈が大動脈弓から分岐していたため、右大腿動脈からのカテーテルを右腕頭動脈、左大腿動脈からのカテーテルを左鎖骨下動脈へ留置し、さらに、左頸部から総頸動脈を露出しクリッピングを行うことにより虚血を行った。虚血中の皮質脳波は平坦となり、虚血解除後、脳波の回復を確認した。

4 例中 3 例においては虚血の侵襲が重度で術後から 3 日目までに死亡した。虚血時間を 20 分から 14 分までに短縮して検討を行ったが脳障害が重度で、起立不能、意識障害、ミオクロヌス症状が認められ、症状の回復をみることなく死亡したことから、さらに短縮した虚血時間を検討する必要がある。

症状が重度であった 3 例において、術後の MRI が撮像できたのは #011 のみであった。T2 強調 MRI 像において海馬のみならず、線条体、皮質に脳梗塞を確認した (Fig. 2)。

病理組織学的検索では術後 1 日目に死亡した例では死亡までの時間が短く、神経細胞死は確認できなかった。3 日目に死亡した #011 では海馬に神経細胞死を確認した。

G. 考察

ヒトへのトランスレーショナルリサーチとして再現性のあるカニクイザルの大血管、微小血管脳梗塞、全脳虚血モデル系を作成し、MRI、脳波、行動解析による高次脳機能解析を用いた評価系を確立することはベクターの有効性を評価する上で必須である。大血管、微小血管脳梗塞については適切なモデル系作出が可能となったが、全脳虚血モデルについてはこれまで

検討した方法では脳障害が重度となり予後不良であるため、虚血時間の短縮を行うことによりモデル系を確立を進めていく必要がある。また、作成した脳梗塞動物の病態解析、病理組織学的解析及び早期発現蛋白・遺伝子の解析を行い適切な治療遺伝子の検索を進める上で有用な材料の提供を行った。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の出願・登録状況

なし

Table 1 脳梗塞モデルサル作成実験の経緯

方法	実験番号	体重	性別	年齢	転帰	術後	症状
全脳虚血	004	2.97	♀	16	死亡	0	20分虚血、起立不能、死亡
	G059	4.52	♂	5	安楽死	7	18分虚血、虚血中の収縮期血圧が250mmHg以上に上昇。症状軽微で、day7でsacrificeするも、画像上・組織学上も異常所見なし。
	011	3.46	♂	3	死亡	3	18分虚血、虚血中の収縮期血圧を100mmHg以下に管理。症状重度で過度の全脳虚血を示唆するミオクローヌス頻発、術後2日目のMRI後死亡、循環障害、浮腫。MRI上、海馬のみならず、線条体・皮質に脳梗塞を確認。組織学的に海馬などに神経細胞死を確認。
	005	4.05	♂	5	死亡	1	前回虚血が強すぎたため、虚血時間を14分へ短縮。虚血中の収縮期血圧100mmHg以下に管理。症状重度で過度の全脳虚血を示唆するミオクローヌス頻発、翌日死亡。死亡後のMRIでは明らかな異常所見なし。動物そのものの死亡時間が早すぎたためか、組織学的にも神経細胞死は確認されなかった。
中大脳動脈閉塞	G001	4.50	♀	23	死亡	1	永久閉塞、起立不能、1日目MRI撮像中に死亡
	001	5.60	♂	11	死亡	1	6時間閉塞、術後起立不能、右側麻痺、翌日死亡
	G060	3.08	♀	6	死亡	3	3時間閉塞、起立不能、翌日、座位後肢麻痺、1日目のMRI撮像後横臥、3日目に死亡
	002	3.52	♀	13	死亡	1	3時間閉塞、起立不能、左側麻痺、翌日、座位、左側麻痺、舌弛緩、1日目のMRI撮像中に死亡
	003	4.97	♂	14	死亡	1	3時間閉塞、大腿部内出血。翌日死亡。
	G051	3.70	♂	4	安楽死	130	3時間閉塞、右側閉塞、無症状、左側再手術、右手、右足多動、症状軽微
	G064	2.85	♂	3	安楽死	35	症状軽度、左下肢不全麻痺、梗塞部位は明確
マイクロビーズ	008	5.44	♂	5	死亡	1	大腿部内出血
	G050	4.28	♂	4	安楽死	66	右半身麻痺
	G068	3.88	♂	6	安楽死	40	右半身麻痺
	G069	3.78	♂	6	死亡	1	死亡11/27マイクロビーズ、不整脈、冠状動脈周囲やや変化
ローズベンガル	001	4.16	♂	5	実験殺	10	材料採取
	G062	2.34	♂	3	死亡	5	6/7、2回目手術、1日後死亡、全身の染色重度
	G026	5.48	♂	6	死亡	1	沈鬱、全身の染色重度
	G052	4.05	♂	4	安楽死	8	材料採取、1d、8d
	G067	3.78	♂	4	安楽死	1	材料採取

Fig.1 脳梗塞後の血液生化学マーカーの変動

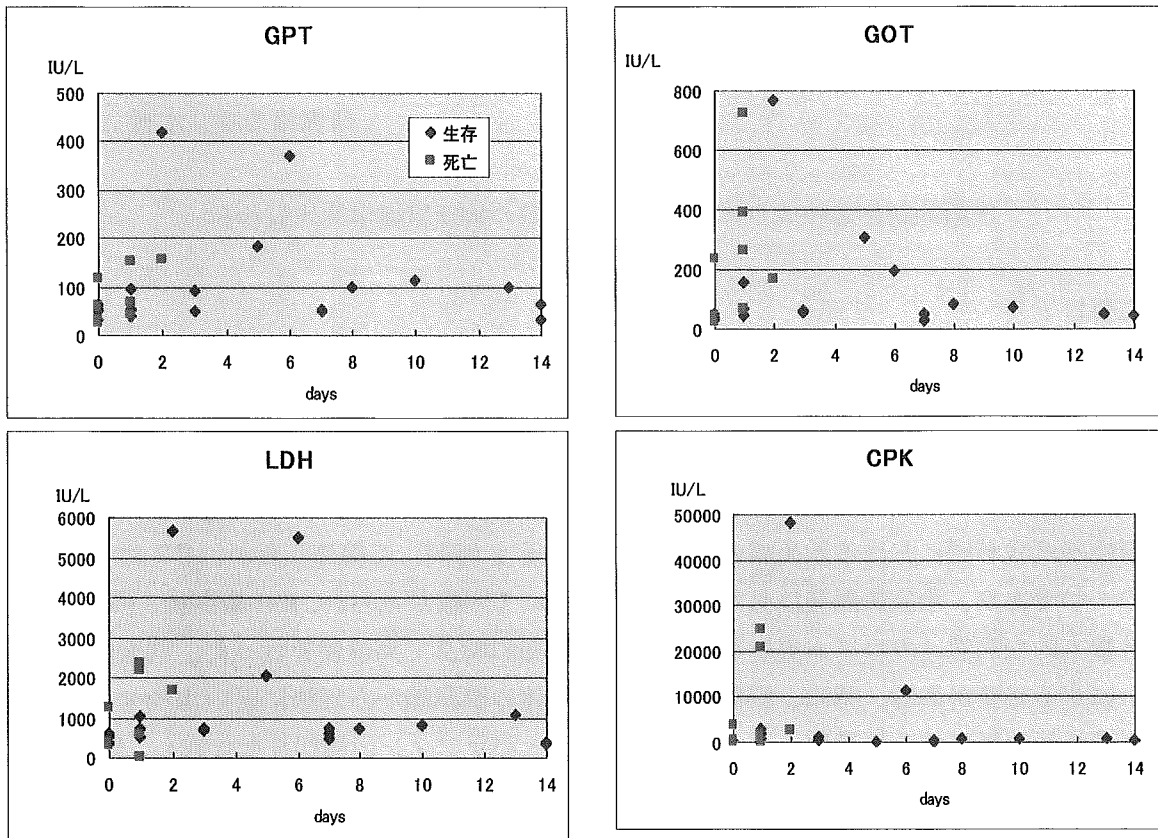
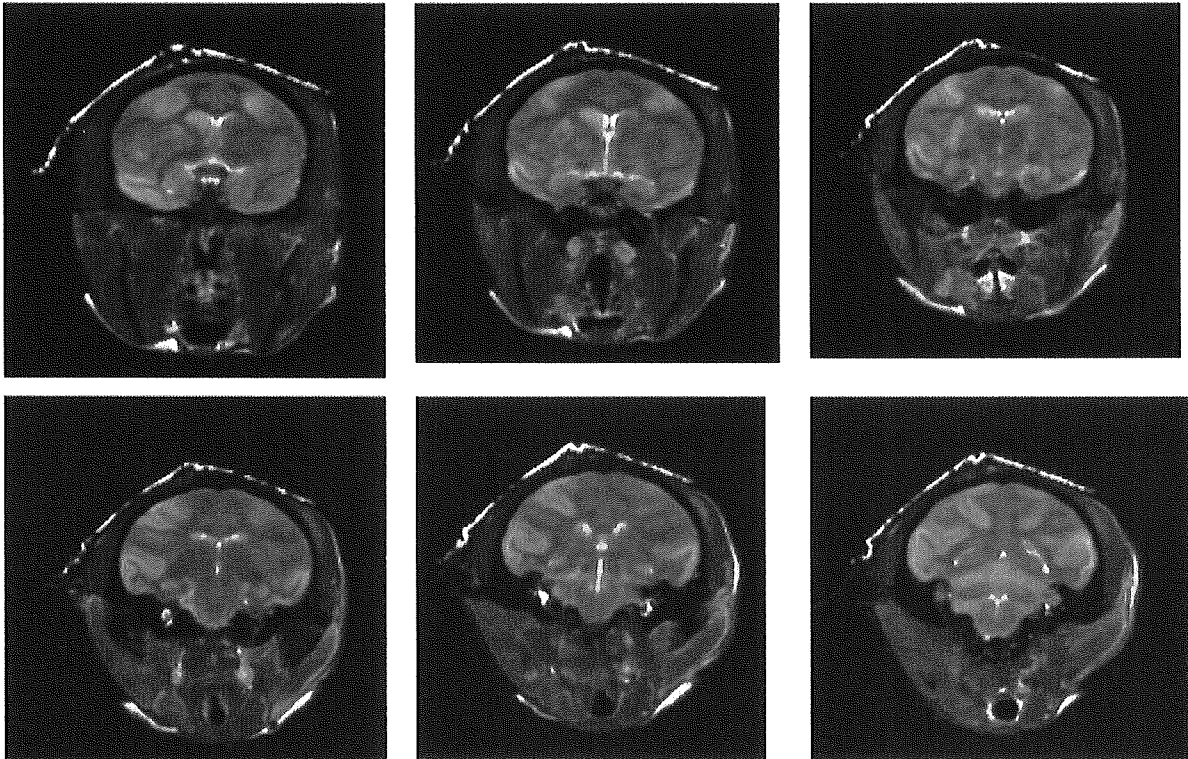


Fig.2 #011(全脳虚血)2日目MRI像(T2強調画像)



実験的脳梗塞作成カニクイザル脳組織の病理組織学的比較検討

研究要旨：

本研究では、昨年度の結果をもとに新たに作成した実験的脳梗塞作成カニクイザル脳組織を用いて、成功例と失敗例との比較検討を病理組織学的に検索した。

A. 研究目的：

脳梗塞は我が国における致死率の高い疾病の一つであり、治療法開発はもちろのこと根本的な病態メカニズム等を早急に明らかにする必要がある。特に、脳梗塞は血液再灌流後の神経細胞保護によって、患者の容態および予後が大きく左右されることから、再灌流時における脳組織の変化を検索することは重要である。今年度は、前年度の結果を反映して新たに作成した脳梗塞モデルカニクイザル脳組織（中大脳動脈閉塞再灌流モデル）を用いて、病理組織学的に比較検討を行った。

B. 研究対象および方法

本実験ではカニクイザル中大脳動脈を一時的に閉塞することで得られる実験的脳梗塞モデルを作成し、剖検後に病理組織学的検索を行った。本実験に用いたカニクイザルは、国立感染症研究所・筑波医学実験用霊長類センターに由来する 13 歳齢カニクイザル（メス：#1）、14 歳齢カニクイザル（メス：#2）および 1 歳齢カニクイザル（メス：#3）の計 3 頭を用いた。

3 個体はそれぞれマイクロカテーテルによる 3 時間の右中大動脈閉塞・再灌流処置

を行った。このうち、#1 と #2 に関しては術後 1 時間にて斃死したが、#3 は予後良好にて回復が見られ、MRI 撮影後、術後 130 時間の時点で実験殺を行った。剖検後、全個体の脳組織から定法に従いホルマリン固定・パラフィン包埋切片を作成し、HE 染色および各種免疫染色に用いた。免疫染色の対象は、アストログリアの活性化マーカーである GFAP と、神経網マーカーである Synaptophysin を用いた。

C. 結果：

予後観察中に斃死した #1 と #2 脳組織では、非常に神経細胞の脱落が著しく、一部では脱髄も確認された。また、アストロサイトシスならびに多数のミクログリアが確認され、強度の変性が生じていた。免疫染色においては、アストログリアの強い活性化（主に I 型）が随所に見受けられ、神経網の脱落も脳全体に著しく観察された。これらの所見より、#1・2 両個体脳組織においては、脳梗塞病変というよりもむしろ、完全に脳組織が崩壊していることが明らかになった。

#3 は、術後に順調に回復傾向を示し、カニクイザルを用いた初めての中大脳動脈一

次閉塞モデルサルの作成に成功を収めた。MRI 画像診断では、術後 3 日目に右脳尾状核に梗塞病変が見られ、その後の MRI 追跡診断では、梗塞病変が消失していた。剖検後、脳組織を病理組織学的に検索したところ、MRI 画像で梗塞が確認された領域において軽度の神経細胞損失とアストログリア活性化（主に II 型）が観察された。このアストログリア活性化は前年度結果ならびに斃死した #1・2 と異なり、脳組織の変性結果によるものではなく、脱落した神経細胞を支持するかたちでの活性化であり、むしろ脳組織保護的に働いているものではないかと考えられる。神経網の脱落もそれほど甚大ではなく、ミクログリアの活性化もそれほど強いものではなかった。

D. 考察：

本研究では、カニクイザルを用いた中大脳動脈一次閉塞モデルの作成に始めて成功を収めた。成功モデルを用いた検索結果により、梗塞が確認された脳組織ではアストログリアによる「組織保護」のための活性化が生じている可能性が示唆され、これらグリア細胞による脳組織保護効果はさらに深く検討する必要があると思われる。今後の計画としては、引き続き症例数を増やして脳梗塞モデルカニクイザルの病理組織学的検索を行うことも重要ではあるが、梗塞時に影響をうける各種因子群の変化検索を行ってみることも重要ではないかと思われる。

また、本研究でモデル作成に成功したカニクイザルは 1 歳齢という比較的若い固体を用いたものであり、今年度残念ながら斃死した個体はいずれも 10 歳齢以上の個体であったことから、中大脳動脈一次閉塞モ

デル作成には、若い固体を用いたほうがより成功に結びつきやすい可能性が示唆された。この年齢による予後回復の差は、個体の血管年齢（弾力性等）に起因している可能性も考えられ、実際の脳梗塞患者においても、患者の血管状態によって予後が左右される可能性が考えられる。

E. 結論：

本研究によってマイクロカテーテル法によるカニクイザルを用いた一次閉塞モデルの作成に成功した。しかしながら一方では、術後短期間で死亡してしまった症例も存在することから、更なる条件の絞込みや手技の改善が必要であることも事実である。

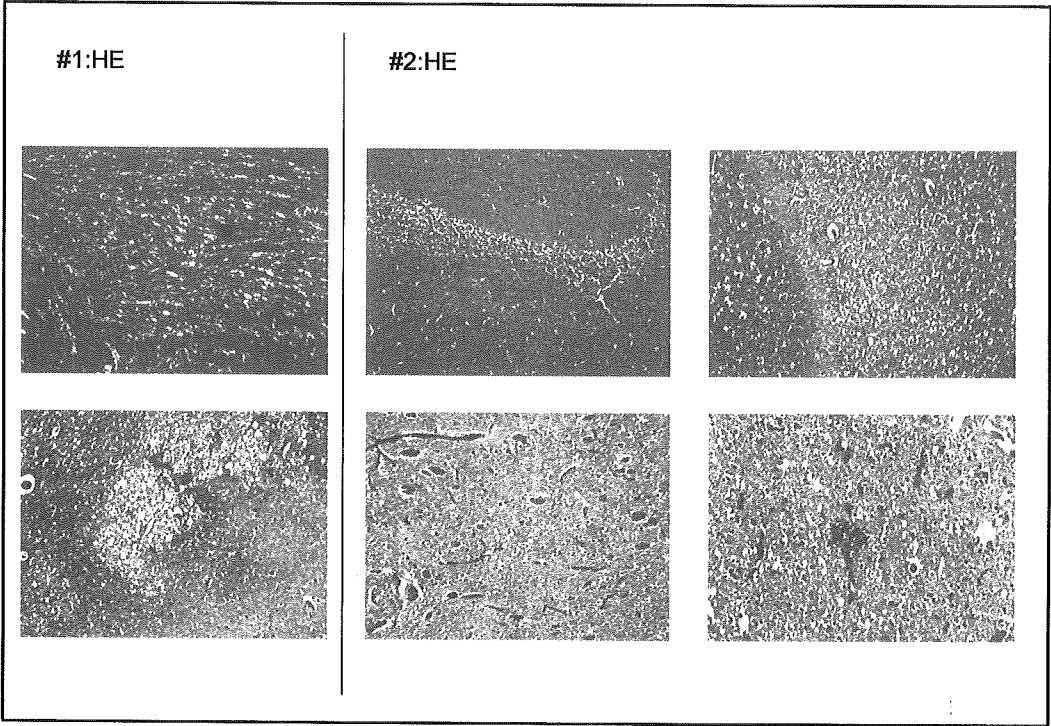
また、回復期におけるグリア細胞の動向や個体の血管状態など、最灌流後の予後に関与する可能性のある因子群が示唆された。

健康危険情報

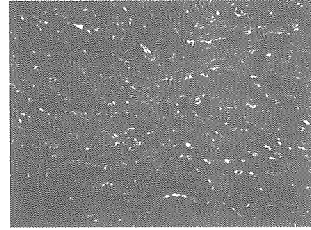
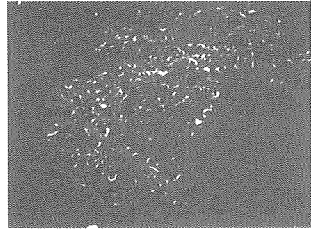
F. 研究発表

G. 論文発表

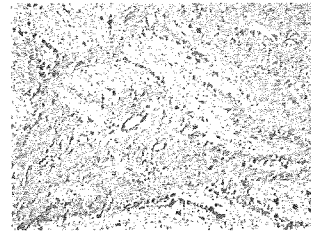
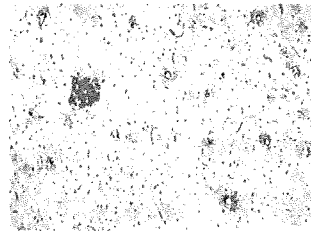
I. 知的財産権の出願・登録状況



#3:HE



#3:GFAP



厚生労働科学研究費補助金 (ヒトゲノム・再生医療等研究事業)
霊長類を用いた脳梗塞モデルの遺伝子治療研究
分担研究報告書

カニクイザル脳梗塞モデルを用いた遺伝子治療の
分子生物学的評価法の開発に関する研究
(特定部位における発現たんぱく質の網羅的解析)

分担研究者 吉川 泰弘 東京大学大学院農学生命科学研究科
研究協力者 濱崎 裕子 東京大学大学院総合文化研究科
研究協力者 倉岡 睦季 東京大学大学院農学生命科学研究科

研究要旨

昨年度までに開発されたカニクイザルの脳梗塞モデルを用いて、梗塞時に生じている脳および脳脊髄液における発現たんぱく質の変化を網羅的に解析した。脳組織に関しては、梗塞巣における発現たんぱく質の変化を Power Blot 法を用いて解析した結果、発現量が顕著に変化したたんぱく質のプロファイルは、白質と灰白質とで、かなり異なり、それぞれの部位において、ウエスタンブロットにより得られたシグナル強度が2倍以上変化したたんぱく質も多数存在した。一方、脳脊髄液に関しては、MDLC-MS 法による網羅的解析を始めた。今後は、MDLC-MS 法を確立し、脳梗塞発症前後における脳脊髄液中の発現たんぱく質の変化を検討していくとともに、脳梗塞疾患関連マーカー候補たんぱく質を検索していく予定である。

A. 研究目的

近未来において、わが国は、超高齢化社会を迎えるにあたり、様々な検討すべき社会的問題が浮上している。中でも、血管性痴呆症は患者数の多さ、高齢者の QOL の低下、社会的な負担の増大などの理由により、深刻な疾患のひとつとなっている。

一方で、現在、各種疾患における病態プロテオーム解析は、世界の各地において急ピッチで推進されている。この病態プロテオーム

解析は、疾患発症のメカニズムや治療標的・臨床マーカーを明らかにするだけでなく、治療の安全性、有効性を評価することに対しても、大変有用である。

そこで本研究では、霊長類脳梗塞モデルを用いて、Power Blot 法、MDLC-MS 法および、2D-MS 法を用いて発現たんぱく質の網羅的解析を行い、微小脳梗塞領域のたんぱく質発現解析による新規治療ターゲットたんぱく質の検索を行うことを目的とした。

B. 研究方法

1) Power Blot 法

カニクイザルラクナ梗塞モデルを作成、手術翌日に解剖し、梗塞部周辺部位と、その反対をコントロールとして脳サンプルを、白質と灰白質に分けて採取、直ちに凍結保存した。サンプルを凍結粉碎後、1%SDS を含む Buffer にてたんぱく質を抽出、Power Blot 法により発現たんぱく質の差異を検討した。

2) 2D-MS 法

カニクイザル梗塞モデルの脳梗塞部および、梗塞周辺部位、正常部のそれぞれの2次元電気泳動後、CBB 染色にてたんぱく質の可視化を行い、発現たんぱく質のプロファイリングを行った。その後、発現量の違うと思われるスポットを切り出し、ゲル内消化を行い、得られたペプチド断片に対し、質量分析を行った。得られたペプチドの質量に対し、データベース検索を行い、目的のたんぱく質の同定を試みた。

3) MDLC-MS 法

カニクイザルを用いた、アガロースビーズによる微小血管脳梗塞モデルおよび、カテーテルによる中大脳動脈梗塞2時間再還流モデルより脳脊髄液を採取、梗塞作成前後での発現たんぱく質の変化を検討した。本研究においては、梗塞前後で発現変化しているたんぱく質をスクリーニングすることが目的なので、より多くのたんぱく質を検討するために、脳脊髄液中の主要たんぱく質である、アルブミン、グロブリン、トランスフェリン、アンチトリプシン、ハプトグロブリン等を除去した。得られたサンプルを濃縮後、多次元液体クロマトグラフィー(MDLC)を行い、各溶出時間に得られるペプチドの質量分析(MS)を行った。

この時得られるデータを、溶出時間(s)と、質量(m/z)とで、2次元的に展開することにより、各サンプル間でのディファレンシャルディスプレイを行った。一方で、得られたマススペクトラムのうち、代表的なものに対しては、同時にMS/MSを行い、データベースより得られる理論値よりペプチド配列を予測し、たんぱく質を同定した。

C. 結果

1) Power Blot 法

白質において、発現が明らかに上昇したたんぱく質が、Stat 1 など 23 種類、減少したものが PKAC など 63 種類あった。また、灰白質においては、明らかな発現の上昇が確認できたものが、TIEG2 など 24 種類あり、減少したものが SNAP-25 など 19 種類確認できた。また、灰白質で発現変化の大きかった上記の TIMG2 や、SNAP-25 などは、白質においても発現の量の変動していた。

2) 2D-MS

脳組織の主要な発現たんぱく質として、Tubulin、 β -actin、NF-66 などを確認した。また、コントロールに発現していた NF-L、GFAP、B-CK などは、梗塞巣、梗塞周辺部位ともに発現の減少が見られた。また、梗塞周辺部位においては、Hsp-60 が増加している事が確認できた。

3) MDLC-MS 法

MDLC-MS 後の2次元展開により、それぞれのサンプルにおいて約 4300 から 4700 のペプチドスポットを検出した。現在、解析を続けている。

D. 考察

Power Blot 法は、約 1000 種類のヒト抗体を用いたウエスタンブロット法である。昨年度、正常カニクイザルの脳に発現しているたんぱく質を網羅的に解析することを目的として Power Blot 法を行った結果、10 歳齢の正常雄カニクイザルから抽出した脳的全組織中に、ヒト抗体と反応する 435 種のたんぱく質の発現が確認されている。

2 次元電気泳動後の質量分析の結果、梗塞部位特異的に検出された多量のたんぱく質はアルブミンであり、これは、梗塞部の血液循環障害による血液由来のものであると考えられる。そのため、梗塞部位のたんぱく質のプロファイルは、梗塞部位脳組織と、血液（血清）中のたんぱく質の混合であり、コントロールとのプロファイルの差異が直接脳内の発現たんぱく質の変化をあらわしているとは考えられない。そこで、今回は、梗塞周辺部位を中心に解析を行うこととした。また、これまでの研究により、げっ歯類と霊長類では、梗塞巣に対する反応が異なることが明らかとされている。げっ歯類と、霊長類、両者の脳の大きな違いの一つに白質と灰白質の割合の差異があることを考慮し、白質と灰白質に分けて、Power Blot 法による解析を行った。解析の結果、白質では、Stat 1 の発現が顕著に上昇していたが、Stat 1 の上流にある JAK1 の発現は減少していた。このことは、サイトカインシグナルにおいて中心的な役割を果たしている JAK/STAT 経路が、梗塞後活性化されたものの、24 時間後にはすでに活性化型 JAK 分子の分解が進んだためとも考えられる。さらに、白質と灰白質におけるたんぱく質の変化を検討してみると、両者に共通して上昇、減少していたたんぱく質もいくつかあったが、

白質では発現量が減少しているのに灰白質では発現量の上昇が見られたものなどもあり、梗塞による脳内のたんぱく質環境の変化は、白質と灰白質ではかなり異なることが示唆された。また、灰白質に比べ、白質で顕著な発現減少を示したたんぱく質が数多く存在していたことも興味深い。今後それぞれの部位で確認されたたんぱく質の機能を検討しながら、梗塞の程度や治療効果などの評価に応用可能な、脳梗塞における疾患関連マーカーと成り得るたんぱく質を検索していく予定である。

一方で、脳内の変化が、脳脊髄液中のたんぱく質のプロファイルに変化を与える可能性を考え、脳脊髄液中における発現たんぱく質の変化についても検討した。脳脊髄液は、量的にも多量に採取することが難しく、また、脳脊髄液中のたんぱく質の濃度が低いため、得られる蛋白量が大変微量である。そこで、微量たんぱく質の網羅的解析として、MDLC-MS 法を検討した。MDLC-MS 法は、多次元クロマトグラフィーとリニアイオントラップ型質量分析装置とを組み合わせ、そこから得られたデータを溶出時間と質量 (m/z) で展開することにより解析する方法である。この MDLC-MS 法は、国内でも、ごく一部のグループにより検討され始めた新しい方法であるため、まだまだ技術的にも確立されていないが、今後の解析、検討により、結果が十分期待される方法である。

E. 結論

本研究では、カニクイザルラクナ梗塞モデルを用いて、脳梗塞発症前後における脳組織の白質および灰白質の発現たんぱく質の変化を網羅的に解析した。白質、灰白質それぞれ

に特異的な変化が確認され、発現量が2倍以上変化したたんぱく質がそれぞれ複数存在した。今後、それらのたんぱく質のリストより、脳梗塞疾患関連マーカー候補たんぱく質を検索していく予定である。

F. 健康危険情報

なし

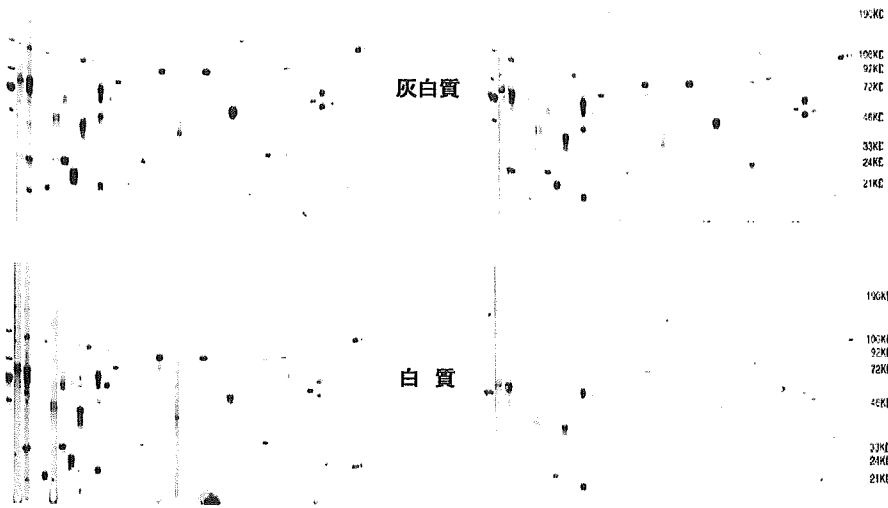
G., H. 研究発表・論文発表

資料・業績参照

Power Blot 解析から得たウエスタンブロット画像

コントロール

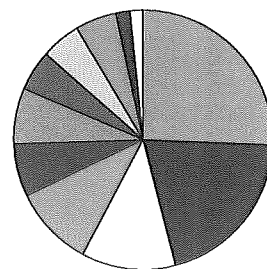
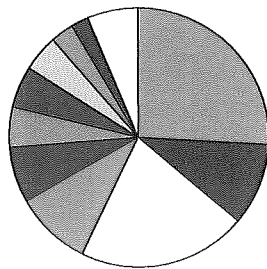
ペラグラ



脳梗塞梗塞巣周辺部で変化したたんぱく質のプロファイル

白 質

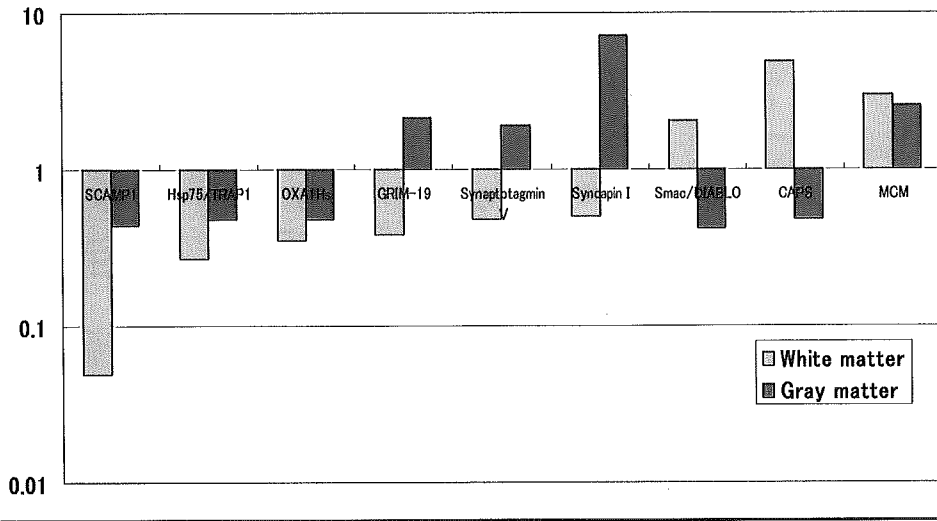
灰 白 質



- | | |
|---------------------------------|------------------------|
| ■ Neuroscience | ■ Membran |
| □ Kinase | ■ Cytoskeleton |
| ■ Nucleus and Nuclear transport | ■ Immunology |
| ■ Calcium signaling | □ Transcription factor |
| ■ Cell adhesion | ■ Apoptosis |
| □ Cell biology | |

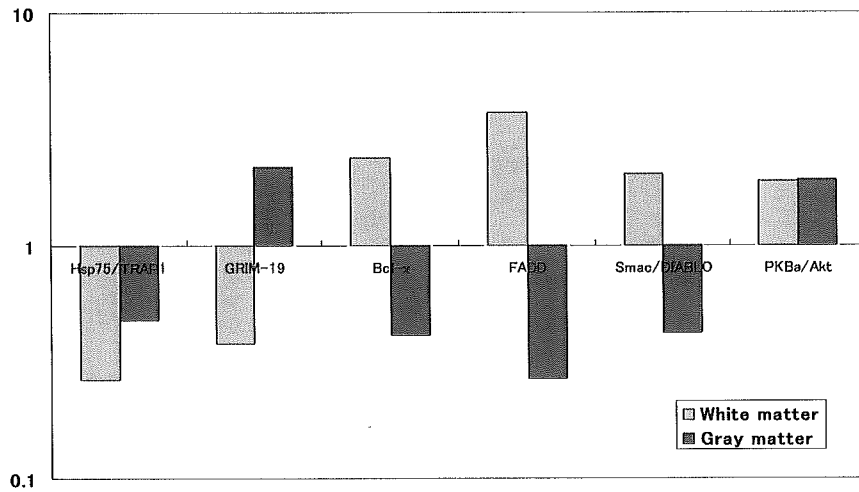
Power Blotの結果例1

Mitochondria

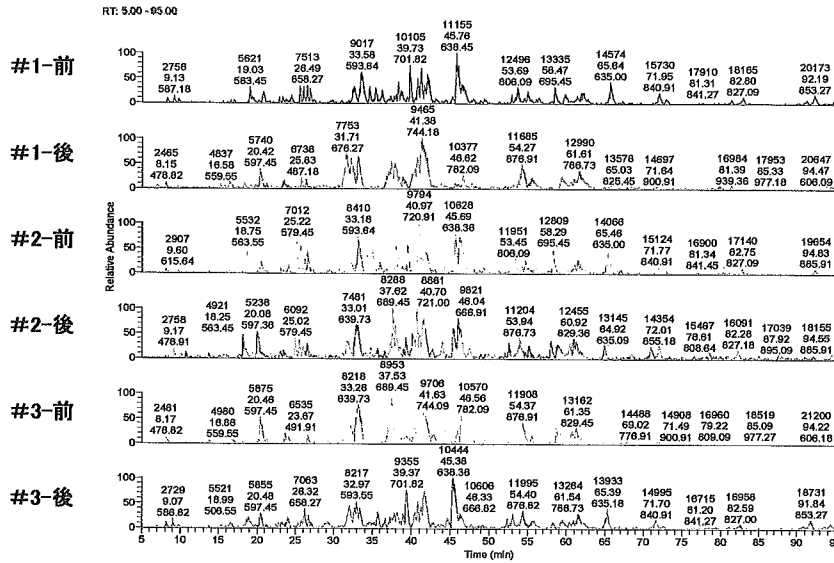


Power Blotの結果例2

Apoptosis

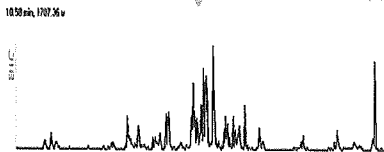
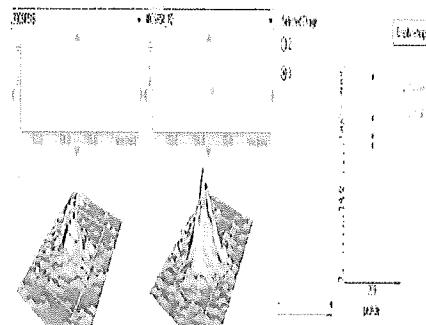
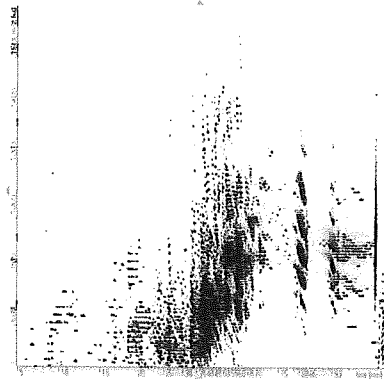


カニクイザル脳梗塞モデル脳脊髄液の液体クロマトグラム



2次元展開

比較解析



MDLC-MS 解析

スナネズミを用いた脳虚血モデルにおける MMP 抑制因子(TIMP)の機能解析

主任研究者 吉川泰弘 (東京大学大学院農学生命科学研究科)

協力研究者 倉岡睦季 (東京大学大学院農学生命科学研究科)

協力研究者 濱崎裕子 (東京大学大学院総合文化研究科)

研究要旨：

急性から亜急性の脳虚血・梗塞病変において発現が上昇するとされる基質分解酵素 matrix metalloproteinase(MMP)は、組織破壊、水腫、炎症を誘起する点において非常に重要な因子である。MMP を抑制するタンパク因子としては、tissue inhibitor of matrix metalloproteinase(TIMP)が知られ、さらに潜在的な神経細胞保護効果、TNF- α 減少効果の可能性が示唆されている。今回、スナネズミを用いた脳虚血モデルを作成し、比較的急性期に生じるとされる MMP-9 および TIMP-3 の組織学的局在を検索した。

A. 研究目的：

脳虚血時に増生する TNF- α および IL-6 は、NF- κ B、AP-1 などの炎症転写因子を産生する。これら炎症転写因子は、さらに炎症、組織破壊を仲介する様々なサイトカイン、酵素を増加させる。その中で特に脳組織破壊時に著しく増加し、多機能を有する酵素に MMP がある。MMP はフィブロネクチン、コラーゲン等の細胞外基質を分解して血管を損傷し、組織破壊・浮腫を誘起する。また、炎症細胞遊走、アポトーシスにも関連する。これらの特徴から、MMP は脳組織破壊進行の原因因子の一つとして考えられている。MMP サブタイプの中で、MMP-9 は急性期に生じ、組織破壊、炎症病変拡大能が特に強い。

MMP を抑制する因子の一つに、TIMP がある。このサブタイプで、TIMP-3 は上述の MMP-9 を特に抑制する因子である。さらに TIMP-3 は多機能を有し、例えば、TNF- α converting enzyme (TACE)を抑制することで、TNF- α の活性化・放出を妨げ

る。また各種細胞に対して異なるアポトーシス、細胞増殖を制御する作用も報告される。

脳組織を構成する細胞に対する TIMP の直接的な働きについては、まだ多くは知られていない。これを脳梗塞治療への応用に用いるため、生体内への投与あるいは発現によって、その効果を調べることを検討する。

B. 材料と方法：

スナネズミを用いて虚血モデルを作成した。虚血処置として右側頸動脈を閉塞し、60 分後に再灌流、24 時間後に脳組織を採材した。コントロールには sham-operation を施した群を用いた。

虚血病変の評価には脳浮腫の判定、組織学的検索を行った。脳浮腫は 2,3,5-Triphenyltetrazolium-chloride (TTC)染色にて染め出されない領域を NIH Image で算出した。組織学的検索には HE 染色を行い、さらに TUNEL 法にてアポトーシスを評価した。

MMP-9 および TIMP-3 の局在の検索には免疫染色を施した。抗体は Anti MMP-9 (Sigma)、Anti TIMP-3 (第一ファインケミカル) を使用した。

C. 結果：

頸動脈閉塞処置を施されたスナネズミ脳材料の TTC 染色態度は Figure1 のようになった。染め出されない白色領域、すなわち脳浮腫領域は Control 群と比べ拡大し、赤色の正常領域は有意に減少した (Figure2)。

組織学的検索では、虚血処置された片側脳半球の皮質層から海馬にかけて、広範な神経細胞死、空胞化がみられた (Figure3)。TUNEL 法により、これら領域の神経細胞のアポトーシスが確認された (Figure4, 5)。対側脳半球に著変は認められなかった。

免疫染色において、虚血された脳半球の海馬を中心に、多くのグリア細胞で MMP-9 の発現がみられた (Figure6)。一方、TIMP-3 の発現は、空胞化を呈した部位周辺の神経細胞で確認されたが、萎縮した神経細胞などではみられなかった (Figure7)。対側の脳半球では、病変のある半球と比べて、皮質層、海馬での多数の神経細胞が TIMP-3 を発現した (Figure8)。

Control 群の神経細胞は TIMP-3 陽性であったが、発現は虚血半球と比べて弱かった (Figure9)。

D. 考察：

浮腫、空胞化、神経細胞のアポトーシスなどから、脳虚血病変の作出が確認された。この状態における MMP-9 ないし TIMP-3 を発現するグリア細胞、神経細胞の所見は、過去に報告されるヒトを始めとした各種動物の結果と一致する。グリア細胞の発現する MMP-9 は、浮腫、神経細胞死の原因の

一つとして考えうる。虚血群の TIMP-3 発現は、MMP-9 抑制反応である可能性が高い。HE 染色などでは著変の認められない対側脳半球の神経細胞の多くが、TIMP-3 発現を強く示したことは興味深い。病変を起こした半球と何らかのサイトカインを介した連絡をとっているのかもしれない。

Control 群の神経細胞での TIMP-3 発現が、虚血群よりも弱くはあるが確認された。この結果は、TIMP-3 が神経細胞で恒常的に発現される因子であることを示唆し、MMP-9 の抑制・拮抗以外の作用を有している可能性を示すものである。

E. 結論：

TIMP-3 は神経細胞において発現される因子であり、虚血病態時において増強される。

今後は、TIMP-3 の発現動態を中心に、神経細胞における作用の検索を試みる。無処置群および虚血処置群、Control 群の各脳半球での MMP-9 および TIMP-3 の定量を行い、発現を比較する。また TIMP-3 投与ないしウイルスベクターを用いた遺伝子導入時の虚血病変を比較する予定である。

また、TIMP-3 を実際に投与し、虚血処置に対する病変を比較する。最終的には、ウイルスベクターを用いた遺伝子治療実験を予定している。

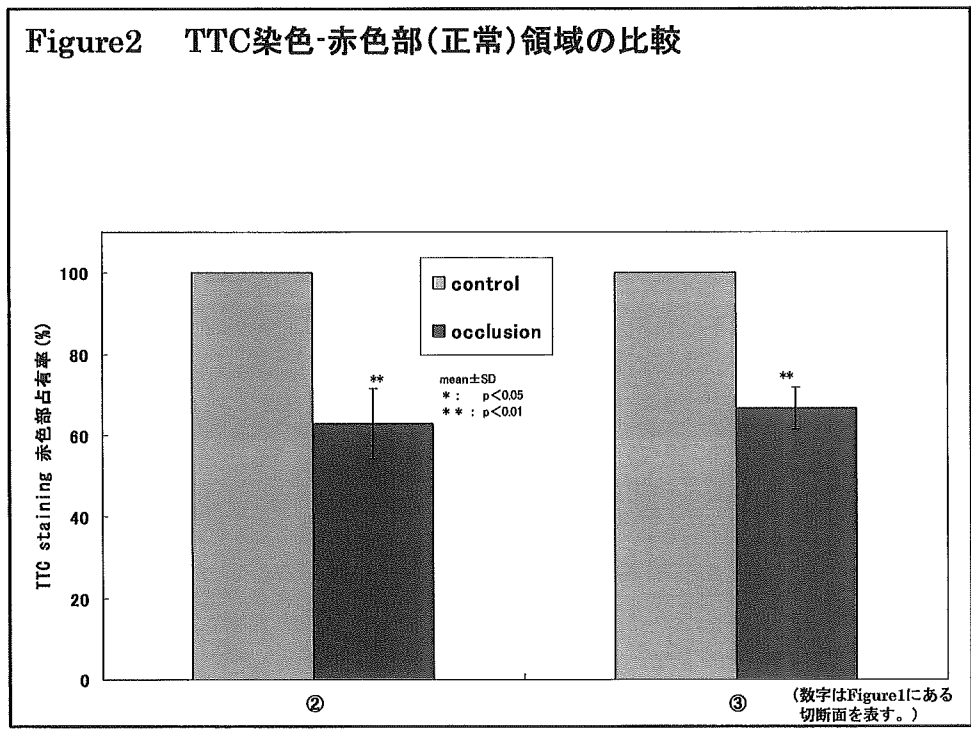
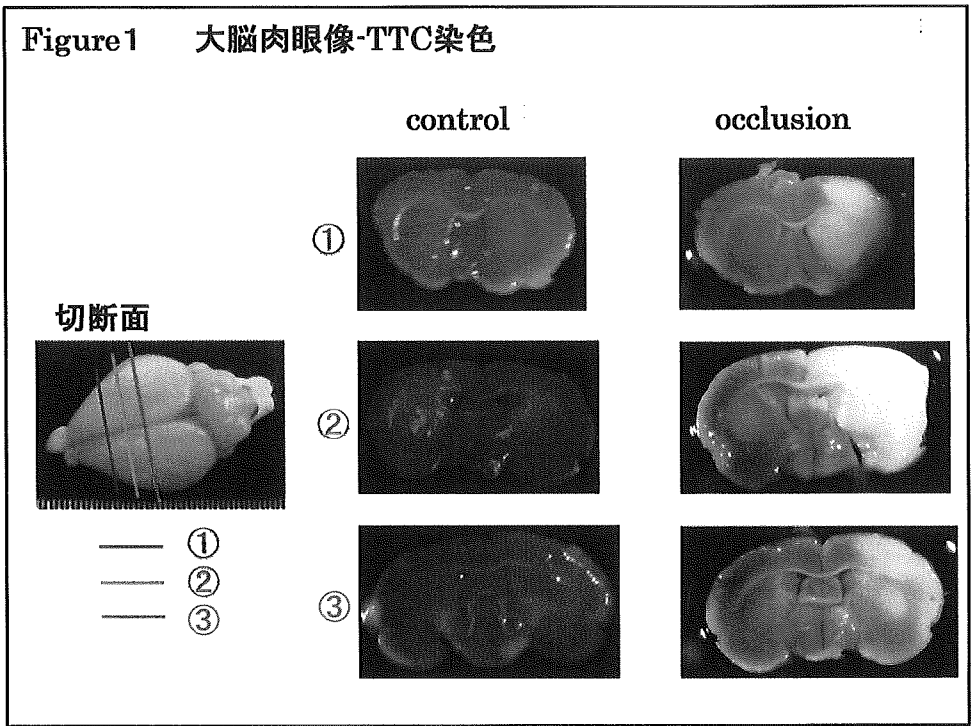
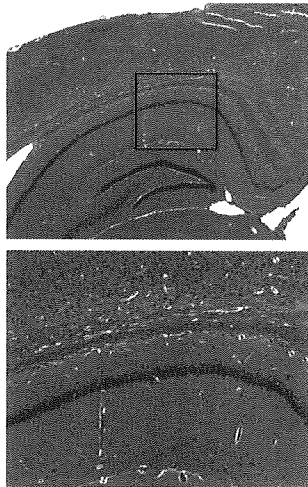
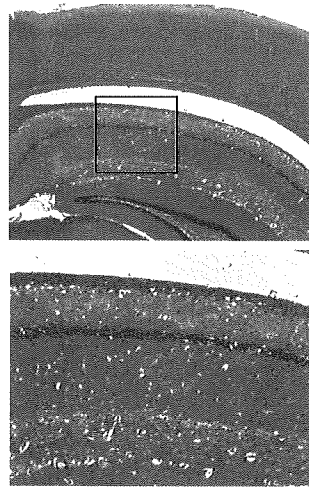


Figure3 大脳-HE染色

Left (contralateral)
-hemispherium



Right (ipsilateral)
-hemispherium



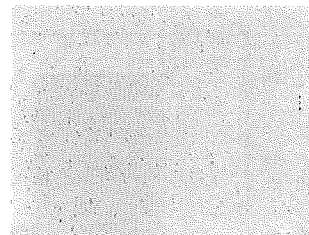
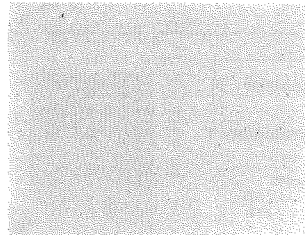
各下図は上図枠内の拡大を表す。

Figure4 大脳(皮質層)-TUNEL法

Left (contralateral)
-hemispherium

Right (ipsilateral)
-hemispherium

Control
(sham-operated)



Ishemia
(occlusion)

