

脳血流障害に伴う大脳白質病変の病態解明

自治医科大学 医学部 解剖学講座 組織学部門

講師 山崎 礼二

(共同研究者)

自治医科大学 医学部 薬理学講座 分子薬理学部門

講師 東 森生

はじめに

脳血流障害に伴い発症する脳卒中は再発率も高く、寝たきりの主要な原因疾患である。その中でも虚血性白質損傷は、高血圧や加齢に伴う慢性的な脳血流障害によって引き起こされる。このような大脳白質病変は認知機能障害、歩行障害の原因となり、認知症や脳卒中の発症リスクを高める要因である。白質には有髄線維が多数走行しており、髄鞘（ミエリン）が絶縁体として機能し、跳躍伝導を可能にするだけでなく神経軸索を保護している。そのため、急性の脳虚血においても髄鞘保護の重要性が以前から報告されており、白質を保護することで脳虚血後の神経細胞死を抑制できると考えられる。脳血管障害の発症メカニズムはこれまで血管を中心に研究されており、血管リモデリングの重要性が示されてきた⁽¹⁾。しかし、現在有効な治療薬はいまだに存在せず、虚血性脳疾患の進行を抑制し、血管障害後の白質障害に対して有望な治療アプローチを明確にする必要がある。中枢神経系においてミエリンを形成するオリゴデンドロサイトは虚血に対して脆弱であり、慢性的な脳虚血により、白質のオリゴデンドロサイトが障害され、脱髄を伴うことが知られている。しかし、虚血によりオリゴデンドロサイトが障害され脱髄を引き起こすだけでなく、なぜその後の白質再生が阻害されているのかは明らかにされていない。

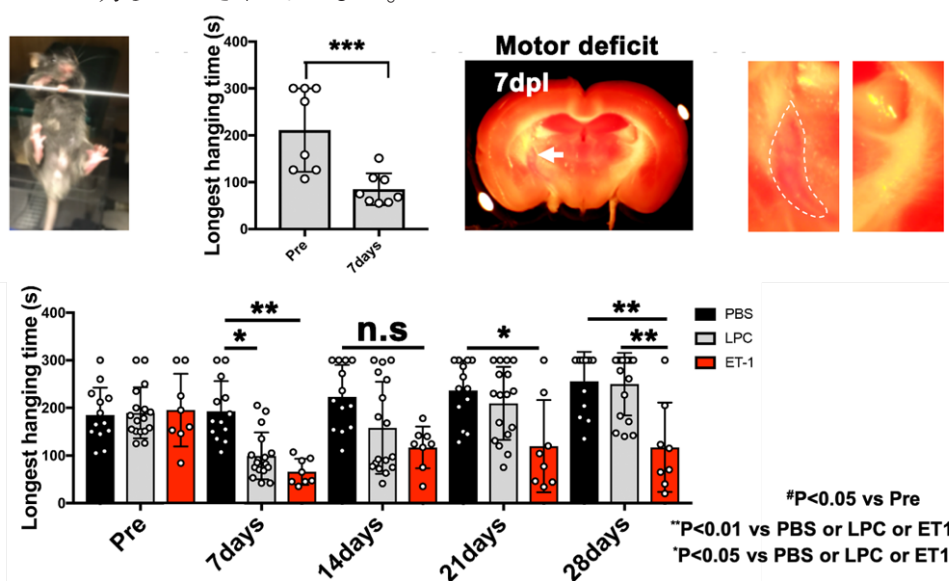


図1 内包脱髄モデルマウスの開発

マウスの内包にリゾレチンを注入することで、急性の運動麻痺が引き起こされるが、その後再ミエリン化と共に機能回復が見られる。それに対して、血管収縮剤であるET1を注入するモデルでは、機能回復は見られない。

研究代表者はこれまでに、四肢の運動機能を制御する皮質脊髄路の主要経路として知られる内包に脱髄誘導剤であるリゾレシチンを投与し、内包の脱髄に伴う半身麻痺と組織再生に伴う運動機能回復の両面の評価が可能となる新たな脱髄モデルの開発に成功した(図1)。

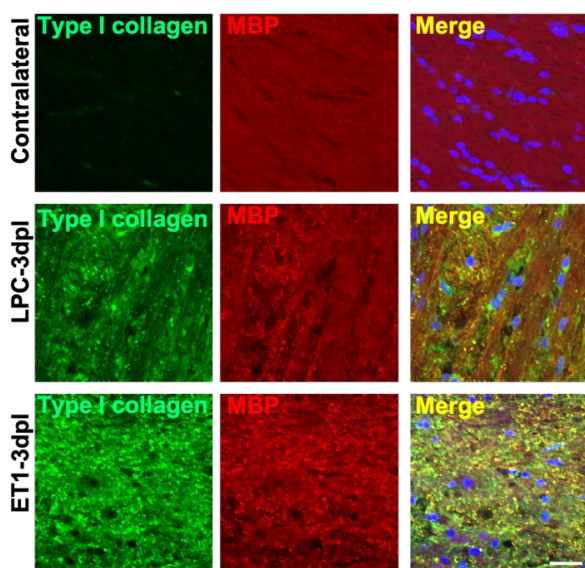


図2 ET1注入による白質障害領域では早期からI型コラーゲンが沈着している。

その際、血管収縮剤であるエンドセリン(ET1)を内包へ投与する白質梗塞モデルとの比較を行い、申請者は脱髄後に沈着したコラーゲンが白質の再生を阻害している要因であると考え、I型コラーゲンの遺伝子をコードするColla1の発現を調べた。その結果、リゾレシチン投与による脱髄部位と比べ、ET1による白質梗塞部位では早期にI型コラーゲンをコードするColla1の発現が上昇していることを見出した(図2)⁽²⁾。また、申請者はこれまでに自然発生高血圧ラットでは脳卒中発症時に脳細動脈周囲で血管周囲マクロファージがColla1を発現していること、脳卒中の大きなリスクファ

クターである高血圧や加齢と共に脳細動脈周囲にコラーゲンが沈着していることを明らかにした⁽³⁾。その後の予備実験から、脳虚血に伴い梗塞部位で脳内の免疫細胞であるミクログリアや末梢から流入するマクロファージがColla1を強く発現し、ET1投与21日後の梗塞慢性期でもColla1の発現が持続している可能性を見出した。

そこで、本研究ではET1を用いた白質障害モデルを用いて、病変部位でのコラーゲン線維の有無やコラーゲン形成細胞と分解機構を明らかにするため、さまざまな手法を用いて詳細な組織学的解析を行った。

結 果

1. 白質障害領域にコラーゲン線維が存在する。

まず初めに脳定位固定装置を用いてET1を内包に注入し、白質障害モデルを作製した。その後、ET1注入7, 21日後の運動機能を握力試験とワイヤーハンギングテストによって調べたところ、ET1注入21日後においても運動機能が障害されていることを確認した。次に、白質障害が見られる領域においてコラーゲンが沈着しているかを調べるために、ET1注入21日後の脳凍結切片を作製し、主要なミエリンタンパク質である Myelin Basic Protein (MBP) とI型コラーゲンをコードする Colla1の抗体を用いて蛍光免疫染色法によって解析を行ったところ、白質障害が見られる領域で優位にColla1の染色シグナルが増強していることを明

らかにした。さらに、白質障害領域において本当にコラーゲン線維が分泌されているかを調べるために電子顕微鏡による観察を行った。病変部位の標識には研究代表者が開発したニュートラルレッドによる病変部位標識法を用いた^(4, 5)。ET1を内包に注入した21日後にニュートラルレッドを腹腔内投与した2時間後に電顕観察用にサンプリングを行ったところ、障害部位がニュートラルレッドによって標識された。ニュートラルレッドによって標識された領域と反対側の内包をトルイジンブルー染色と電顕によって観察を行ったところ、白質の障害が観察された。また、障害部位の周囲では有髄軸索と脱髄軸索も観察された。白質病変内には軸索障害脳の実質内に分泌されたコラーゲン線維も観察された。特に免疫担当細胞であるミクログリアやマクロファージ様の細胞の周囲に特にコラーゲン線維が観察された。

2. Coll1a1とIbaの共局在が観察され、急性期から慢性期にかけてColl1a1の発現が減少した。

次に、ミクログリアやマクロファージがColl1a1を発現しているかを詳細に調べるためにミクログリア/マクロファージのマーカーであるIba1抗体とColl1a1抗体を用いて免疫染色法によって解析を行ったところ、ET1注入7, 21日後において強い共局在が観察された。さらに、それぞれの蛍光強度を計測したところ、ET1注入7日後から21日後にはIba1とColl1a1のいずれも減少するものの、21日後においてもIba1陽性細胞の強い活性化とColl1a1シグナルが残存していることが明らかになった。次に、Iba陽性細胞がColl1a1のmRNAを発現しているかを調べるために、in situ hybridization法と免疫組織染色法を組み合わせ解析を行った。その結果、Iba1陽性細胞がColl1a1のmRNAを発現していることが明らかになった。また、コラーゲンは分泌される際に、ゴルジ体で修飾を受けた後に分泌されることが知られている。そこで、ゴルジ体のマーカーであるGM130抗体とIba1抗体とColl1a1抗体を用いて免疫蛍光三重染色を行い、局在を調べた。

その結果、ET1投与7日後においてIba1, Coll1a1, GM130の共局在が観察された。また、ET1投与21日後ではColl1a1の局在が細胞質から細胞膜に移行していることが示された。さらに、ET1投与7日後の電顕観察から、特に炎症によって浸潤する単球由来のマクロファージ様の細胞がコラーゲン線維を分泌している様子や単球由来のマクロファージ様の細胞の周囲に多くのコラーゲン線維が観察された。

3. Iba陽性の免疫細胞がコラーゲンを分泌し、ファゴサイトーシスによってコラーゲンを分解している。

最後にコラーゲンの分解機構を調べるために、リソソームのマーカーであるLamp2抗体を用いて、Iba1抗体とColl1a1抗体との免疫蛍光三重染色を行った。その結果、Iba1陽性細胞内でLamp2とColl1a1の共局在が観察された。以上の結果から、Iba1陽性細胞がファゴサイトーシスによってコラーゲンを除去していることが示された。

考 察

今回の研究から、脳虚血に伴う白質障害領域では、ミクログリア/マクロファージがコラーゲン線維を分泌し、コラーゲン沈着部位では白質の再生が障害されていることを明らかにした。また、ミクログリア/マクロファージがファゴサイトーシスによってコラーゲンを除去していることを見出した。

脳障害時には、末梢から単球が浸潤し、マクロファージになることが知られている。今回の電顕観察による形態学的な解析から、常在性のミクログリアではなく、特に単球由来のマクロファージがコラーゲン線維を分泌している可能性が考えられた。そのため、今後は、単球由来のマクロファージ、または内在性のミクログリアのどちらの細胞群がコラーゲンを分泌しているかを明らかにする必要がある。また、コラーゲンの沈着領域では白質の再生が阻害されていることを明らかにしたが、コラーゲン存在下では、ミエリン形成細胞であるオリゴデンドロサイトの分化やミエリンの再生(再ミエリン化)が阻害されることが考えられた。したがって、コラーゲンがオリゴデンドロサイトに対して、何らかのシグナル機構が存在すると考えられる。そこで、今後は、オリゴデンドロサイトによる白質再生の障害機構を明らかにすることができれば、治療標的となることが期待される。

一方、コラーゲンの形成を抑制することでも白質再生を誘導することができる可能性が考えられる。今後、白質障害領域に沈着するコラーゲンを除去することで、白質の再生を誘導できるかを検討したいと考えている。これらの研究を通して、最終的には脳血流障害に伴う大脳白質病変の治療法開発に展開したい。

要 約

内包へのET1注入による白質障害モデルを用いて、脳虚血に伴う白質障害領域では、ミクログリア/マクロファージがコラーゲン線維を分泌し、コラーゲン沈着部位では白質の再生が障害されていることを明らかにした。また、ミクログリア/マクロファージがファゴサイトーシスによってコラーゲンを除去していることを見出した。

文 献

1. Blevins BL, Vinters HV, Love S, et al. Brain arteriolosclerosis. *Acta Neuropathologica* 2021;141:1-24.
2. Yamazaki R, Ohno N, Huang JK. Acute motor deficit and subsequent remyelination-associated recovery following internal capsule demyelination in mice. *J Neurochem* 2021;156 (6) : 917-928.
3. Inagaki T, Fujiwara K, Shinohara Y, Azuma M, Yamazaki R, Mashima K, Sakamoto A, Yashiro T, Ohno N. Perivascular macrophages produce type I collagen around cerebral small vessels under prolonged hypertension in rats. *Histochem Cell Biol* 2021;155 (4) :503-512. doi: 10.1007/s00418-

020-01948-9.

4. Baydyuk M, Cha DS, Hu J, Yamazaki R, Miller EM, Smith VN, Kelly KA, Huang JK. Tracking the evolution of CNS remyelinating lesion in mice with neutral red dye. *Proc Natl Acad Sci USA* 2019;116 (28) : 14290-14299.
5. Yamazaki R, Osanai Y, Kouki T, Shinohara Y, Huang JK, Ohno N. Macroscopic detection of demyelinated lesions in mouse PNS with neutral red dye. *Scientific Reports* 2021;11 (1) : 16906. doi: 10.1038/s41598-021-96395-4.