

論文の内容の要旨

獣医学 専攻
平成18年度博士課程入学
氏名 倉岡 睦季
指導教員 吉川 泰弘

論文題目 Pathophysiological roles of mast cell in brain ischemic models of mice
(マウス脳虚血モデルにおけるマスト細胞の役割)

人口の高齢化が進む世界諸国において、脳虚血疾患は深刻な問題である。治癒が困難な脳神経障害による影響は、患者の死亡、後遺症による QOL 低下など、多大な社会的・経済的負荷を与える。脳虚血の基礎病態、治療に関する研究は世界的に幅広く行なわれているが、未だ不明な点が多い。脳虚血病態は神経細胞死を含む不可逆的な変化を背景に、浮腫・炎症発生の複合的な要素をもつためである。これに対応するためには実験動物を用いた脳虚血疾患モデルの確立が必須である。特にトランスジェニック及びミュータント系統を豊富に有するマウスの利用は意義深い。

本研究では最初に、マウスにおける局所脳虚血病態の効率的な作成方法を検討した。次に局所および全脳虚血モデルを用いて、脳虚血急性期におけるマスト細胞の関与する病態機構を解析した。マスト細胞の多機能的な働きは近年注目を集めているが、脳虚血病態においては不明な点が多い。以下の三章において、これらの検索を言及する。

第一章：遠位中大脳動脈直接閉塞法を用いたマウス局所脳虚血モデルの作成

脳虚血疾患は脳を支配する血管の障害・閉塞により生じる病態であり、マウスを用いて様々なモデルが作成されている。特に局所脳虚血モデルは、片側動脈閉塞によって誘導される。脳を支配する動脈は頸動脈が移行する脳底の Willis 環より派生するが、閉塞時でも側副循環による血液供給を受けていると考えられている。それゆえに動脈の閉塞部位が近位

にあるほど、脳虚血病変にばらつきが出る可能性が高い。本章では、遠位あるいは近位における動脈の閉塞により生ずる虚血病変を比較し、効率的な片側動脈閉塞法について検索した。

遠位の動脈となる中大脳動脈を開頭的に閉塞し、これよりも近位に位置する総頸動脈の片側閉塞モデルと死亡率、脳虚血病変の比較を行なった。

遠位中大脳動脈閉塞群では、大脳皮質域に一定の虚血病変が誘導され、処置後 24 時間で最も広範な病巣の拡大($20.0 \pm 5.0\%$) が観察された。全個体は生存し、効率よく脳組織材料を得ることが出来た。他方、片側総頸動脈閉塞群は高い死亡率を有した。虚血後 24 時間の生存個体は、広範な病変から病変の無いものまで多岐にわたり、永久閉塞、一時閉塞それぞれの虚血領域は $29.0 \pm 20.8\%$ 、 $33.2 \pm 24.2\%$ と結果に大きなばらつきがみられた。以上より遠位中大脳動脈閉塞処置は虚血病変を効率よく誘導するために、有効な手法であることが明らかになった。

第二章：マウス脳虚血モデルにおけるマスト細胞の役割に関する検討

脳虚血急性期は患者の延命に特に重要な時期と考えられている。このステージでは、脳半球の膨張を特徴とする脳浮腫が発生する。脳浮腫は虚血による脳の細胞・血管傷害などにより派生する細胞膨化や滲出液増加から進行する病態で、圧迫による虚血巣の拡大をもたらすと考えられている。しかしながら、脳浮腫の発生機構については未だ不明な点が多い。臨床的には虚血にさらされた神経細胞の保護に重点が置かれ、脳浮腫に対してとられる処置は頭蓋骨切除などの他に有効な手立てが少ない。

近年、脳浮腫を伴う虚血病態にマスト細胞が関わるということが指摘されるようになってきた。マスト細胞は自然免疫の引き金となる免疫細胞で、多機能的な役割を果たしていることが明らかになりつつある。マスト細胞が産生するヒスタミンや TNF- α は血管に直接作用して血管透過性の亢進や滲出液増加を促し、また多種のサイトカインは免疫細胞の活性化・遊走に働くなど、浮腫や炎症誘導に強く関わっている。

中枢神経組織のマスト細胞は、皮質、海馬および間脳実質あるいは血管壁周囲に局在し、神経細胞との相互作用や脳の微小血圧調節などで生理学的機能を果たしている。脳虚血病態では虚血後 1 - 8 時間でマスト細胞は活性化し、脱顆粒することが示唆されている (Hu et al. 2004)。また、マスト細胞は血液脳関門の透過性亢進、好中球浸潤等の誘因になる (Strbian et al. 2005)。第二章では、脳虚血病態におけるマスト細胞の役割を、脳浮腫による虚血病変拡大に着目して検索を行なった。

薬理的検索では、マスト細胞を活性化させる Compound 48/80 あるいは安定化させる Cromoglycate を C57BL/6 マウス (10 - 13 週齢、オス) に投与し、中大脳動脈永久閉塞処置を行なった。また、マスト細胞を欠損する WBB6F1-Kit^{W^vW^v} (W/W^v) マウスと野生型 (WT) マウスを用いて同様に虚血誘導し、病変を比較した。

マスト細胞調節試薬投与後の脳虚血病変領域は、マスト細胞の活性化あるいは安定化に

より、それぞれ増加ないし減少傾向を示した。さらに W/W^f マウスでは、WT と比べて病巣の有意な減少がみられた。これらの変化は、虚血後 12 時間-2 日で最も明確であった。以上の結果より、虚血病変を拡大させるマスト細胞の作用は、脳虚血急性期に働くと考えられる。初期の病変形成におけるマスト細胞の活性化あるいは安定化は、その後の病巣膨張に強く影響することが明らかになった。

第三章：マスト細胞欠損マウスを用いた全脳虚血モデルにおける MMP 発現の解析

Matrix Metalloproteinase (MMP)は細胞外基質分解酵素として知られ、組織のリモデリングやホメオスタシスに働くと考えられている。MMP の過剰発現は組織破壊・炎症病態を促進させ、脳虚血病態においても重要な働きを示す。脳血管基底膜のラミニン、フィブロネクチン、コラーゲン・タイプIVに対する MMP の破壊作用は、血液脳関門を破綻させて滲出液を増大させる。さらに炎症性サイトカインや細胞表面レセプターを活性化し、炎症病態進行に大きく関与すると考えられる。脳虚血急性期では特に MMP-9 および MMP-2 の発現が増加することがわかっているが、その機構については不明な点が多い。

本章では、MMP 発現と炎症病態の進行機構におけるマスト細胞の働きに着目した。マスト細胞は血管透過促進作用の他に、様々なサイトカインやプロテアーゼを産生して炎症病態の制御に大きく関わっている。第三章では、脳虚血後の MMP 発現増加にマスト細胞がどのように関与するかを目的に検索を行なった。

マスト細胞欠損 W/W^f マウスおよび WT マウスに両側総頸動脈閉塞処置(15分)を行ない、脳虚血モデルを作成した。虚血-再灌流後 24 時間の脳組織を採材し、gelatin zymography および免疫組織染色により、MMP 活性および抑制因子 (TIMP-1) の発現を調べた。

W/W^f マウスの MMP-9 活性は WT マウスと比較して有意に減少していた。WT マウスの虚血病変周囲で多くの神経細胞が MMP-9 を発現するのに対し、 W/W^f では陽性細胞数の減少が観察された。TIMP-1 の発現は両群共に血管壁に同程度みられた。以上の結果から、マスト細胞は脳虚血病態において、神経細胞の MMP-9 産生を促進し、病変を拡大させる可能性が示唆された。一方 TIMP-1 の発現は、マスト細胞非依存的に誘導されると考えられた。

以上、第一章では効率的な局所脳虚血モデルの作成に、遠位中大脳動脈閉塞が有効であることが示された。第二章及び第三章では、脳虚血急性期の浮腫・炎症病態においてマスト細胞が病変悪化に関与することがわかった。脳虚血治療の新たなターゲットとして、マスト細胞の安定化が有効である可能性が示唆される。ただし、マスト細胞は神経保護機能を有する事が指摘されており、脳虚血慢性期では異なる働きをする可能性がある。脳虚血慢性期モデルを用いて、さらに詳細な検索が必要である。