

慢性脳低灌流による脳白質病変への活性酸素種産生酵素 Nox4 の脳保護作用機構の解明

脇坂義信

九州大学病院 腎・高血圧・脳血管内科

【研究の背景】

我々はマウス脳梗塞モデルを用いて、①脳梗塞急性期には梗塞周囲領域の脳血管周皮細胞に活性酸素種生成酵素 Nox4 の発現が亢進すること、②脳血管周皮細胞脱落が血液脳関門 (blood-brain barrier: BBB) 破綻の原因であること、③脳血管周皮細胞に Nox4 を過剰発現させたマウスでは、BBB 破綻が助長され脳梗塞が悪化すること、④急性脳虚血では脳血管周皮細胞での活性酸素種の産生が脳虚血病態の悪化に関与することを明らかにしてきた。このように急性脳虚血では Nox4 発現亢進に起因する酸化ストレスにより脳血管周皮細胞脱落と BBB 破綻をきたして病態を悪化させることから、慢性脳低灌流にても Nox4 発現亢進により脳血管周皮細胞脱落と BBB 破綻をきたし、また髄鞘を形成する主要細胞であるオリゴデンドロサイトの前駆細胞の分化を抑制し再髄鞘化を阻害することで、大脳白質病変が発症する可能性を考えた。この仮説に基づき予備的実験として少数の Nox4 ノックアウトマウスとその野生型マウスに対して、両側頸動脈を緩徐に狭窄させて慢性脳低灌流モデルを作成し脳組織を評価した。Nox4 発現抑制により脳白質病変が軽減することを予想したが、逆に Nox4 発現抑制により脳白質脱髄増悪を認めた。そのため急性脳虚血とは異なり慢性脳低灌流では Nox4 は脳保護的に作用している可能性が考えられるが、その機序は不明である。

【目 的】

本研究では、慢性脳低灌流環境下における脳血管周皮細胞での Nox4 発現変化が、①大脳白質障害や運動/認知機能に及ぼす影響を、また②再髄鞘化に関わるオリゴデンドロサイトやその前駆細胞の発現・増殖・分化に及ぼす影響について明らかにする。

【方 法】

Nox4 ノックアウトマウスとその野生型マウスに対して、マウスの両側頸動脈にアメロイドコンストリクターを装着して緩徐に頸動脈を狭窄させて慢性脳低灌流を作製し、組織学的な脳白質変性を誘導する。

1) 脳血流の測定:

二次元で血流を連続的に測定するレーザー血流計を用いて慢性低灌流負荷前後で測定した。

2) 大脳白質病変・脳微小血管の評価:

慢性脳低灌流作製 28 日後に脳を摘出し、Nox4 発現レベルと白質脱髄性変化や白質粗鬆化の程度の間接的関係を Kluver-Barrera 染色や MAG 抗体を用いた免疫染色で、また脳ホモジネートと MBP 抗体を用いた Western Blot で評価・検討した。そして慢性低灌流負荷後の脳微小血管増生を Lectin による用いた免疫染色で評価した。

3) 運動機能と認知機能の評価:

慢性脳低灌流作製の前後に運動機能を Wire hang test を用いて、また認知機能評価を Y 字迷路試験と新規物体認識試験を用いて評価し、Nox4 発現レベルと運動機能・認知機能との関連を検討した。

4) オリゴデンドロサイトとその前駆細胞の発現、またアストロサイトやミクログリアの浸潤の程度の評価:

慢性脳低灌流作製 28 日後に脳サンプルを作製する。Nox4 発現レベルと髄鞘を形成しているオリゴデンドロサイト、また

その前駆細胞の発現を、またアストロサイトやミクログリアの浸潤の程度を各種マーカーを用いて免疫組織染色、Western blot により評価した。

【結 果】

1) 脳血流の測定:

シャム手術群と比較して慢性低灌流負荷群は、術後 7 日目まで脳血流の低下を認めた。しかし Nox4 ノックアウトマウス群と野生型マウス群で有意差を認めなかった。

2) 大脳白質病変・脳微小血管の評価:

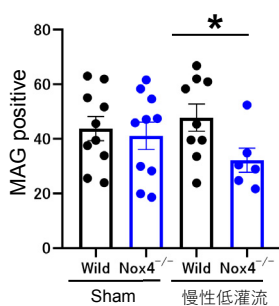
Nox4 ノックアウトマウスは野生型マウスと比較して、慢性脳低灌流作製 28 日後の脳の Kluver-Barrera 染色や MAG 抗体を用いた免疫染色で評価した脳梁膨大部での脱髄変化が高度であった(図 1)。また抗 MBP 抗体を用いた Western Blot では Nox4 ノックアウトマウスで MBP タンパクの発現低下を認めた。また、Lectin 抗体を用いて脳微小血管を評価したところ、野生型マウスでは慢性脳低灌流負荷による Lectin で標識される脳梁膨大部での脳微小血管の数が有意に増加したが、Nox4 ノックアウトマウスでは脳微小血管の明らかな増加を認めなかった。

3) 運動機能と認知機能の評価:

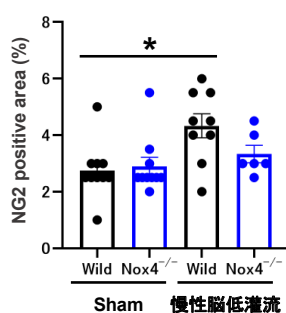
Wire hang test で評価される運動機能は Nox4 ノックアウトマウス群と野生型マウス群ともに慢性脳低灌流負荷による有意な低下を認めなかった。一方で、慢性脳低灌流負荷前後で Nox4 ノックアウトマウス群と野生型マウス群で自発運動性には差を認めなかったが、Nox4 ノックアウトマウス群は野生型マウス群と比較して空間作業記憶の低下を認めた。

4) オリゴデンドロサイトとその前駆細胞、またアストロサイトとミクログリアの発現の評価:

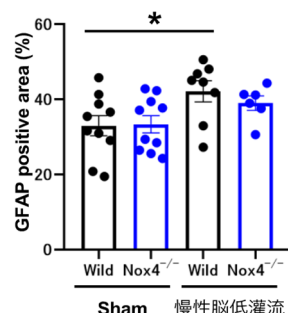
野生型マウス群では慢性脳低灌流負荷で脳梁膨大部領域において OSP で標識されるオリゴデンドロサイト、また NG2 や PDGFR α や NG2 で標識されるオリゴデンドロサイト前駆細胞の増加を認めた(図 2)。一方で Nox4 ノックアウトマウスではオリゴデンドロサイトやその前駆細胞の明らかな増加を認めなかった。同様に、野生型マウス群では慢性脳低灌流負荷で脳梁膨大部領域において GFAP 陽性アストロサイトや Iba1 陽性ミクログリアの発現増加を認めたが、Nox4 ノックアウトマウスではアストロサイトやミクログリアの明らかな発現増強を認めなかった(図 3、4)。



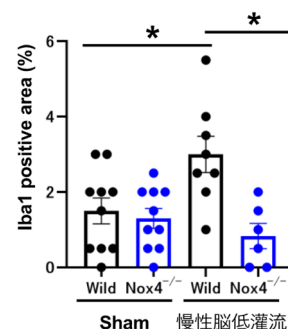
(図 1)



(図 2)



(図 3)



(図 4)

【考 察】

2 次元血流計で測定し得た脳表のマクロでの脳血流には Nox4 は関連していなかったが、慢性脳低灌流負荷後の脳梁膨大部での脳微小血管の増生は Nox4 ノックアウトマウスで抑制されていた。また脳梁膨大部での脱髄の程度は Nox4 ノックアウトマウスでより高度であった。そのため Nox4 は慢性脳虚血に伴う脱髄病変形成に対して、微小血管構築維持作用を介して保護的に作用する可能性が示唆された。また Nox4 ノックアウトでアストロサイトやミクログリアの浸潤が抑制され、オリゴデンドロサイト前駆細胞発現の抑制をも認めた。アストロサイトやミクログリアからの栄養因子がオリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖に関与することが示唆されてきている^{1,2)}。Nox4 によって脱髄病巣にアストロサイトやミクログリアの浸潤が促進し、これらの細胞による栄養因子によってオリゴデンドロサイト前駆細胞が増殖また分化してオリゴデンドロサイト発現を促進し、それに

より再髄鞘化をもたらす可能性が示唆された。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

慢性脳低灌流による大脳白質障害や脳血管性認知機能障害に対する有効な治療法はないのが現状である。本研究によって脳微小循環と密に関連する Nox4 を制御することによって、大脳白質病変や脳血管性認知機能障害の発症や増悪を抑制する新規治療法の開発につながる可能性がある。

【参考・引用文献】

1. Ari K, Lo EH. Astrocytes protect oligodendrocyte precursor cells via MEK/ERK and PI3K/Akt signaling. *J Neurosci Res.* 2020;88:758-763.
2. Rawji KS, Mishara MK, Yong VW. Regenerative capacity of macrophages for remyelination. *Front Cell Dev Biol.* 2016;4:47