

血管性認知症モデルマウスの病態進行に対する酸化脂質の関与

阿部, 真紗美

<https://hdl.handle.net/2324/7182408>

出版情報 : Kyushu University, 2023, 博士（創薬科学）, 課程博士
バージョン :
権利関係 :



学位請求論文

血管性認知症モデルマウスの
病態進行に対する酸化脂質の関与

九州大学 大学院薬学府

分子病態解析学分野

阿部 真紗美

目次

略語一覧

第一章	序章	1
1-1.	はじめに	2
第二章	脂質過酸化反応抑制剤による血管性認知症モデルマウスの病態保護効果	7
2-1.	序論	8
2-2.	方法	11
2-3.	結果	15
2-4.	考察	22
2-5.	小括	24
第三章	血管性認知症モデルマウスにおける酸化脂質生成およびメチルドパによる抑制機構の解析	25
3-1.	序論	26
3-2.	方法	28
3-3.	結果	34
3-4.	考察	44
3-5.	小括	51
第四章	総括	53
	参考文献	56
	発表論文	63
	謝辞	64

略語一覽

4-HNE	4-hydroxy-2-nonenal
15-HETrE	15-hydroxy eicosatrienoic acid
AA	arachidonic acid
AAPH	2,2'-Azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride
AD	Alzheimer's disease
AdA	adrenic acid
BBB	blood-brain barrier
BCAS	bilateral common carotid artery stenosis
CBB	Coomassie brilliant blue
CBF	cerebral blood flow
DAMPs	damage-associated molecular patterns
DGLA	dihomo- γ -linolenic acid
DHA	docosahexaenoic acid
EETs	epoxyeicosatrienoic acids
EQ	ethoxyquin
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GPx4	glutathione peroxidase 4
Hmox1	heme oxygenase 1
HODE	hydroxyoctadecadienoic acid
IBA1	ionized calcium binding adapter molecule 1
KB	Klüver-barrera
LA	linoleic acid
LAT	L-type amino acid transporter
LC-MS	liquid chromatograph-mass spectrometry
LIF	leukemia inhibitory factor
LOX	lipoxygenase
LPO	lipid peroxidation
MD	methyldopa
MDA	malondialdehyde
MMP-9	matrix metalloproteinase-9
MRM	multiple reaction monitoring
NLRP3	NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartic acid

NORT	novel object recognition test
oxPC	oxidized phosphatidylcholine
PBS	phosphate-buffered saline
PC	phosphatidylcholine
PE	phosphatidylethanolamine
PEG	polyethylene glycol
PLA	phospholipase
Pnpla	patatin like phospholipase domain containing
POVPC	1-palmitoyl-2-(5'-oxo-valeroyl)- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
Prdx	peroxiredoxin
Ptgs2	prostaglandin peroxidase synthase 2
PUFA	polyunsaturated fatty acid
ROS	reactive oxygen species
sEH	soluble epoxide hydrolase
SIVD	subcortical ischemic vascular dementia
TBARS	2-thiobarbituric acid reactive substances
Tempol	4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-piperidine-N-oxyl
TLR4	toll-like receptor 4
TREM2	triggering receptor expressed on myeloid cells 2
TRPA1	transient receptor potential ankyrin 1
TRPM2	transient receptor potential melastatin 2
VaD	vascular dementia

第一章

序章

1-1. はじめに

血管性認知症とは

血管性認知症 (vascular dementia; VaD)は脳血管障害を起因として認知症状が生じる疾患の総称である。血管障害の危険因子として、高血圧、糖尿病、高脂血症等が挙げられる¹。本疾患は認知疾患のうち、アルツハイマー病 (Alzheimer's disease; AD)に次いで患者数が多いとされ、さらに若年性認知症の要因としては VaD が全体の 42.5%を占めている^{1,2}。

VaD は、大小を含む脳梗塞や低灌流によって生じ、その障害の起こり方や障害部位によって様々な病態を示すことから、複数のサブタイプに分類される。NINDS-AIREN 診断基準によると、VaD は①多発梗塞性認知症、②戦略的な部位の単一病変による認知症、③小血管病性認知症、④低灌流性血管性認知症、⑤出血性血管性認知症、⑥その他、の6型に分けられる (Fig. 1)^{3,4}。また、日本における血管性認知症の病理診断分類では、③小血管病性認知症の中のさらに「皮質下血管性認知症 (subcortical ischemic vascular dementia; SIVD)」に分類される多発性ラクナ梗塞と Binswanger 病の患者が VaD 患者全体の 46.6%を占めている⁵。

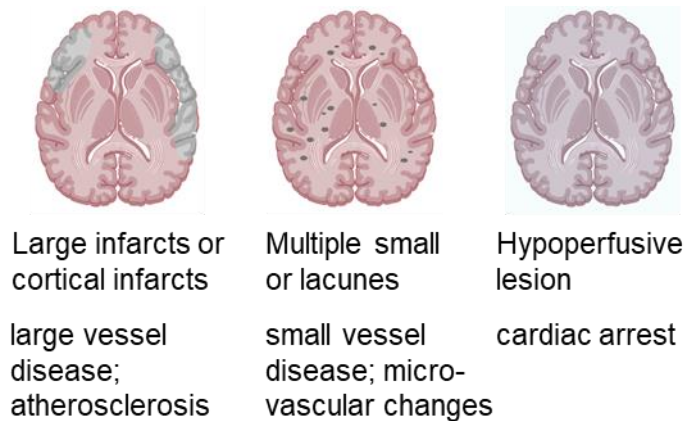


Figure 1. VaD のサブタイプとして分類される脳血管障害の模式図。サブタイプから①多発梗塞性認知症、③小血管病性認知症、④低灌流性血管性認知症を記載。This figure was created with BioRender.com.

VaD に対する治療アプローチ

VaD に対する治療には、まず抗血栓療法および抗血栓薬の投与が脳血管障害の二次予防および認知症発症の一次予防として用いられる。例えば European Stroke Organization のガイドライン⁶では、薬理学的介入で血圧を 130/80 mmHg 未満とし、低密度リポタンパク質を 1.8 mmol/L に下げることが提案されている。これらの治療でのメタアナリシスでは、認知症発症の遅延など望ましい結果も得られているようである。それにも関わらず、脳卒中後の認知障害の発症割合は 30%にのぼる⁷。さらにラクナ梗塞を発症した患者のうち約半数が認知障害を有するとの報告もある⁸。

また、VaD の認知機能障害に対しては、AD 治療薬として承認されているアセチルコリンエステラーゼ阻害剤や *N*-methyl-D-aspartic acid (NMDA)受容体拮抗薬が投与されている⁹。しかしながら、上記の薬剤を用いた治療法は VaD に対して十分な治療結果、エビデンスが得られておらず、現状 VaD の有用な治療法は存在しない^{10,11}。本疾患はアンメットメディカルニーズの高い疾患でありながらも、2022 年 5 月時点での医薬品開発件数は 0 件である¹²。このように、VaD は新規治療ターゲットの探索並びに新規薬剤の開発が望まれている疾患である。

脳および VaD 病態における脂質過酸化反応の亢進

脳は酸素消費量が多い臓器であり、組織の環境として活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS)が生成されやすい¹³。実際に脳血管障害時には損傷細胞からの ROS の放出に加え、ROS 産生酵素の活性化により酸化ストレスが亢進する^{1,14}。そのため、脳血管障害時には ROS 消去作用を持つ脳保護剤や抗酸化剤の探索が進められてきた。実際にレスベラトロールやニトロキシドである 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-piperidine-N-oxyl (Tempol)、さらにフリーラジカル捕捉剤として脳梗塞治療にも用いられるエダラボンの投与によって疾患モデル動物の認知機能障害を保護したことが報告されている¹⁵⁻¹⁷。

また、脳組織は灰白質領域で 36–40%、白質領域で 49–66%が脂質で構成されている¹⁸。脳の脂質にはアラキドン酸 (arachidonic acid; AA)やドコサヘキサエン酸 (docosahexaenoic acid; DHA)といった多価不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid; PUFA)を含むリン脂質が豊富に存在する^{19,20}。この PUFA は ROS 等により非常に酸化を受けやすく、これらの分子が一度酸化を受けると脂質過酸化反応 (lipid peroxidation; LPO)が開始される。LPO 中で生じる脂質ラジカルは反応性が高く、近傍の脂質へと酸化反応を伝播させることで脂質膜を障害する。

LPO の最終産物として生じる、4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE)や malondialdehyde (MDA)等のアルデヒド種は、タンパク質や DNA 等の生体分子を修飾することで、細胞死や炎症反応を誘発する²¹。実際に VaD 患者の血液中で、LPO の代謝産物である MDA が有意に蓄積していることが報告されてきた²²。また、初期認知症患者の脳中では、4-HNE 修飾タンパク質が増加している²³。

LPO により生成される酸化脂質の生理活性

脂質は VaD への関与が指摘される ROS のターゲット分子であることに加え、高反応性の LPO 産物が疾患時に増加することが報告されている。一方で、リン脂質の LPO では 4-HNE や MDA だけでなく、多種多様な構造を有する酸化脂質が生じる。これまでに、LPO により生成される酸化脂質の、脳実質細胞を含めた複数の細胞種に対する生理活性について明らかになってきている。

まず、ある種の酸化脂質は細胞毒性を有する。例えば、神経細胞やオリゴデンドロサイトに酸化リン脂質の一種である 1-palmitoyl-2-(5'-oxo-valeroyl)-sn-glycero-3-phosphocholine (POVPC) を添加すると、未酸化の脂質と比較し有意に細胞死を誘発する²⁴。また、制御された細胞死の一つであるフェロトーシスの誘導時には、phosphatidylethanolamine (PE) の酸化物が有意に増加する²⁵。

さらに、酸化脂質は damage-associated molecular patterns (DAMPs) として働き、免疫細胞応答を誘導する。多発性硬化症モデルマウスを用いた Dong らの報告では、傷害を受けた神経細胞やオリゴデンドロサイト由来の oxidized phosphatidylcholine (oxPC) はミクログリアの細胞膜受容体 triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2) を介して、ミクログリアの貪食作用を亢進させる²⁴。これによりミクログリアが酸化脂質を貪食・中和することで、病態保護機能が促進されることが明らかにされている。その一方で、酸化脂質は免疫細胞による炎症反応を亢進させることも分かっている。例えば、神経細胞由来の酸化脂質はミクログリアの NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3 (NLRP3) インフラマソームを活性化し、炎症性サイトカインを放出させることが示されている²⁶。さらに、Imai らの報告では、oxPC が toll-like receptor 4 (TLR4) を活性化することで、マクロファージによる炎症反応を亢進させることや²⁷、同様にマクロファージを用いた別の報告でも、oxPC をリポ多糖と共添加した際に hyperinflammation が誘導されることが明らかとなっている²⁸。以上のように、酸化脂質はその脂質種、細胞種および環境により炎症反応をはじめとした様々な応答を引き起こすことが示唆されている (Fig. 2)。

VaD 病態では LPO の亢進が報告されている一方で、LPO および LPO により生成される酸化脂質がどのように病態に関与しているのかはこれまでに明らかになっていない。さらに、VaD 病態時に生成され、疾患進展に関わる酸化脂質の分子種についても不明である。

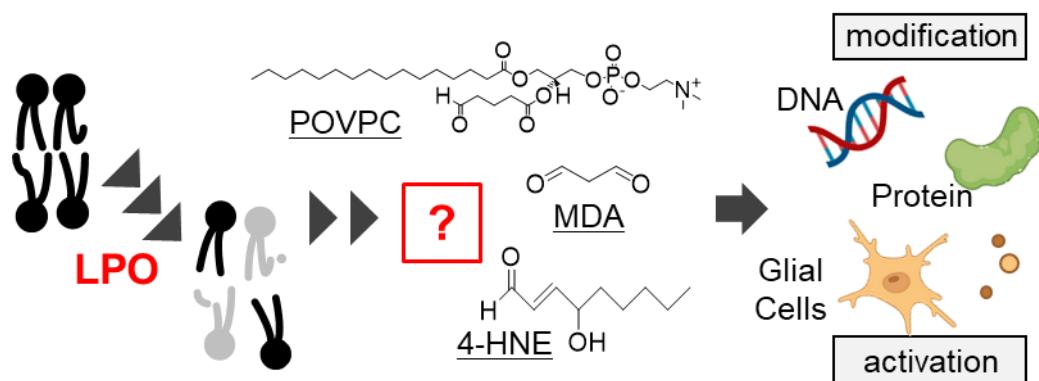


Figure 2. LPO により生成される酸化リン脂質や、MDA、4-HNE などの最終代謝物は、これまでに生体内分子への修飾や細胞死、炎症反応を亢進・惹起させることが報告されている。しかしながら、LPO は上記で示した以外にも多くの構造、生理活性を持つ酸化脂質が生成すると考えられる。それら酸化脂質が VaD 病態形成に寄与しているのではないだろうか？

本研究の着想および目的

以上の背景より著者は、VaD 病態下では LPO の亢進により、生成された酸化脂質が病態悪化に寄与しており、LPO を抑制することで脳血管障害により生じる認知機能障害を保護することができるのではないかとこの着想に至った。また、酸化脂質の構造解析によって疾患進展に関与する、すなわち病態の原因となるような酸化脂質の分子種についても明らかに出来るのではないかと考えた。

本研究ではまず LPO 抑制剤を VaD モデルマウスに投与し、病態モデルマウスで生じる基本病態を保護可能かどうか調べることにした。続いて、病態モデルマウスで生成される酸化脂質に着目し、LPO 抑制剤によりどのように変化するかについて検討した (Fig. 3)。

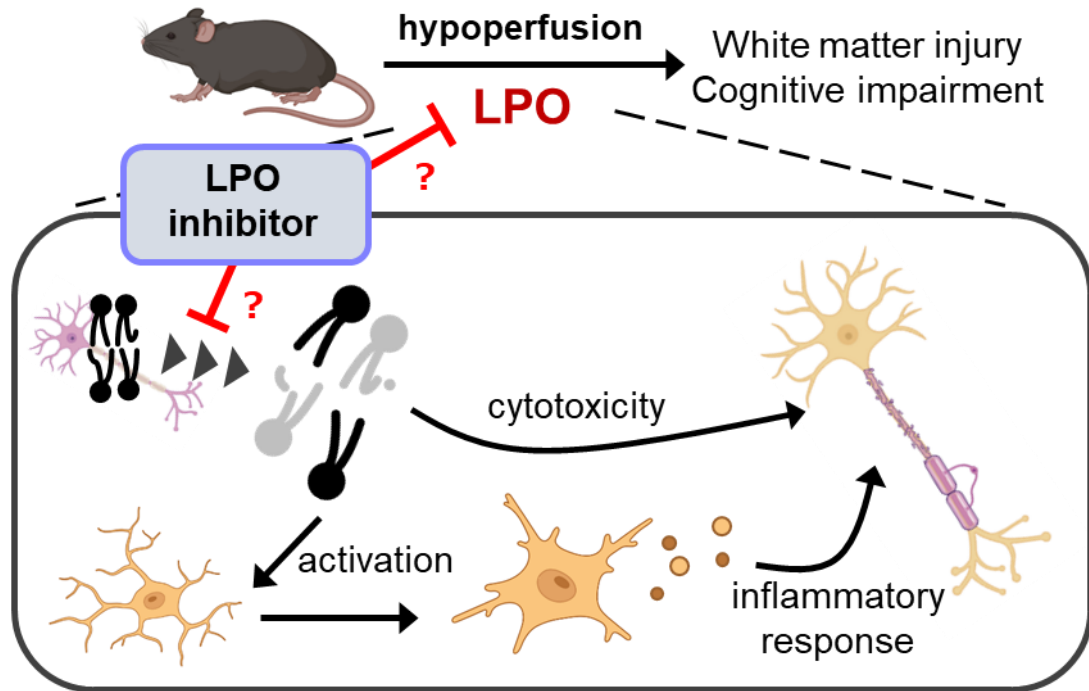


Figure 3. 本研究の概略図。まず LPO 抑制剤を用いて、VaD モデルマウスにおける白質病変や作業記憶障害といった基本病態を抑制可能かどうか検討した。続いて、慢性脳低灌流病態下ではどのような酸化脂質が生成され疾患進展に寄与しているのかについてモデルマウスおよび LPO 抑制剤を用いて評価した。

第二章

脂質過酸化反応抑制剤による 血管性認知症モデルマウスの病態保護効果

2-1. 序論

ヒト VaD を再現可能な病態モデルマウス

VaD 患者のうち、最も多い臨床亜型である SIVD では、慢性的な脳の低灌流によって白質病変を生じる²⁹。この SIVD 病態解明のために、大脳白質病変と認知機能障害を再現するげっ歯類を用いた慢性脳低灌流モデルが開発されている³⁰。

2004 年に Shibata らが作出した両側総頸動脈狭窄 (bilateral common carotid artery stenosis; BCAS)モデルは、ヒトの慢性脳低灌流状態を再現するマウスモデルである³¹。本モデルでは、10–12 週齢の C57BL/6J マウスの両側総頸動脈に内径 0.18 mm または 0.16 mm のピアノ線からなるマイクロコイル (ピッチ 0.5 mm、全長 2.5 mm)を装着することにより、持続的な低灌流状態が維持される。加えて、BCAS マウスは遺伝子改変マウスへの適用が容易という利点もあるため、VaD をはじめとした神経変性疾患の機序解明を目的とし幅広く用いられている³²。

本モデルでは、マイクロコイル装着後 7 日目以降からグリア細胞の活性化等が確認され、マトリックスメタロプロテアーゼ 9 (matrix metalloproteinase-9; MMP-9)の活性化等を介して血液脳関門(blood–brain barrier; BBB)の破壊が生じる³³。さらに術後 1 ヶ月で、明確な白質の病理学的変化が観察され³¹、作業記憶障害を示す³⁴。一方、認知機能障害としては、参照記憶には影響を及ぼさない。実際、ヒト患者においても、白質病変時には実行機能障害が認知機能障害の主体となっており、BCAS モデルは本疾患の認知プロフィールを再現していると考えられている³⁵。また、異なる内径のマイクロコイルを装着して病態を比較した先行研究の結果では、0.18 mm 径の場合には、病変部位は脳梁や線条体を中心とした白質領域である一方で、0.16 mm 径のマイクロコイルを装着すると、海馬領域にも梗塞巣が形成されていた³¹。しかしながら、両側の総頸動脈に 0.16 mm 径のマイクロコイルを装着した場合、術後 2 週まで生存したマウスはわずか 25%であり³¹、認知機能障害評価ができない。これを受けて本研究では、白質だけでなく灰白質にも障害が見られる実際の臨床病態を反映しつつ、高い生存率を維持可能である左右にそれぞれ 0.16 mm および 0.18 mm 径のマイクロコイルを装着するモデルを採用することとした³⁶ (**Fig. 4**)。

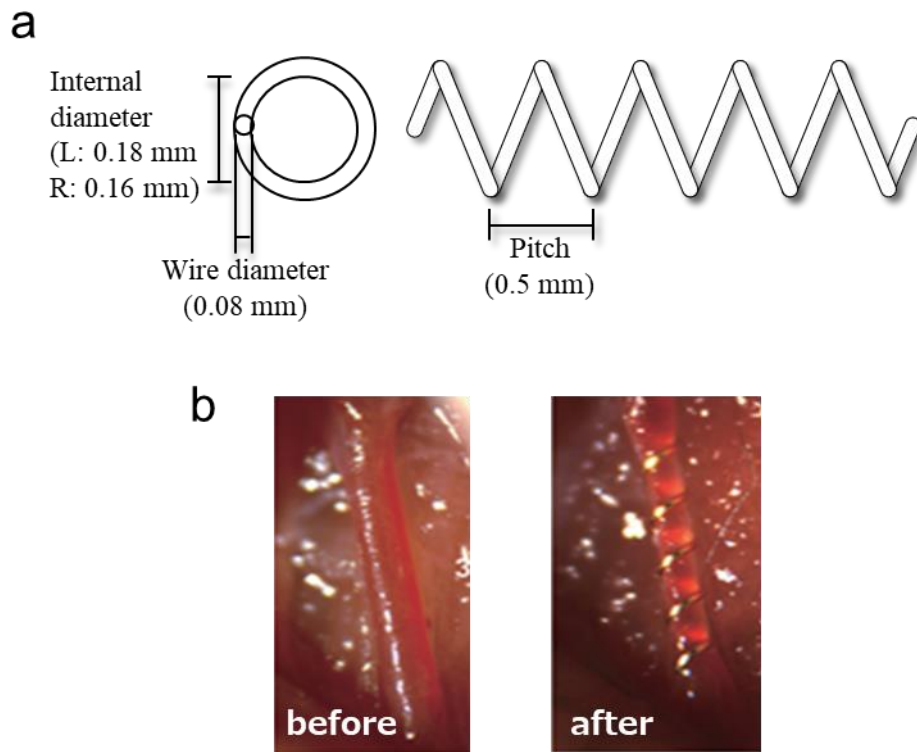


Figure 4. 両側総頸動脈狭窄モデルマウスの作成。(a) マイクロコイルの寸法 (b) 頸動脈狭窄手術の様子。コイル装着により、脳の血流量が慢性的に低下する。

VaD 病態に適用可能な脂質過酸化反応抑制剤の探索

所属研究室では、LPO の中間体である脂質ラジカルを選択的に検出する蛍光プローブを開発してきた³⁷。さらに本プローブを応用し、短時間で多検体解析が可能な、LPO 抑制剤探索のためのハイスループットスクリーニング系の構築に成功している。

そこで所属研究室において本スクリーニング系を Prestwick chemical library に適用したところ、高い LPO 抑制能を有する化合物を 16 種見出した。この結果から、16 種中 5 種の薬剤は BBB を通過する化合物であり、脳組織中にて生じる LPO の抑制に応用することが出来ると考えた。5 つの化合物は薬理活性が既知であることから、過去の文献情報より脳組織に対する毒性、VaD や脳血管障害に対する情報について調査した。その結果から、本研究ではエトキシキンおよびメチルドパを選択し、VaD モデルマウスに適用することとした (Fig. 5)。

エトキシキンはキノリン骨格を持つ脂溶性の抗酸化剤である。主に飼料の酸化防止剤として用いられている³⁸。近年ではエトキシキンの誘導体がラット脳虚血再灌流モデル

に対する保護効果を示したことが報告されている^{39,40}。さらにエトキシキン⁴¹は化学療法時や糖尿病病態下での神経傷害を保護する作用も有するようである^{41,42}。

メチルドパは、現在も $\alpha 2$ 受容体作動薬として高血圧治療に用いられる化合物であり、治療薬としての臨床での使用量は、成人で 1 日 250–2000 mg である⁴³。また、メチルドパについてはこれまでに抗酸化作用あるいは LPO 抑制の報告例はない。

以上より本研究では、高い LPO 抑制能を有する化合物としてエトキシキンおよびメチルドパを用い、BCAS マウスに対してまず記憶障害、白質病変を保護可能かどうか検討した。続いて、白質病変に先立って生じる炎症反応の亢進を抑制できるかどうか評価した。

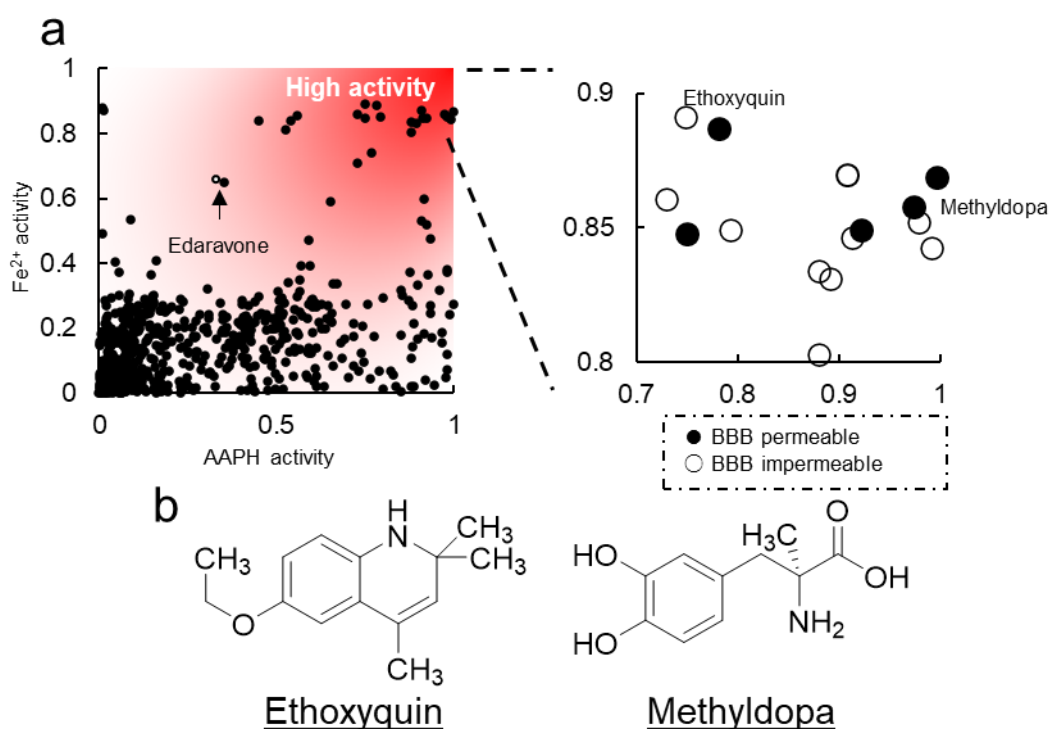


Figure 5. (a) Prestwick chemical library スクリーニング。リポソームを用いて Prestwick chemical library 1 次スクリーニングを行い、酸化開始剤である AAPH、 Fe^{2+} ($FeSO_4$) 添加系の活性値をプロットした。本ライブラリに含まれる化合物 1271 種は、全身の幅広い疾患に使用されている特許切れ医薬品等であり、比較的薬物動態に関する情報や副作用情報が整っている。そのため、同定された化合物は新規化合物に比べ開発時間の短縮が見込まれる。スクリーニングの結果、既存の脳梗塞治療薬であるエダラボンよりも高い LPO 抑制能を有する化合物を見出した。(b) エトキシキンおよびメチルドパの化学構造。

2-2. 方法

試薬・機器

エトキシキンおよびメチルドパは東京化成工業より購入した。その他の試薬は、Sigma-Aldrich、富士フィルム和光純薬株式会社、東京化成工業、ナカライテスク株式会社より購入したものを用いた。染色切片の観察・撮像は、株式会社キーエンスの BZ-X810 にて行った。Western blotting では、ChemiDoc MP を用いて検出した。

動物実験

雄性 C57BL/6J マウス (9 あるいは 10 週齢) をジャクソン・ラボラトリー・ジャパン株式会社より購入し、12 時間の明暗サイクル環境下で 1-2 週間馴化させたのち、実験に用いた。馴化中は水道水および餌 (CE-2; CLEA JAPAN, INC.) を与えた。なおすべての動物実験は、九州大学動物実験倫理委員会による承認を受けた。動物の飼育方法は、九州大学大学院薬学研究院のガイドラインに従って実施した。

BCAS 処置および化合物投与

一連の作業は実体顕微鏡下で行った。雄性 C57BL/6J マウス (10-12 週齢、24-29 g) に対し、先行研究で報告された方法⁴⁴を一部修正し BCAS 処置を行った。マウスは 2-3% イソフルランで麻酔を開始し、その後 1.5% イソフルランを吸入させ、麻酔状態を維持した。頸部腹側の皮膚を正中切開し、総頸動脈を露出した。その後マイクロコイル (piano wire diameter 0.08 mm, coiling pitch 0.5 mm, total length 2.5 mm, inner diameter 0.16 mm and 0.18 mm; サミニ株式会社より購入) を左右の総頸動脈に適用した。まず右総頸動脈に内径 0.16 mm のマイクロコイルを装着し、続いて左総頸動脈に内径 0.18 mm のマイクロコイルを装着した。切開部位の縫合後、持続麻酔を止め、マウスの覚醒を確認しケージに戻した。Sham 群では、マイクロコイルによる狭窄を除いた同様の処置を行った。

BCAS 処置を行ったマウスは以下に示す複数の群に分けた。[(1) vehicle、(2) エトキシキン (50 or 100 $\mu\text{mol/kg}$)、(3) メチルドパ (100 or 200 $\mu\text{mol/kg}$)] エトキシキンおよびメチルドパは 50% polyethylene glycol (PEG)300 を含有する phosphate-buffered saline (PBS) に溶解させ、マウス用鉄ゾンデを用いて経口投与した。エトキシキンは 10 or 20 mM の溶液を 5 mL/kg (50 or 100 $\mu\text{mol/kg}$) の量で BCAS 処置 30 分前および術後は週に 3 回反復投与した。メチルドパは、20 or 40 mM の溶液を 5 mL/kg (100 or 200 $\mu\text{mol/kg}$) の量で BCAS 処置 30 分前および術後は週 5 回反復投与した。術後 1 週のマウスを western blotting に使用した。また、術後 4 週のマウスは行動試験の実施後、組織染色に用いた。なお、グリア細胞活性化マーカータンパク質の測定時には Tempol (5 mM) 投与群を作成した。Tempol は水道水に 5 mM を溶解し、BCAS 処置 3 日前より自由飲水させた (Fig. 6)。

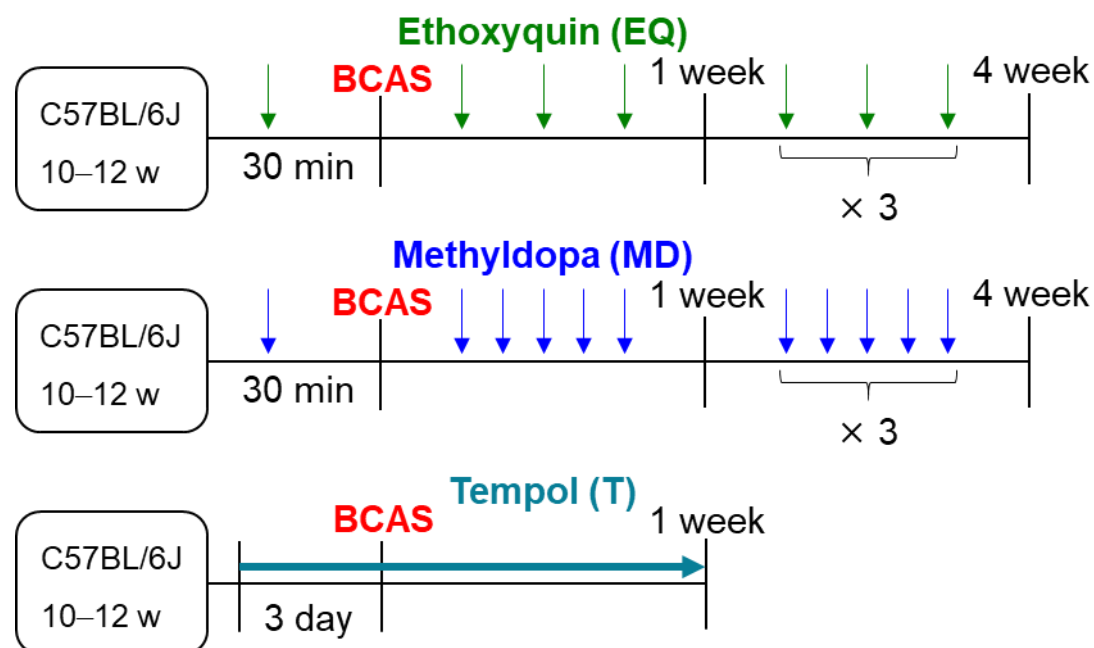


Figure 6. BCAS マウスにおけるエトキシキンおよびメチルドパの投与スケジュール。エトキシキンおよびメチルドパは目的の投与量となるように 50% PEG300 PBS に溶解させ、まず術前 30 分に 5 mL/kg 投与した。その後、エトキシキンは週 3 回、メチルドパは週 5 回経口投与した。Tempol は BCAS 処置 3 日前より水道水に 5 mM となるよう溶解し自由飲水させ、2 日に 1 回新しく溶解させたものと交換した。

脳血流量 (cerebral blood flow; CBF)測定

脳血流量は Laser-Doppler 血流計(Laser Doppler ALF21; ADVANCE)を用いて 頭部皮膚切開のみを行い、頭蓋骨上で測定した。Bregma より尾側 1 mm および右側 2 mm の位置にプローブを当て、BCAS 処置直前、直後、術後 1、3、7、14、28 日に測定した。CBF 値は術前の値に対する比率 (%)で評価した。

Klüver-Barrera (KB)染色

BCAS 術後 4 週のマウスから大脳を摘出し、右半球を 4%パラホルムアルデヒド液を入れたチューブに加え 4°C で一晩静置した。その後のパラフィン包埋および KB 染色は九州大学大学院医学研究院病理病態学に依頼した。

完成したスライドはキーエンス蛍光顕微鏡 (BZ-X810)にて観察、撮像した。白質傷害スコアは先行研究に従い⁴⁵、以下のように数値付けした。[0 (normal), 1 (nerve fiber disarrangement), 2 (marked vacuole formation), 3 (dis- appearance of myelinated fibers)]

新奇物体認識課題

BCAS 術後 4 週のマウスに対し実施した。本試行の前日、マウスを物体以外のすべての条件が本試行と同じ環境で、10 分間探索させた。当日、まずマウスを 2 つの同じ物体 (馴染物体; 茶褐色瓶) が置かれたケージで 5 分探索させた。90 分のインターバルの後、物体の 1 つを異なる形状物 (新奇物体; カラーブロック) に置き換え、マウスをさらに 5 分探索させた。新奇物体に置き換えた試行において、両対象物の探索時間に対する新奇物体の探索時間の割合を **discrimination index** として算出した。

Y 迷路

BCAS 術後 4 週のマウスに対し実施した (ただし新奇物体認識課題とは独立)。長さ 41.5 cm、高さ 10 cm、幅 4 cm の通路が 3 方向に伸びた装置 (YM-03M; 室町機械) を使用した。マウスを開始時点で中央に置き、8 分間迷路内を自由に移動させた。マウスが通路領域内に進入した回数を総進入数とし、3 回連続で異なる通路に進入した割合を **Alteration rate** として算出した。8 分間に通路に進入した回数が 14 以下のマウスは結果から除外した。

タンパク質の抽出および Western blotting

脳梁、海馬組織あるいは白質領域 (脳梁と線条体を含む) は 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride と 10 mM NaF、1 mM sodium orthovanadate および 1% protease inhibitor cocktail (ナカライテスク株式会社) を含む 20–40 倍量の lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 150 mM NaCl; 0.1% SDS; 1% Triton X-100; and 1% sodium deoxycholate) を用いて氷上、超音波破碎によってホモジネートを作成した。なお、本研究に利用した各脳領域を **Figure 7** に示した⁴⁶。ホモジネートは、氷中で 30 分インキュベート後、遠心分離 (16000 g、4°C、10 分) を行い、上清を Pierce BCA Protein Assay kit (Thermo Fisher Scientific) を用い BCA 法により測定した。loading buffer (54.1% Glycerol、0.05% Bromophenol blue、158.9 mM Tris-HCl (pH 6.8)、4.76% SDS) と混合したタンパク質 20 µg を、SDS-PAGE により電気泳動し分離した。その後 PVDF 膜へ転写し、ブロッキングワシ (ナカライテスク株式会社) でブロッキングを行い、抗体を用いて目的タンパク質を検出した。一次抗体は以下のメーカー、濃度で実施した。ionized calcium binding adapter molecule 1 (IBA1): 富士フイルム和光純薬株式会社 (1/2000)、glial fibrillary acidic protein (GFAP): Gene Tex (1/1000)、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH): MBL (1/4000)。以上の抗体は Can get signal (東洋紡株式会社) あるいは Signal Enhancer HIKARI (ナカライテスク株式会社) で希釈し、4°C で一晩反応させた。二次抗体は抗マウス IgG 抗体 (Millipore)、抗ラビット IgG 抗体 (R&D systems) を Can get signal あるいは Signal Enhancer HIKARI にそれぞれ 1/4000 に希釈し室温で 1 時間反応させた。検出試薬には Ez West Lumi plus (ATTO) を用いた。

結果は Image Lab (Bio-Rad)で発光強度を算出し、GAPDH 発現量で補正した後、Sham 群に対する比率で評価した。

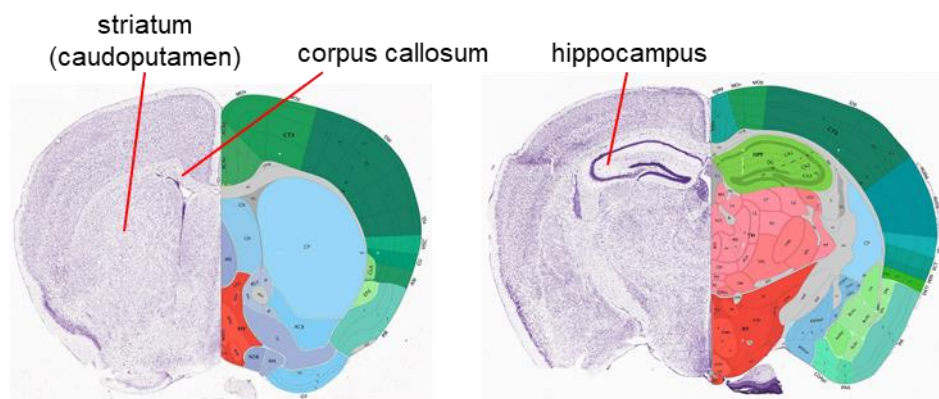


Figure 7. マウス脳部位の図。Allen Mouse Brain Atlas および Allen Reference Atlas - Mouse Brain の Nissl (左半球) と解剖学的注釈 (右半球) を示し、加筆した。本実験には脳梁 (corpus callosum)、海馬 (hippocampus)、線条体 (striatum、特に caudoputamen)を使用した。Allen Mouse Brain Atlas, mouse.brain-map.org and atlas.brain-map.org.

統計解析

Data are expressed as the mean $\pm$ standard error of the mean for each group. Statistical significance was evaluated using one-way ANOVA, followed by Dunnett's multiple comparison test. $p < 0.05$ was considered statistically significant. Analyses were performed using GraphPad Prism version 9.0 (GraphPad Software, San Diego, CA)

2-3. 結果

LPO 抑制剤投与時の BCAS マウスにおける脳血流量の変化

BCAS マウスでは、両総頸動脈へのマイクロコイルの装着により手術直後から脳血流量が低下する³¹。そこで、Laser-Doppler 血流計を用いて BCAS 手術時のマウス脳血流量を測定した。Laser-Doppler 血流計のプローブを頭蓋骨に固定し、中大脳動脈と前大脳動脈の境界部 (Bregma)位置より尾側へ 1 mm、右側へ 2 mm 移動させた点における血流量を BCAS 手術直前、直後、1 日、1 週、2 週、3 週、4 週後に測定した。その結果、BCAS 処置を行ったマウスでは脳血流量が低下していた。脳血流量は手術直後に術前の約 58% となり、その後ゆるやかに上昇し、4 週後には術前の 75% まで回復した。また、LPO 抑制剤を投与した群においても脳血流量測定を行ったところ、vehicle 群同様に手術直後より脳血流量が低下し徐々に回復した。このとき、BCAS 処置を行ったマウスの群間に有意な差は観察されなかった (Fig. 8) すなわち、これら化合物は脳血流量変化に影響を与えないことが示された。

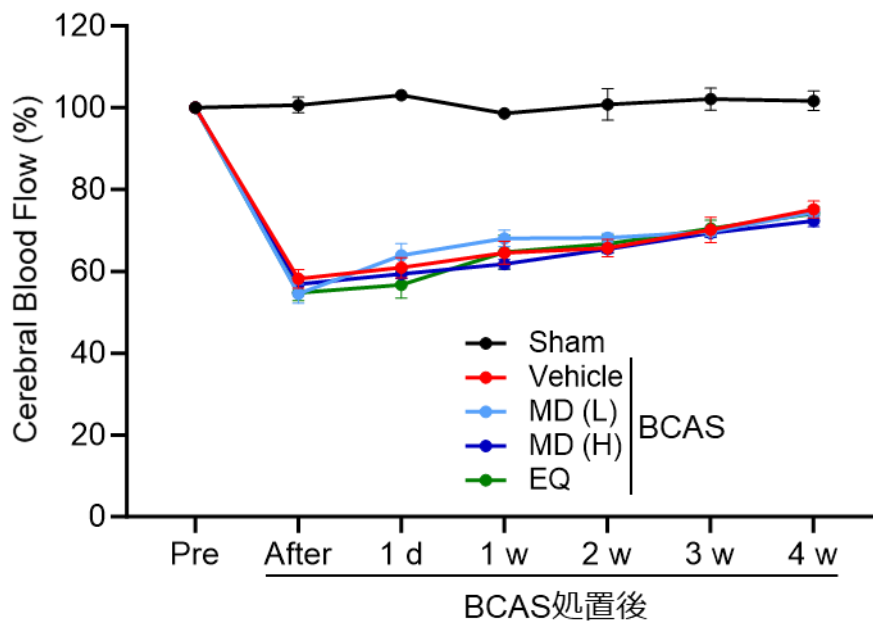


Figure 8. 化合物投与時の BCAS マウス脳血流量への影響。Laser-Doppler 血流計を用い、BCAS 手術直前、直後、1 日、1、2、3、4 週後のマウス頭部脳血流量を測定した。手術直前の脳血流量を 100% とし、各脳血流量を手術直前との比率で表した。MD: methyl dopa, EQ: ethoxyquin. MD (L): 100 μ mol/kg, MD (H): 200 μ mol/kg. (n = 3–5, presented as the mean + SEM)

LPO 抑制剤投与時の BCAS マウスにおける白質病変への影響

BCAS マウスでは術後約 1 ヶ月で脳梁や線条体といった白質部位に障害が生じる³¹。そこで、術後 4 週目に白質傷害の程度を調べるために、KB 染色による髄鞘染色性、及び先行研究で用いられている評価基準に従い傷害スコア⁴⁵を評価した。その結果、BCAS マウス術後 4 週において脳梁部位の染色性が低下し、白質病変スコア (Severity of the white matter lesions [WML])が上昇した。またエトキシキンおよびメチルドパの投与は、BCAS マウスにおける髄鞘染色性の低下や空胞形成を抑制した。同時に、白質病変スコアの有意な低下、あるいは低下傾向が観察された (Fig. 9a and b)。

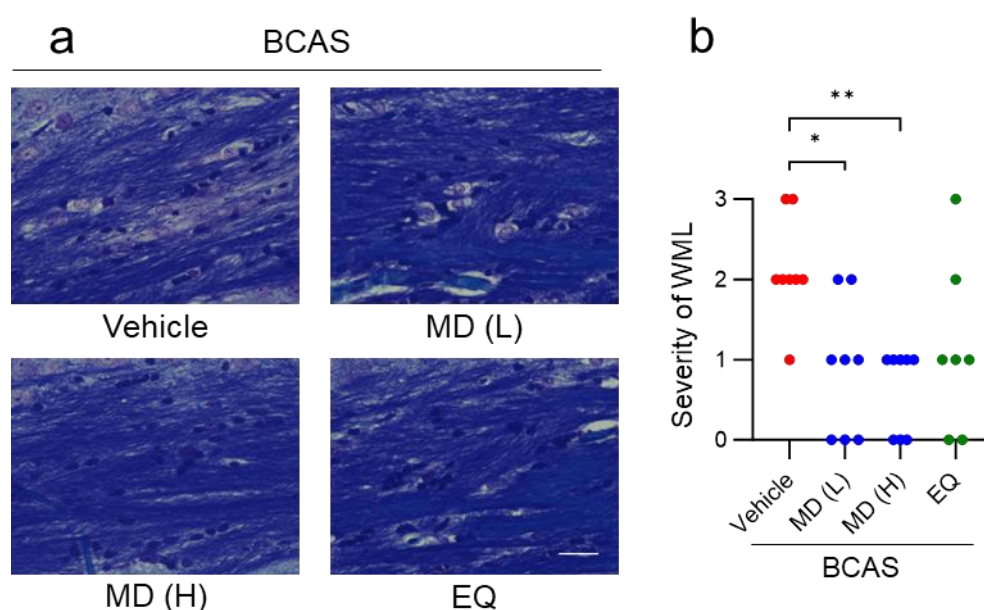


Figure 9. BCAS 術後 4 週の脳梁における白質の形態学的変化。(a)マウス右脳梁を KB 染色によって観察した (scale = 25 μ m)。KB 染色により髄鞘が青色に染色され、髄鞘の脱落により染色が低下する。(b) 脳梁の白質病変の重症度をスコア化した。(n = 8, presented as the mean + SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with BCAS vehicle group by one-way ANOVA followed by Kruskal–Wallis' and Dunn's post-test

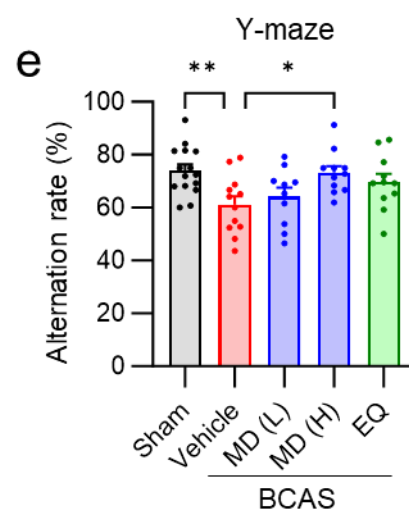
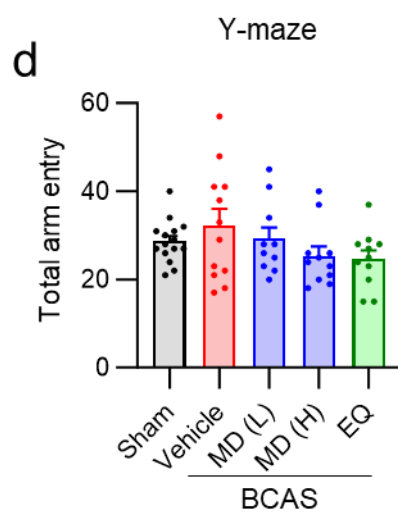
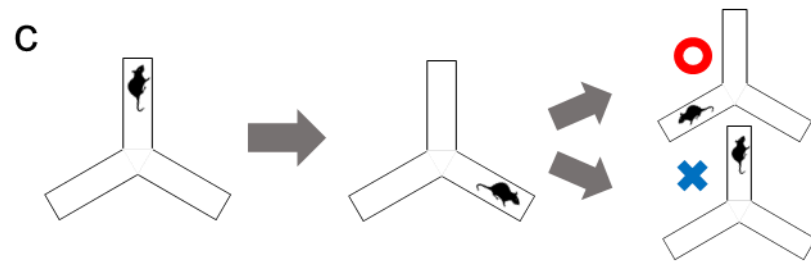
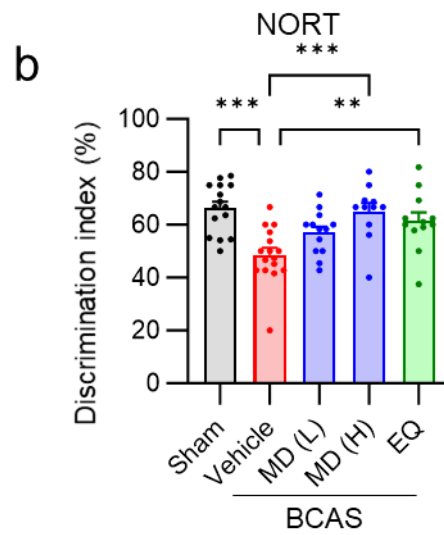
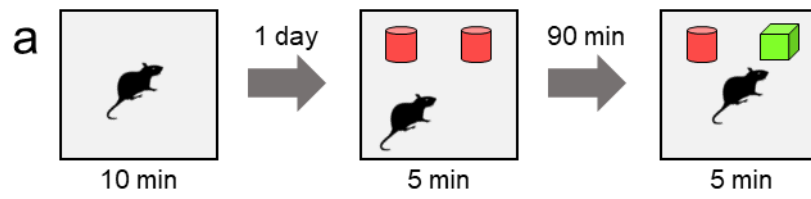
BCAS マウスにおける記憶障害と LPO 抑制剤の影響

次に、BCAS マウスの作業記憶障害を評価するため、行動試験として新奇物体認識課題 (novel object recognition test; NORT)を実施した。本評価系は、新奇性を好むげっ歯類の特性を利用した課題であり、強化因子を必要としない非空間的な作業記憶の指標となる⁴⁷。観察箱にあらかじめ同一物体を置いた状態でマウスに探索させ、一定時間後に一方を異なる物体に変更させた際に、2つの物体のうち、新しい物体を探索した時間の割合で評価した (Fig. 10a)。Sham 群では、試行時における新奇物体探索割合が約 67%であったのに対し、Vehicle を投与した BCAS 群では、新奇物体への探索割合が有意に減少

した。また、馴染物体と新奇物体の探索時間は同程度であった。一方で、エトキシキンおよびメチルドパを投与した群では、新奇物体への探索割合の低下が抑制された (**Fig. 10b**)。

さらに、別の行動試験として Y 迷路を用いて作業記憶障害を評価した。Y 迷路は、3 つの通路を自由に探索させ、通路の総進入回数を自発行動量として評価した。そして 3 回異なる通路へ進入した場合を成功とみなし、成功数の割合 (**Alternation rate**)を空間作業記憶として評価した (**Fig. 10c**)。BCAS 各群に対し術後 4 週で評価をしたところ、いずれの群においても自発行動量に差は観察されなかった (**Fig. 10d**)。Vehicle を投与した術後 4 週の BCAS 群では、Y 迷路における **Alternation rate** が有意に減少したのに対し、エトキシキンおよびメチルドパを投与した BCAS マウスでは **Alternation rate** の減少が抑制、もしくは抑制傾向であった (**Fig. 10e**)。

Figure 10. (next page) BCAS 術後 4 週のマウス作業記憶評価。 (a)NORT 実験スキーム。前日にマウスを同環境に適応させたのち、同じ 2 物体をマウスに提示した、90 分後、1 つを異なる物体に変え再びマウスに提示した。 (b)総探索時間のうち、新奇物体を探索していた時間の割合。 (c)Y 迷路実験スケール。3 方向に展開された通路内にマウスを入れ、8 分間探索させた。各通路への進入の総数、また、2 つ前までと異なる通路へ入った場合を成功、重複して通路に入る場合を失敗とし、成功割合を評価項目とした。 (d)総進入数および (e)異なる通路進入の成功割合。(n = 11–16, presented as the mean + SEM. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 compared with BCAS vehicle group by one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test.)



BCAS マウスにおけるグリア細胞の活性化

BCAS マウスでは、白質病変や記憶障害に先立ち、術後約 1 週よりミクログリアやアストロサイトが活性化し³¹、その結果炎症反応の亢進が生じる⁴⁸。そこで BCAS 術後 1 週のマウスの脳組織よりタンパク質を抽出し、グリア細胞マーカーの発現をウェスタンブロットにより測定した。

まず、エトキシキンによる保護能評価のため、BCAS 術後 1 週の白質領域 (脳梁および線条体)におけるグリア細胞マーカーの発現を測定した。また本検討では、これまでの半分量であるエトキシキン 50 $\mu\text{mol/kg}$ を投与した群と、既に先行研究にて保護効果が示されており、抗酸化能を有する化合物である Tempol を飲水させた群も同時に評価した¹⁶。BCAS 術後 1 週において、白質領域におけるミクログリアマーカータンパク質 IBA1 およびアストロサイトマーカータンパク質 GFAP の発現は増加した。その一方で、エトキシキンの投与群では、投与量に関わらず各グリア細胞マーカータンパク質の発現増加を有意に抑制した (Fig. 11)。同様に Tempol 飲水群では各グリア細胞マーカータンパク質の発現は抑制および抑制傾向が示された (Fig. 11)。

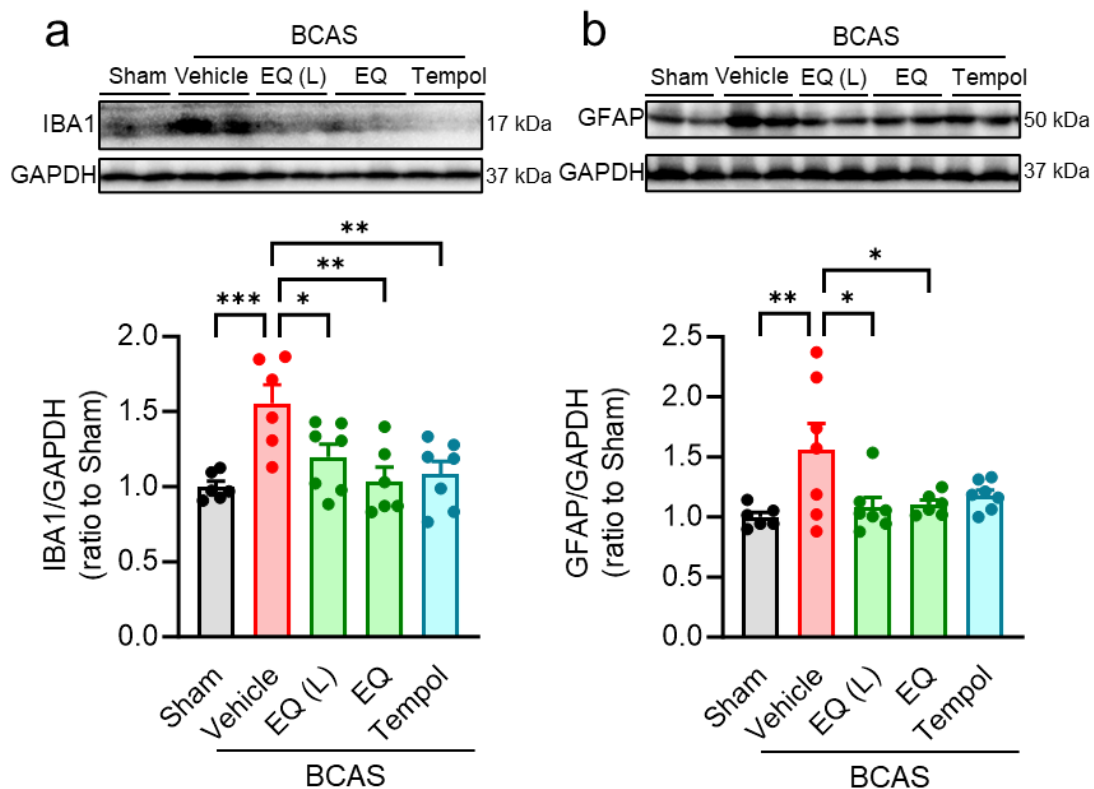


Figure 11. エトキシキン投与時の BCAS 術後 1 週のマウス白質領域におけるグリア細胞マーカータンパク質の評価。ミクログリアマーカー IBA1 (a) およびアストロサイトマーカー GFAP (b) タンパク質発現量をウェスタンブロットで測定した。EQ (L): 50 $\mu\text{mol/kg}$, EQ: 100 $\mu\text{mol/kg}$. (n = 6–7, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 compared with BCAS vehicle group) Each significance was analyzed using one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test.

次に、メチルドパ 200 $\mu\text{mol/kg}$ 投与群における保護能を評価した。ここでは、脳梁部位(線条体領域を含まない)および海馬部位での測定をそれぞれ実施した。脳梁部位においては、IBA1 が BCAS 術後 1 週で増加し、メチルドパの投与はその増加を抑制した (**Fig. 12a**)。一方、アストロサイトマーカーGFAP は、いずれの群においても有意差は得られなかった (**Fig. 12b**)。海馬部位においては、各グリア細胞マーカータンパク質は BCAS 術後 1 週で増加および増加傾向を示し、メチルドパの投与時には、有意な抑制あるいは抑制傾向が観察された (**Fig. 12c and d**)。

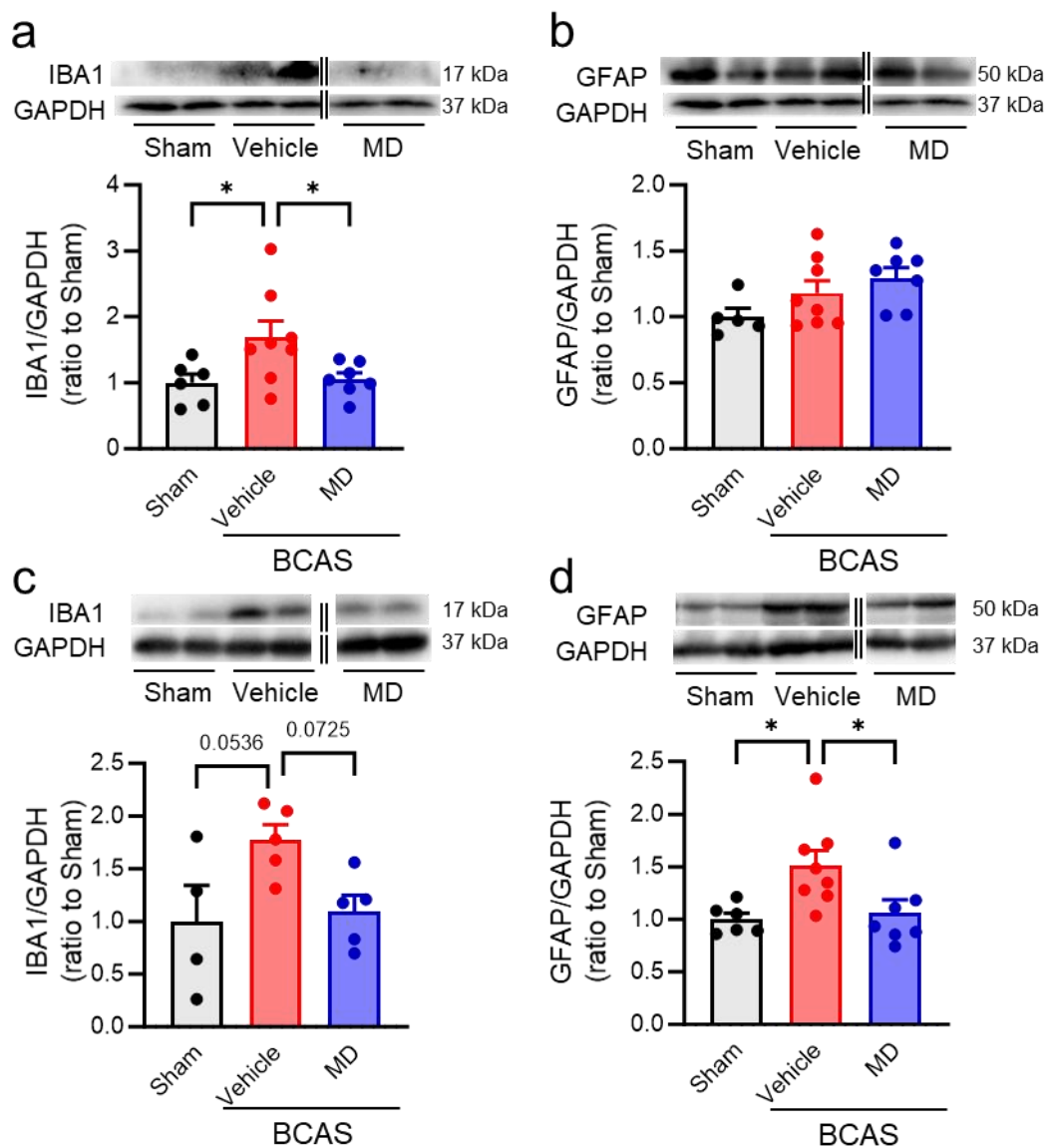


Figure 12. メチルドパ投与時の BCAS 術後 1 週のマウス脳梁および海馬におけるグリア細胞マーカータンパク質の評価。(a, b)マウス脳梁におけるミクログリアマーカーIBA1 (a)およびアストロサイトマーカーGFAP (b)タンパク質発現量をウエスタンブロットで測定した。(c, d)マウス海馬における IBA1 (c)および GFAP (d)タンパク質発現量をウエスタンブロットで測定した。(n = 4–8, *p < 0.05, compared with BCAS vehicle group) Each significance was analyzed using one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test.

2-4. 考察

本研究で我々は、ハイスループットスクリーニングにより見出された LPO 抑制剤として、エトキシキンおよびメチルドパを VaD モデルマウスに適用した。その結果、エトキシキンおよびメチルドパは共に BCAS マウスにおける作業記憶障害および白質病変を保護した。さらに、これら障害に先立って生じるミクログリアおよびアストロサイトの活性化を抑制した。本結果は LPO の抑制が脳血管障害、特に慢性脳低灌流に対する有効な治療ターゲットとなることを示唆するものである。

これまで、脳血管障害と酸化ストレスの関与は報告されてきたものの、その主な対象は水溶性の ROS であった。一方で脳組織は酸化されやすい脂質が豊富であり、ROS は多くの酸化脂質生成をもたらすことが考えられる。さらに近年は脂質の酸化によって生じた生成物の生理活性や、酸化脂質に依存した細胞死誘導機序も報告されている^{49,50}。エトキシキンは脂溶性の抗酸化剤であるため、経口投与であっても容易に BBB を通過し、病態モデルマウス脳内の酸化脂質生成を抑制できたと考えられる。また、メチルドパは L-type amino acid transporter (LAT) を介し脳へ移行可能である。LAT は脳組織に広範に発現しており⁵¹、また実際にラットに対しエトキシキンおよびメチルドパを投与した際に脳への移行が観察されている^{52,53}。

これまで、エトキシキンにはⅡ型糖尿病での末梢神経障害、化学療法時の神経毒性を保護したという報告があり^{41,42}、投与後脳に到達することにより、神経細胞に対する傷害を抑制可能であることが示唆されている。さらに、エトキシキンは心筋症モデルにおいてフェロトーシスを抑制し、保護効果をもたらした⁵⁴。

本研究で投与したエトキシキンの量は、マウスにおける LD₅₀ の 5% に満たず、実際にエトキシキンを投与した際に体重減少は観察されなかった。このエトキシキンの用量 100 μmol/kg (21.7 mg/kg) は、FDA のガイダンスに従ったヒト (60 kg) 用量換算時では 1.76 mg/kg となるが、世界保健機関 (WHO; <https://apps.who.int/pesticide-residue-jmpr-database>) が報告している許容一日摂取量 (0–0.005 mg/kg) または急性参照用量 (0.5 mg/kg) より高い。本研究では、VaD 病態における LPO の関与を明らかにするため、高用量でエトキシキンを使用した。しかしながら、BCAS マウスの白質におけるミクログリアおよびアストロサイトマーカータンパク質の発現量減少は、半分の用量でエトキシキンを投与した場合も観察された (Fig. 11)。さらに、投与回数や投与経路の最適化、高活性な誘導体の開発によって、より低用量での保護が可能になることが期待される。

メチルドパは高血圧治療薬として臨床で用いられている化合物である。メチルドパのヒト投与量は初期で 250–750 mg/day であり、通常維持量は 250–2000 mg/day である。本研究で保護効果を示したメチルドパの用量は 200 μmol/kg (42.2 mg/kg) であった。マウス経口投与での LD₅₀ は 5,370 mg/kg (25 mmol/kg) であること、本投与量をヒト投与量に換算すると 3.43 mg/kg であることから、毒性は小さいと考えられる。またメチルドパの主

作用は $\alpha 2$ 受容体活性化を介した降圧作用であるが、臨床での投与量と比較してかなり低用量で用いており、実際に BCAS マウスにおける脳血流量に影響を及ぼさなかった (Fig. 8)。このことから、メチルドパの保護作用は $\alpha 2$ 受容体には依存しないと考えられる。

本研究では、LPO 抑制剤としてエトキシキンおよびメチルドパを BCAS マウスに投与することでミクログリアおよびアストロサイトのマーカータンパク質増加を抑え、グリア細胞活性化の抑制が示唆された。過去の報告より、ミクログリアとアストロサイトは両者が病態悪化に寄与していることが示唆されている。中枢では主にミクログリアに発現する Transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) をノックアウトしたマウスでは、ミクログリア活性の低下と BCAS マウス術後 4 週の作業記憶障害の悪化が抑制された⁴⁸。またアストロサイト特異的に IkB α ドミナントネガティブ体を発現させたマウスに BCAS 処置を行った際も、作業記憶障害の抑制が観察されている⁵⁵。ただし両グリア細胞が病態下で必ずしも同じ挙動を示すわけではなく、BCAS マウス中のグリア細胞の活性化を経時的に評価した研究では、アストロサイトの活性化はミクログリア活性化より少し遅れて、術後 2 週より観察されている³¹。また、脳梁と海馬に分布するアストロサイトの形態は異なっており、脳梁アストロサイトの GFAP 発現は定常時でも高い⁵⁶。こうしたことが、本研究のアストロサイト活性評価で、脳領域に異なる結果が得られた一因と考えられる。

まとめると、本研究では、VaD モデルマウスの疾患進展に対し、LPO 抑制剤として見出されたエトキシキンおよびメチルドパが病態を保護することを明らかにした。慢性脳低灌流により生じる細胞傷害および炎症反応亢進は長期的に脳の状態を悪化させ認知機能の低下などをもたらす可能性がある。エトキシキンおよびメチルドパによる病態保護効果より、我々は LPO が慢性的な脳血管障害、それに付随する VaD の治療ターゲットとなりうるものと考えている。

2-5. 小括

本章では、VaD モデルマウスとして慢性脳低灌流により白質病変および作業記憶障害をもたらす BCAS マウスを用い、所属研究室のハイスループットスクリーニングで見出された LPO 抑制剤であるエトキシキンおよびメチルドパの病態保護効果を評価した。

その結果、BCAS マウスにおいて術後 4 週で観察された脳梁部位の白質病変は、各化合物の投与により抑制された。加えて、各化合物の投与は BCAS 術後 4 週で観察される作業記憶障害を有意に抑制した。BCAS マウスでは白質病変や作業記憶障害に先立って、グリア細胞の活性化による炎症反応の亢進が明らかとなっている。そこでミクログリアおよびアストロサイトのマーカータンパク質を測定したところ、BCAS 処置後 1 週において増加した各マーカータンパク質発現は化合物投与により抑制された。両化合物による BCAS マウスの病態保護効果は、LPO が慢性脳低灌流による脳血管障害、それに付随する VaD の有用な治療ターゲットであることを示す結果である。

次章では、LPO によって生じる酸化脂質に着目し、慢性脳低灌流により生じる酸化脂質の生成およびその分子種について明らかにする。また BCAS マウスに LPO 抑制剤としてメチルドパを投与し、生成した酸化脂質が抑制されるかを検証した。

第三章

血管性認知症モデルマウスにおける酸化脂質生成 およびメチルドパによる抑制機構の解析

3-1. 序論

脳組織における脂質組成について

序論にも述べた通り、脳組織には PUFA が豊富に含まれている。しかしながら脳の領域によって脂質の分布は多様である。髄鞘が含まれる白質領域は灰白質に比べ構成成分中の総脂質の割合が高いが、脂質種として多いのは主に飽和脂肪酸や一価不飽和脂肪酸を含むスフィンゴ脂質である。またリン脂質は、phosphatidylserine は白質・灰白質の間に大きな差はなく、phosphatidylcholine (PC) および PE はむしろ灰白質の方が多いようである¹⁸。さらに PUFA を含むリン脂質の割合は、灰白質により多く含まれている¹⁹。Sugiura らはマウスの脳を用いて PC の質量分析イメージングを実施し、AA 含有 PC は特に海馬領域に多く局在していることを報告している⁵⁷。その一方で、白質において髄鞘を形成するオリゴデンドロサイトには高濃度の鉄が含有されている⁵⁸。酸化ストレスの亢進時には、細胞内鉄によるフリーラジカル生成が起こるため、膜脂質の酸化が生じると考えられる。以上より、脳血管障害時には脳領域選択的に LPO が亢進し、酸化される脂質種が部位ごとに異なることが想定される。

VaD 病態中の酸化脂質生成のタイミングおよび LPO 抑制機構

神経変性疾患において、酸化脂質が生成する機序の一つにフェロトーシスが挙げられる。フェロトーシスは鉄依存的であり酸化脂質の蓄積を特徴とする⁵⁹。本細胞死は、主に過酸化リン脂質を還元する抗酸化酵素である glutathione peroxidase 4 (GPx4) の活性が低下することで誘導される。また脳血管障害時には、傷害を受けた神経細胞や脳血管障害に応答したグリア細胞よりグルタミン酸が放出されるが^{60,61}、細胞外グルタミン酸濃度の上昇は、シスチン・グルタミン酸アンチポーターである xCT 輸送体を介した細胞内へのシスチン取り込みを阻害する⁵⁹。これにより、細胞内グルタチオンの枯渇が生じ、フェロトーシスが生じることが考えられる。実際これまでに、脳虚血再灌流モデルマウスに対しフェロトーシス抑制剤である Liproxstatin-1 を投与すると、マウスの脳梗塞巣のサイズが減少することが報告されている⁶²。さらに、前頭葉ニューロン中 GPx4 を欠損させたマウスでは認知機能障害と神経変性が観察されている⁶³。

また、モデルマウスの脳を用いた研究では、病態時に酸化の基質となるリピドームの変化や酸化脂質の生成が観察されており、例えば、脳外傷モデルマウスでの組織測定時には、多様な構造を持った酸化カルジオリピンや酸化遊離脂肪酸が増加している^{64,65}。また脳以外の、複数の臓器でも虚血再灌流障害による酸化リン脂質が増加しているとの報告がある^{66,67}。

しかしながら、脳組織での酸化脂質評価は、いずれも急性期のモデルを用いて行われてきた。上記のようなこれまでに報告されてきた脳組織での酸化脂質評価は、多くが急性期の障害を反映している。一方で、慢性脳低灌流をはじめとした脳血管障害時の LPO

亢進の評価は、主に LPO 最終産物である 4-HNE の生成や 2-thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)法による MDA の検出によるものであった⁴⁴。そのため、脳血管障害時、特に慢性疾患では、いつ、どの部位で、どのような酸化脂質が生成されるかについては全く不明であった。

そこで本研究では、慢性脳低灌流モデルである BCAS マウスを用い、フェロトーシスの寄与および生成する酸化脂質の変動タイミングやその種類について検討を行った。BCAS マウスの脳血流量はマイクロコイル装着直後が最も低下する³¹。そのため、急性時の病態に近いと考えられる術直後 (6 時間、1 日)、グリア細胞活性化が生じる前である術後 3 日、実際に活性化が生じる術後 1 週間、白質病変の生じる術後 4 週の時期に分け、各種測定を行った。また、LPO 抑制剤としては第二章で用いたメチルドパを用い、酸化脂質の生成に対する効果について評価した。

3-2. 方法

試薬・機器

メチルドパは東京化成工業より購入した。その他の試薬は、Sigma-Aldrich、和光純薬株式会社、東京化成工業より購入したものをを用いた。ReverTra Ace qPCR RT Master Mix、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix は東洋紡株式会社から購入した。サンプル溶液中の RNA 濃度測定は、サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社の NanoDrop One にて行った。逆転写による cDNA の合成には、バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社の T100 サーマルサイ클ラーを用いた。リアルタイム PCR は、CFX Connect リアルタイム PCR 解析システムにて行った。ウエスタンブロット解析では、ChemiDoc MP を用いて検出した。液体クロマトグラフ質量分析計 (liquid chromatograph-mass spectrometry; LC-MS)には、LCMS-8060 (株式会社島津製作所)を用いた。

BCAS 処置および化合物投与

BCAS マウスは第二章と同様に処置した。術後 3 日、1 週、4 週のマウスを western blotting に、1 日、3 日、1 週のマウスを RT-PCR に、また術後 6 時間、1 日、3 日、1 週のマウスを脂質の測定に用いた。

RNA 抽出および RT-PCR

脳梁組織あるいは線条体組織に ISOGEN II (ニッポンジーン)を添加し、ホモジネートを作成した。ISOGEN II 添付のプロトコルに従い、RNA を抽出した。その後、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix を用いて cDNA を合成した。これを Nuclease-free 水にて 0.5 ng/ μ L に希釈し、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix を用いてリアルタイム PCR を行った。リアルタイム PCR は CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)にて、95°C 15 秒、55–60°C 60 秒を 45 サイクル行い、最後に融解曲線解析を実施した。各遺伝子の mRNA 量は *Gapdh* の mRNA 量で補正した。使用したプライマーの配列は Table 1 に示した。なお、PCR に使用したプライマーは Eurofins genomics に合成を依頼した。

脂質抽出および LC/MS/MS 測定

凍結させた組織試料 (脳梁および海馬)を、100 μ M の dibutyl hydroxytoluene および内部標準として 100 nM 18:1-d7 LysoPC (Avanti Polar Lipids) を含む抽出液 (methanol:chloroform:water = 5:2:2) 1 mL 中 (海馬)および 500 μ L 中 (脳梁)に加え、マイクロマッシュホモジナイザーを用いて試料をホモジナイズした。抽出液を氷浴中で 5 分間超音波処理し、遠心分離 (6000 g、10 分、4°C)後、上清 700 μ L を回収し、235 μ L の chloroform および 155 μ L の精製水を加えた。この時脳梁は各組織上清 350 μ L を回収し、2 組織分を 1 サンプルに集めた。ボルテックスおよび遠心分離 (16000 g、2 分、4°C)後、

下層 (有機層)200 μ L を新しいチューブに移し替え、N₂ ガス下で乾固し、methanol 250 μ L に再溶解した後、0.45 μ m シリンジフィルターで濾過を行い、測定時まで-80°C にて保存した。酸化リン脂質の測定は抽出液を希釈せずに行い、未酸化リン脂質の測定は MeOH で 50–200 倍希釈して測定に用いた。

脂質抽出液は LCMS-8060 (島津製作所)を用い、multiple reaction monitoring (MRM) mode で測定した。未酸化 PC および lysoPC は negative ion mode で脂肪酸アシル部位に由来するプロダクトイオン、positive ion mode で極性頭部 (phosphocholine)に由来するプロダクトイオンを測定することでピークを同定した。PE 38:4;O2 および oxPC は先行研究⁶⁸ および脳組織を AAPH で *ex vivo* 酸化したサンプルにおけるデータを基に、極性頭部に由来するプロダクトイオンの測定よりピークを決定した。解析は LabSolutions (株式会社島津製作所)あるいは Multi-ChromatoAnalysT (株式会社ビーフォース)で行った。各脂質の存在量は、ピーク面積値を内部標準脂質のピーク面積値および組織重量で除し、Sham 群の平均を 1 とした際の相対値で表した。本分析に用いたイオントランジションを Table 2 に示した。

LC/MS/MS 測定条件

Column: GL Sciences, InertSustain C18 column (2.1 mm $\times$ 150 mm, 3 μ m particle size, GL Sciences)

Column Temperature: 40°C

Mobile Phase: A: 5.0 mM Ammonium formate in acetonitrile:H₂O = 2:1

B: 5.0 mM Ammonium formate in isopropanol:MeOH = 95:5

Time Program (B%): 0–22.5 min, 0–100%; 22.5–27.5 min, 100%

Flow Rate: 0.4 mL/min

Injection Volume: 5 or 10 μ L

Autosampler temperature: 4°C

タンパク質抽出および Western blotting

タンパク質抽出および Western blotting は第二章と同様に行った。使用した抗体は以下である。1 次抗体: anti-4-HNE (1/2000; abcam) 2 次抗体: anti-rabbit IgG (1/4000; R&D systems)なお、4-HNE 修飾タンパク質の発現量は Image Lab (Bio-Rad)で発光強度を算出し、Coomassie brilliant blue (CBB)染色による総タンパク質量で補正した後、Sham 群に対する比率で評価した。

統計解析

Data are expressed as the mean $\pm$ standard error of the mean for each group. Statistical significance was evaluated using one-way ANOVA, followed by Dunnett's multiple comparison

test. $p < 0.05$ was considered statistically significant. Analyses were performed using GraphPad Prism version 9.0 (GraphPad Software, San Diego, CA)

Gene name		primer sequence (5'→3')
<i>Gapdh</i>	forward	AATGTGTCCGTCGTGGATCTGA
	reverse	GATGCCTGCTTCACCACCTTCT
<i>Pla2g7</i>	forward	ATTTCTTGGAACACCCAGTATTGT
	reverse	GAACATTCTATTGCTCTTTGCTGA
<i>Pnpla8</i>	forward	TGGTGGAGGAACAAGAGGTG
	reverse	TATGGCCCCTGTGCTTACTC
<i>Pla2g6</i>	forward	GTGCCTGTAACTGTGTAGATGTC
	reverse	CTCTGAGTCCTAGTGTGAGATGGA
<i>Pla2g15</i>	forward	GGCCTCCTGTTACCTCTGTT
	reverse	GGTTACCCAAATCACCAGGC
<i>Prdx6</i>	forward	GTCGAGAAGGACGCTAACAAC
	reverse	GGGTAGAGGATAGACAGCTTCAG
<i>Pla2g16</i>	forward	GACGAGGAGTACACCCCACT
	reverse	CTCACAGTTCTCGCTGGTCA
<i>Pla2g4e</i>	forward	AATCGGCTCCAGCTCTATGC
	reverse	CCCCTCCTGAGAACTGCAAG
<i>Pla2g4a</i>	forward	AGAAGACCTGGGAAGTGTGAGA
	reverse	TCTGGAGTGTCCAGCATATCG
<i>Pla2g2e</i>	forward	ACAGGGACAGAGCTTGCACT
	reverse	TTCATCCTGGGGGAGGTAG
<i>Pla2g5</i>	forward	GACCGTTGTTATGGGCAA
	reverse	AGGAGTCGTGTTTCGAGATGA
<i>Gpx4</i>	forward	GCAGGAGCCAGGAAGTAATC
	reverse	GGCTGGACTTTCATCCATTT
<i>Ptgs2</i>	forward	CAGACAACATAAACTGCGCCTT
	reverse	GATACACCTCTCCACCAATGACC
<i>Hmox1</i>	forward	GTCAAGCACAGGGTGACAGA
	reverse	ATCACCTGCAGCTCCTCAAA

Table 1. RT-PCR プライマーリスト

Positive ion mode			Positive ion mode		
name	Precursor ^{m/z}	Product ^{m/z}	name	Precursor ^{m/z}	Product ^{m/z}
LPC18:1(d7)	529.40	184.05	PE 38:4;O2	800.55	659.50
PC 34:2;O	774.55	184.05	PC 25:1;O	650.45	184.05
PC 36:2;O	802.60	184.05	PC 27:1;O	678.45	184.05
PC 36:3;O	800.60	184.05	PC 27:2;O	676.45	184.05
PC 36:4;O	798.55	184.05	PC 21:1;O	594.40	184.05
PC 38:4;O	826.60	184.05	PC 23:1;O	622.40	184.05
PC 38:5;O	824.60	184.05	PC 23:2;O	620.40	184.05
PC 38:6;O	822.55	184.05	PC 20:1;O	580.35	184.05
PC 40:6;O	850.60	184.05	PC 22:1;O	608.40	184.05
PC 40:7;O	848.60	184.05	PC 22:2;O	606.40	184.05
PC 34:2;O2	790.55	184.05	PC 25:1;O2	666.45	184.05
PC 36:2;O2	818.60	184.05	PC 27:1;O2	694.45	184.05
PC 36:3;O2	816.55	184.05	PC 27:2;O2	692.45	184.05
PC 36:4;O2	814.55	184.05	PC 21:1;O2	610.35	184.05
PC 38:4;O2	842.60	184.05	PC 23:1;O2	638.40	184.05
PC 38:5;O2	840.55	184.05	PC 23:2;O2	636.40	184.05
PC 38:6;O2	838.55	184.05	PC 20:1;O2	596.35	184.05
PC 40:6;O2	866.60	184.05	PC 22:1;O2	624.40	184.05
PC 40:7;O2	864.55	184.05	PC 22:2;O2	622.35	184.05

Positive ion mode			negative ion mode			negative ion mode		
name	Precursor ^{m/z}	Product ^{m/z}	name	Precursor ^{m/z}	Product ^{m/z}	name	Precursor ^{m/z}	Product ^{m/z}
18:1 (d7) LPC	529.40	184.05	PC 16:0_18:2	802.55	255.25	PC 18:0_20:2	858.60	283.25
PC 30:0	706.55	184.05	PC 18:0_18:2	830.60	283.25	PC 18:0_22:4	882.60	283.25
PC 32:0	734.55	184.05	PC 18:1_18:2	828.60	281.25	PC 18:0_22:5	880.60	283.25
PC 32:1	732.55	184.05	PC 16:0_20:4	826.55	255.25	PC 18:1_20:0	860.65	281.25
PC 34:0	762.60	184.05	PC 18:0_20:4	854.60	283.25	PC 18:1_20:2	856.60	281.25
PC 34:1	760.60	184.05	PC 18:1_20:4	852.60	281.25	PC 18:1_22:0	888.65	281.25
PC 34:2	758.55	184.05	PC 16:0_22:6	850.55	255.25	Positive ion mode		
PC 36:0	790.65	184.05	PC 18:0_22:6	878.60	283.25	name	Precursor ^{m/z}	Product ^{m/z}
PC 36:1	788.60	184.05	PC 18:1_22:6	876.60	281.25	LPC 16:0 (+)	496.35	184.05
PC 36:2	786.60	184.05	PC 16:0_16:0	778.55	255.25	LPC 16:1 (+)	494.30	184.05
PC 36:3	784.60	184.05	PC 16:0_18:0	806.60	255.25	LPC 18:0 (+)	524.35	184.05
PC 36:4	782.55	184.05	PC 16:0_18:1	804.60	255.25	LPC 18:1 (+)	522.35	184.05
PC 38:0	818.65	184.05	PC 18:0_18:0	834.60	283.25	LPC 18:2 (+)	520.35	184.05
PC 38:1	816.65	184.05	PC 18:0_18:1	832.60	283.25	LPC 20:4 (+)	544.35	184.05
PC 38:2	814.65	184.05	PC 18:1_18:1	830.60	281.25	negative ion mode		
PC 38:3	812.60	184.05	PC 14:0_16:0	750.55	227.20	name	Precursor ^{m/z}	Product ^{m/z}
PC 38:4	810.60	184.05	PC 14:0_18:1	776.55	227.20	LPC 16:0 (-)	540.35	255.25
PC 38:5	808.60	184.05	PC 16:0_16:1	776.55	255.25	LPC 16:1 (-)	538.30	253.20
PC 38:6	806.55	184.05	PC 16:0_22:4	854.60	255.25	LPC 18:0 (-)	568.35	283.25
PC 40:1	844.70	184.05	PC 16:0_22:5	852.60	255.25	LPC 18:1 (-)	566.35	281.25
PC 40:4	838.65	184.05	PC 16:0_20:3	828.60	255.25	LPC 18:2 (-)	564.35	279.25
PC 40:5	836.60	184.05	PC 16:1_18:1	802.55	253.20	LPC 20:4 (-)	588.35	303.25
PC 40:6	834.60	184.05	PC 18:0_20:0	862.65	283.25			
PC 40:7	832.60	184.05	PC 18:0_20:1	860.65	283.25			

Table 2. 各リン脂質測定時のイオンランジション一覧

3-3. 結果

BCAS マウスにおけるフェロトーシス関連因子の測定

まず、慢性脳低灌流時にフェロトーシスが亢進しているかどうかを明らかにするため、BCAS マウス白質領域におけるフェロトーシスマーカーについて測定した。ここでは、過酸化脂質を還元することでフェロトーシス抑制に寄与する *Gpx4*、および AA 代謝酵素でありフェロトーシス誘導時に発現量が増加するとされる prostaglandin peroxidase synthase 2 (*Ptgs2*)の mRNA 発現量を評価した⁶⁹。測定の結果、BCAS 術後 1 日、3 日、および 1 週にて *Gpx4* および *Ptgs2* の発現量は有意に変動しなかった (**Fig. 13a and b**)。

また、フェロトーシス細胞では、AA またはアドレン酸 (Adrenic acid; AdA)を有する PE の二酸化物および三酸化物が増加するとされている²⁵。AdA 含有 PE は AA 含有 PE と比べ存在量が少ないことから、PE 18:0/20:4 に由来する酸化 PE を含む PE 38:4;O2 を BCAS 術後 6 時間、1 日、3 日および 1 週のマウス脳梁および海馬を用いて LC/MS/MS で測定した。脳梁は採取できるサンプル量が少ないため、2 匹分を 1 サンプルにプールして使用した。測定の結果、いずれの組織、術後期間においても PE 38:4;O2 は有意に増加しなかった (**Fig. 13c and d**)。

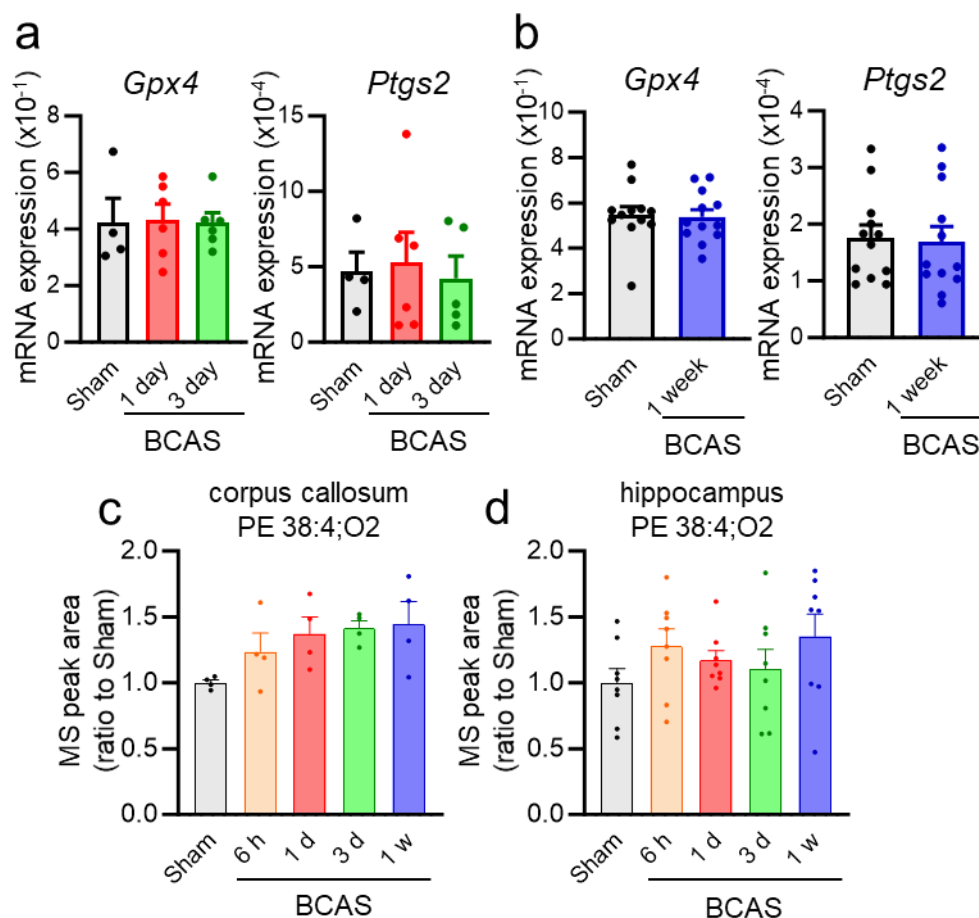


Figure 13. BCAS マウスにおけるフェロトシス関連因子の変動評価。(a, b)BCAS 術後 1 日、3 日のマウス脳条体 (a)および BCAS 術後 1 週のマウス脳梁 (b)における *Gpx4* および *Ptgs2* の mRNA 発現量を RT-PCR で測定した。各遺伝子の発現量は *Gapdh* に対する相対発現量として算出した。(n = 4–12, compared with sham group) (c, d)BCAS 術後 6 時間から 1 週におけるマウス脳梁 (c)および海馬 (d)領域における PE 38:4;O2 の相対生成量。PE 38:4;O2 に相当する MS ピーク面積を組織重量および内部標準で補正した後、Sham に対する比を求め評価した。(n = 4–8, compared with sham group) Each significance was analyzed using one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test.

BCAS マウスにおける酸化脂質の生成評価

次に、BCAS マウスにおいて LPO が亢進する時期を追跡した。BCAS 術後 3 日、1 週および 4 週のマウスより脳梁および海馬のタンパク質を抽出し、western blotting にて 4-HNE 修飾タンパク質の発現を測定した。その結果、脳梁部位では有意な増加は観察されなかった一方で、海馬領域では、術後 1 週において 4-HNE 修飾タンパク質に由来する一部のバンド強度が増加した (Fig. 14)。

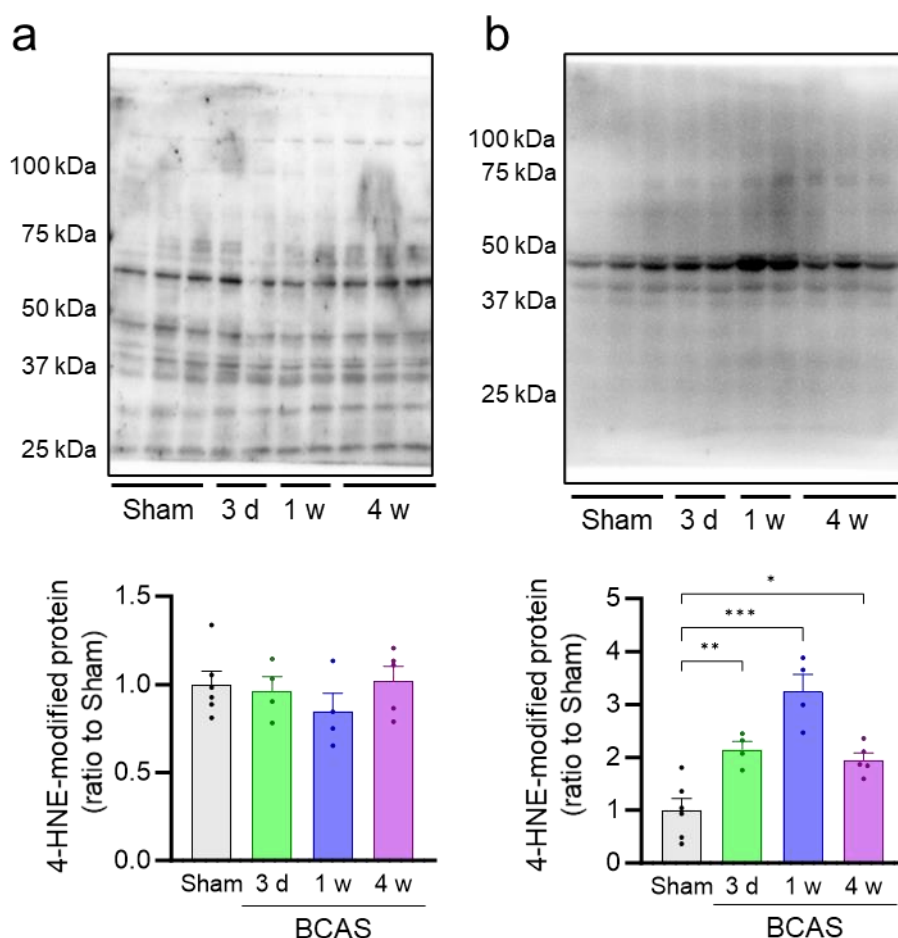


Figure 14. BCAS マウスにおける 4-HNE 修飾タンパク質の発現変動評価。BCAS 術後 3 日、1 週、4 週のマウスの脳梁 (a)および海馬 (b)からタンパク質を抽出し、4-HNE 修飾タンパク質の発現をウェスタンブロットで測定した。発現量は、37–50 kDa のバンド強度を CBB 染色による総タンパク質量で補正し、Sham の平均強度を 1 とした相対値で評価した。 (n = 4–6, *p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001, compared with sham group) Each significance was analyzed using one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test.

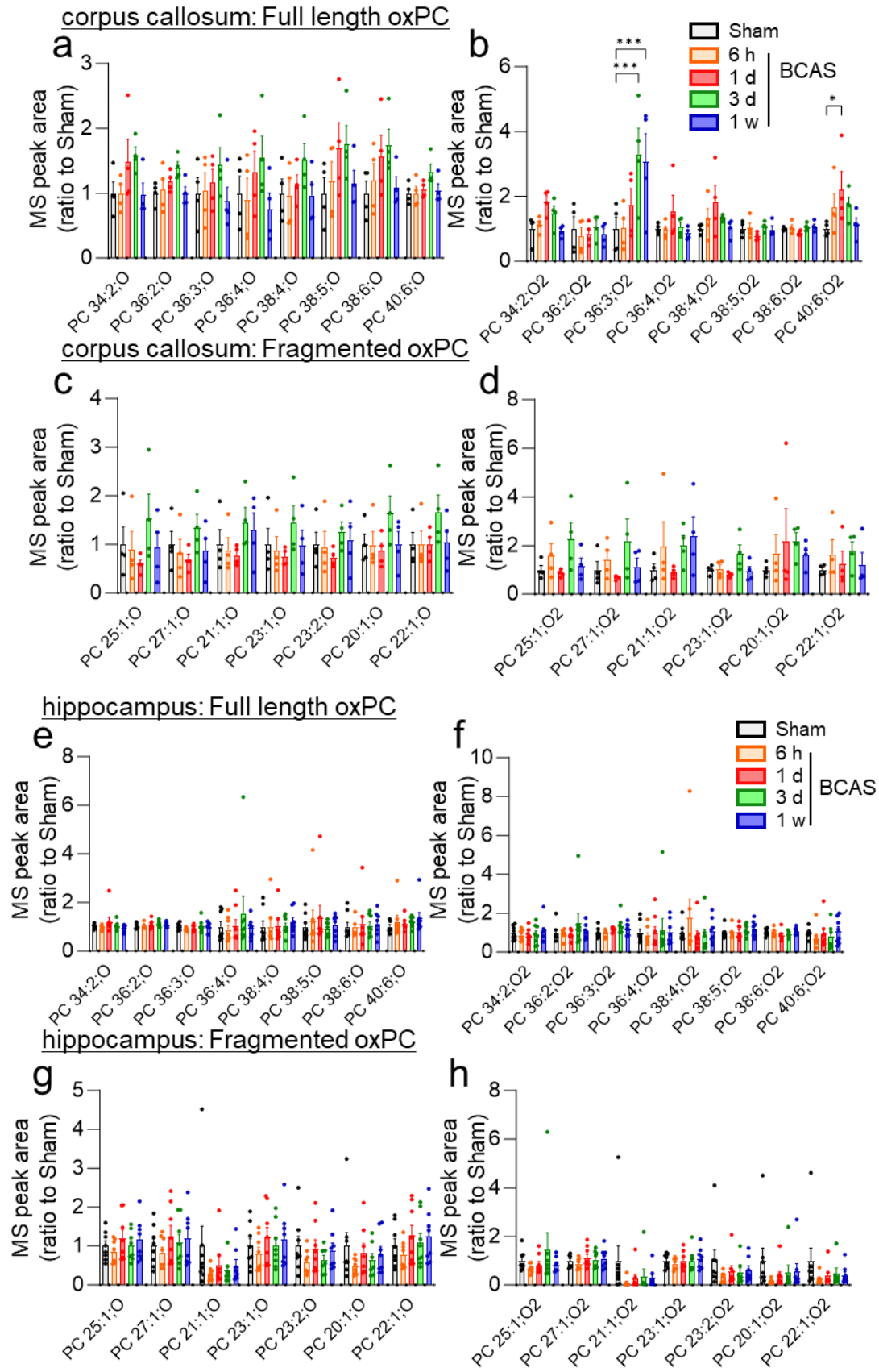
続いて、LC/MS/MS を用いて BCAS マウス中で生じる oxPC を網羅的に解析した。解析した oxPC は、*sn*-1 位に飽和脂肪酸であるパルミチン酸 (16:0)、ステアリン酸 (18:0) または一価不飽和脂肪酸であるオレイン酸 (18:1)を、*sn*-2 位に PUFA であるリノール酸 (linoleic acid; LA) (18:2)、AA (20:4)または DHA (22:6)を有し、その中で脳に多く存在する上位の PC に由来する oxPC を測定した。測定対象の酸化物は、一酸化物、二酸化物、断片化して生成するアルデヒドおよびカルボン酸のうち全サンプルでピーク検出が可能な分子種とした。MRM トランジションには、各 oxPC をプリカーサーイオン、PC 極性頭部である phosphocholine に由来する m/z 184.05 をプロダクトイオンに設定し、

positive ion mode で測定した。また、脳領域は脳梁および海馬を選択し、BCAS 術後 6 時間から 1 日、3 日、1 週間の 4 点のサンプルを使用した。各 oxPC 量は、MS/MS クロマトグラムのピーク面積値を算出し、組織重量および内部標準脂質の面積値で補正した。

脳梁における oxPC を測定した結果、一酸化物、断片化 oxPC は術後いずれの期間においても変動しなかった。その一方で、二酸化物において PC 36:3;O2 についてのみ、BCAS 術後 3 日および 1 週のマウス脳梁で有意に増加した (Fig. 15a–d)。

次に海馬における oxPC を測定したところ、アルデヒド、カルボン酸を含むいずれの酸化リン脂質種においても有意な増加は観察されなかった (Fig. 15e–h)。

Figure 15. (next page) BCAS マウスにおける oxPC の評価。BCAS 術後 6 時間、1 日、3 日、1 週のマウスの右脳梁 (a–d) および右海馬 (e–h) を採取した後、各組織の脂質を抽出し、LC/MS/MS にて各酸化リン脂質に相当する分子量を選択し、MRM で測定した。脂質抽出の際、脳梁は 2 匹を 1 サンプルにまとめて測定した。Full length の一酸化物 (a and e)、二酸化物 (b and f)、断片化 oxPC のアルデヒド (c and g) およびカルボン酸 (d and h) に相当する MS ピーク面積を組織重量および内部標準で補正した後、Sham に対する比を求め評価した。(n = 4–8, *p < 0.05 and ***p < 0.001 by two-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test.)



メチルドパ投与時の BCAS マウス中酸化脂質の測定

以上の結果より、BCAS 処置を行ったマウスにおいて一部のみではあるが術後 3 日で oxPC が増加していた。そこで次に、LPO 抑制剤が BCAS 術後 3 日で観察された oxPC の増加を抑制可能かどうかについて検討した。

本検討では、LPO 抑制剤としてメチルドパを BCAS マウスに投与し、BCAS 術後 3 日の脳梁および海馬中の oxPC 変動を測定した。その結果、脳梁中の PC 36:3;O2 はメチルドパ投与マウスにおいて、BCAS-vehicle 群と比較しても有意に増加していた (**Fig. 16**)。他一部の二酸化物においても、メチルドパ投与における増加が観察された。一方で、メチルドパの投与により有意に減少する oxPC は無かった。海馬での測定の結果、PC 36:3;O2 は増加しなかった。一方で、異なる複数の oxPC 二酸化物がメチルドパの投与で増加した(**Fig. 17**)。

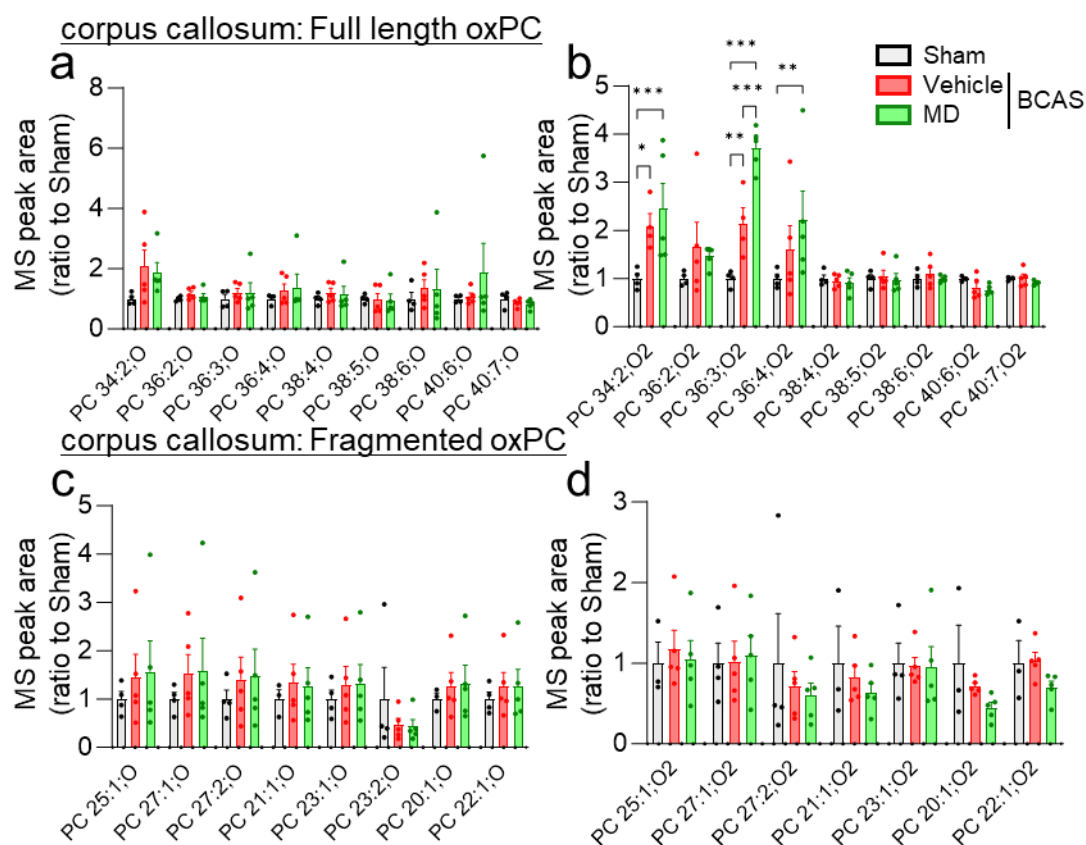


Figure 16. BCAS マウス術後 3 日におけるメチルドパ投与時の oxPC の評価。マウスの右脳梁を分取した後、脂質を抽出し、LC/MS/MS にて各酸化リン脂質に相当する分子量を選択し、MRM で測定した。脂質抽出の際、脳梁は 2 匹を 1 サンプルにまとめて測定した。Full length の一酸化物 (a)、二酸化物 (b)、断片化 oxPC のアルデヒド (c)およびカルボン酸 (d) に相当する MS ピーク面積を組織重量および内部標準で補正した後、Sham に対する比を求め評価した。(n = 4-5, *p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001, compared with sham group) Each significance was analyzed using two-way ANOVA with Tukey's post hoc test.

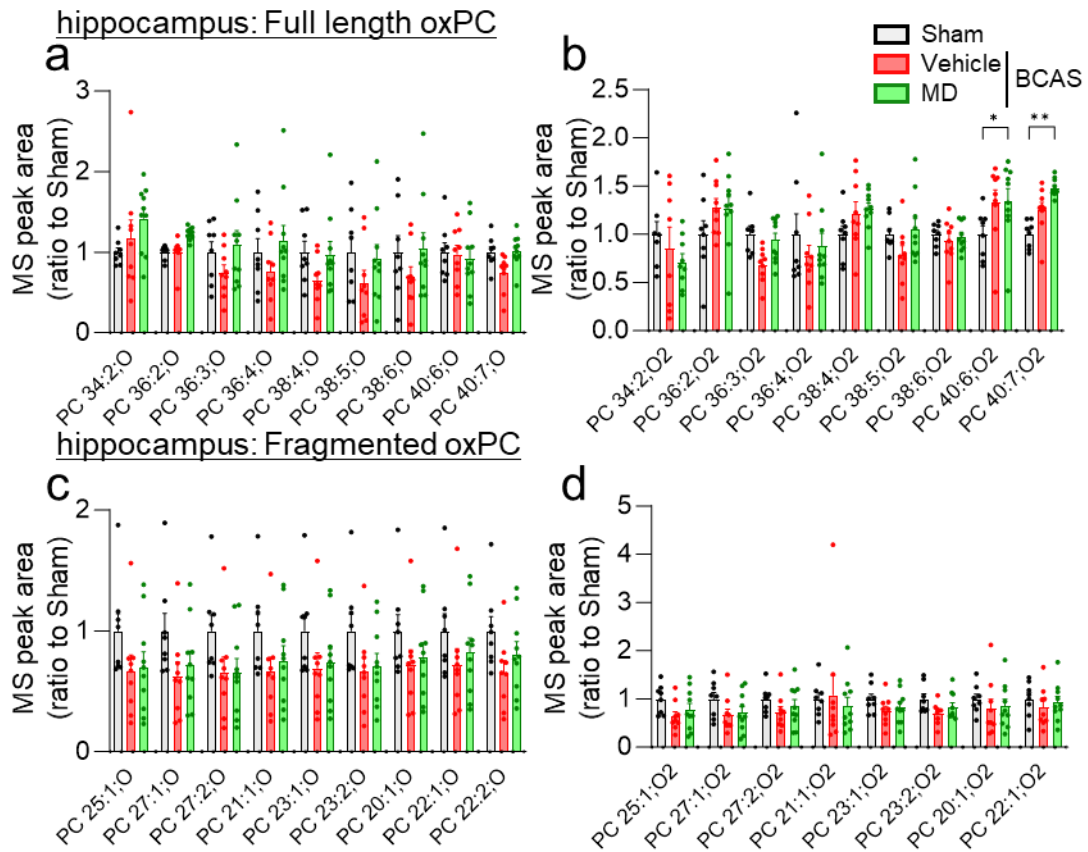


Figure 17. BCAS マウス術後 3 日におけるメチルドパ投与時の oxPC の評価。マウスの右海馬を分取した後、脂質を抽出し、LC/MS/MS にて各酸化リン脂質に相当する分子量を選択し、MRM で測定した。Full length の一酸化物 (a)、二酸化物 (b)、断片化 oxPC のアルデヒド (c)およびカルボン酸 (d) に相当する MS ピーク面積を組織重量および内部標準で補正した後、Sham に対する比を求め評価した。(n = 8-10, *p < 0.05 and **p < 0.01) Each significance was analyzed using two-way ANOVA with Tukey's post hoc test.

メチルドパ投与時の BCAS マウス中未酸化 PC および lysoPC の生成評価

続いて、BCAS 術後 3 日およびメチルドパの投与により、基質となる未酸化の PC の組成が変動しているかどうかを測定した。oxPC 測定時に用いた、PUFA 3 種を含有する PC の他、飽和脂肪酸および一価不飽和脂肪酸のいずれかで構成されている PC を選択し、脂肪酸アシル部位をプロダクトイオンとした **negative ion mode** で測定した。また、既報で観察していたその他の脂肪酸を含有する PC のうち、検出可能であった種も測定に加えた⁷⁰。その結果、BCAS 術後 3 日の脳梁では、メチルドパの投与の有無に関わらず未酸化 PC は変化しなかった (**Fig. 18a–c**)。また、生体内で PUFA を含有するリン脂質が酸化されると、一部の酵素により酸化された脂肪酸が加水分解され、リゾリン脂質が生成されることがこれまでに明らかとなっている⁷¹。そこで、BCAS 術後 3 日およびメチルドパの投与により、脳梁においてリゾリン脂質が生成するかどうかについて評価した。しかしながら、いずれのリゾリン脂質も変動しなかった (**Fig. 18d**)。

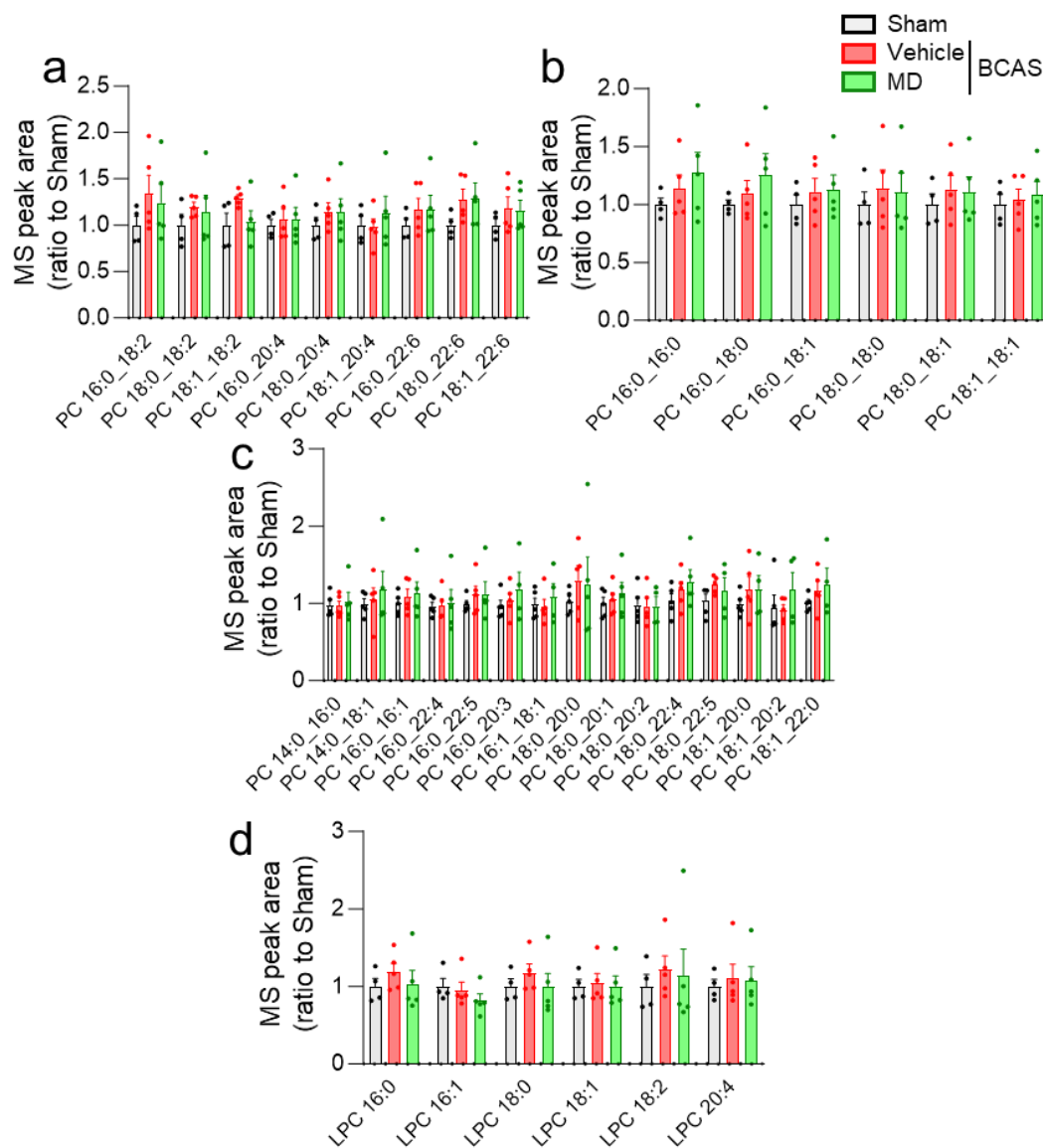


Figure 18. BCAS マウス術後 3 日におけるメチルドパ投与時の未酸化 PC および lysoPC (LPC) の評価。マウスの右脳梁を分取した後、脂質を抽出し、LC/MS/MS にて各酸化リン脂質に相当する分子量を選択し、MRM で測定した。PUFA 含有 PC (a)、主要な飽和脂肪酸および一価不飽和脂肪酸で構成された PC (b)、他脂肪酸含有 PC (c)、LPC (d) に相当する MS ピーク面積を組織重量および内部標準で補正した後、Sham に対する比を求め評価した。(n = 4-5, two-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison tests.)

メチルドパ投与時の BCAS マウス中ホスホリパーゼの発現評価

以上のように、一部の酸化リン脂質のみで BCAS 処置や、メチルドパ投与によっても増加亢進していたことから、慢性脳低灌流の環境下では、酸化リン脂質を特異的に認識して除去する機構が亢進しているのではないかと考えた。そこで、酸化リン脂質を認識して切断し得る酵素としていくつかのホスホリパーゼ (phospholipase; PLA) を評価することとした。ここでは酸化脂質測定と同一の個体で測定を行うために、白質領域のうち脳梁に次いで慢性脳低灌流による障害を受ける線条体領域を用いることとした。線条体サンプルより RNA を抽出し、酸化脂質を認識することが明らかとなっている 5 種 (*Pla2g7*, *Patatin like phospholipase domain containing [Pnpla]8*, *Pla2g6*, *Pla2g15*, *Peroxiredoxin [Prdx]6*)⁷¹、BCAS マウス術後 1 週の脳組織中で発現が亢進する 2 種 (*Pla2g16*, *Pla2g4e*)⁷²、脳虚血再灌流モデルにおいて病態保護に寄与する PLA および発現誘導もしくは抑制され、PC を認識する 3 種 (*Pla2g2e*, *Pla2g4a*, *Pla2g5*) を選択し mRNA 発現量を評価した⁷³。その結果、*Pla2g16* の発現が BCAS 術後 3 日の線条体で上昇し、メチルドパ投与群において上昇が抑制された (**Fig. 19f**)。その他の PLA に有意な変動はなかった (**Fig. 19a-e, g-j**)。

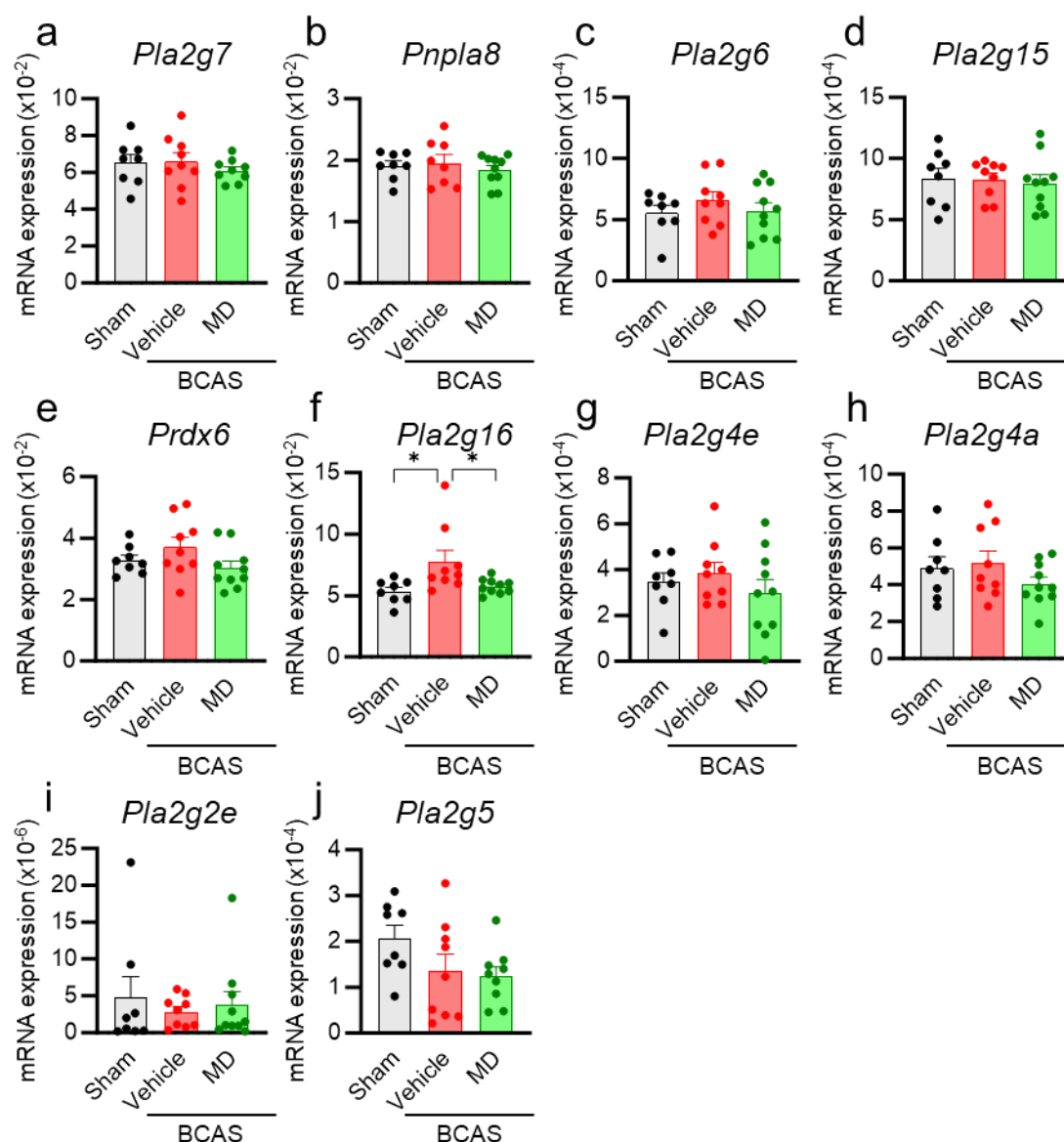


Figure 19. メチルドパ投与時の BCAS マウスにおけるホスホリパーゼの発現評価。BCAS 術後 3 日のマウス右線条体を分取した後、RNA を抽出し、RT-PCR にて各遺伝子の発現量を測定した。各遺伝子の発現量は *Gapdh* に対する相対発現量として算出した。 (n = 8–10, *p < 0.05 by one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test.)

3-4. 考察

著者は本研究で、VaD 病態にどのような酸化脂質が生じているのかを明らかにするために、まずフェロトーシスの関与を調べ、その後 BCAS マウス中で生成する酸化脂質を明らかにすることとした。

慢性脳低灌流時の脳組織は、血液供給の低下により正常な代謝の維持が不可能な状況である。そのような環境下で LPO が亢進する原因として、微小環境での細胞死がその後の慢性的な病態の引き金になっているのではないかと考えた。そこでまず、BCAS 処置を行ったマウスにおける脳中でフェロトーシスに関わる因子の増減が生じているかについて、関連遺伝子および酸化脂質を測定した。その結果、*Gpx4* および *Ptgs2* はまだ炎症反応が亢進していない術後 1 日から、実際にグリア細胞の活性化が起こる術後 1 週までのいずれの時期においても変動しなかった。また、フェロトーシス誘導時に特徴的な酸化リン脂質である PE 18:0_20:4 に由来する酸化 PE を含む PE 38:4;O2 の生成量も有意に増加しなかった。これまでに虚血再灌流モデルや脳出血モデル等の急性期モデルの脳組織に対しては、GPx4 の減少、およびフェロトーシス抑制剤での保護効果が観察されており、フェロトーシスの関与が示唆されている^{62,74}。しかしながら、本結果より、慢性脳低灌流時にはフェロトーシスの顕著な亢進が生じないことが示された。

その一方で、慢性脳低灌流時には、鉄の代謝異常が生じることが考えられている⁷⁵。ラットにおける慢性脳低灌流処置では、鉄の貯蔵に関わるフェリチンおよびトランスフェリン受容体が発現亢進し、病態下での細胞内鉄の増加が示された⁷⁶。また実際に本研究においても、BCAS 術後 1 週のマウスにおいてヘム分解酵素 Heme oxygenase-1 (*Hmox1*) の発現増加が観察され (Fig. 20)、病態マウスにおいて遊離鉄の含有量が増加する可能性がある。鉄は PUFA と反応し LPO を亢進させるため⁷⁷、慢性脳低灌流時には顕著なフ

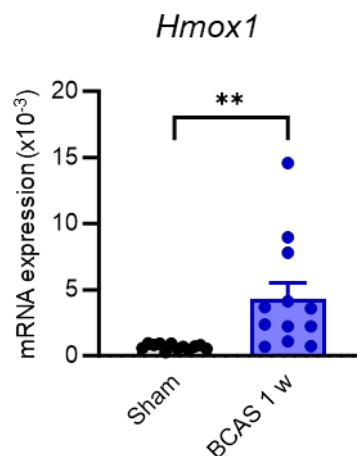


Figure 20. BCAS 術後 1 週のマウス脳梁における *Hmox1* 発現量。*Hmox1* の発現量は *Gapdh* に対する相対発現量として算出した。(n = 12, **p < 0.01 by two-tailed unpaired t-test.)

フェロトーシスは生じない一方で鉄の代謝異常による LPO の亢進が起こっていると考えられる。

またこれまでに、髄鞘形成が可能な成熟オリゴデンドロサイト細胞数が BCAS 処置により継続的に低下し、オリゴデンドロサイト前駆細胞の分化阻害が生じていることが報告されている⁷⁸。オリゴデンドロサイトは脳組織における鉄代謝を制御していることから⁷⁹、本細胞の機能・分化異常が脳組織における鉄代謝異常を誘導していることが考えられる。

その他の経路によっても、慢性脳低灌流による LPO の亢進が示唆されている。BCAS マウスでは、アポトーシスに関与する cleaved caspase-3 の発現が一時的に増加する⁸⁰。アポトーシスによる細胞死ではミトコンドリアから ROS が生成し、膜脂質の酸化を亢進することが考えられる。また、脳血管障害時には、傷害された細胞や活性化したグリア細胞よりグルタミン酸が放出される。グルタミン酸による興奮毒性は神経細胞を過剰に活性させることで、神経細胞内の脂肪酸を酸化させることが明らかになっている⁸¹。このことから、フェロトーシスに由来しない LPO の亢進が病態下で生じることは十分考えられる。

続いて、BCAS マウスにおける LPO の亢進時期を特定するため、LPO の代謝産物である 4-HNE の修飾タンパクを western blotting で測定した。その結果海馬における一部のバンドが術後 1 週間で有意に増加することが分かった (Fig. 14)。

これまでに BCAS マウスで LPO 産物を評価した 2 報の論文は、いずれも脳梁領域での評価であった。一方は TBARS 法にて MDA 量を評価しており、術後 28 日に MDA が増加していた⁴⁴。もう一方は 4-HNE 修飾タンパク質を免疫組織染色で観察しており、7 日、14 日、28 日の測定で経時的に増加するようである⁸²。その他の脳組織においては、これまでの報告はない。本研究では、BCAS マウス脳梁において 4-HNE 修飾タンパク質の増加は観察されなかった。この結果については異なるメーカーの 4-HNE 抗体を使用したことに由来する可能性を考えている。

BCAS マウスの海馬においては、4-HNE 修飾タンパク質の増加が観察された。また修飾タンパク質の発現量は術後 1 週ほどでピークとなり、その後術後 4 週のマウスでは、その増加の程度が低下した。海馬は脳梁と異なり、AA を含有するリン脂質が豊富に含まれる部位であり⁵⁷、さらに 4-HNE は主にリノール酸および AA の酸化によって生成されるアルデヒドである⁸³。そのため、海馬領域において 4-HNE がより生成され、タンパク質修飾が生じたと考えられる。

当初、4-HNE 修飾タンパク質を western blotting にて評価する際、より多くのタンパク質が 4-HNE 修飾を受けると予想した。しかしながら、本研究では特定の分子量のタンパク質のみが変動していた。筋組織を用いた先行研究においても LPO の亢進により、一部のタンパク質に由来する 4-HNE 修飾タンパク質のバンドのみが変動したことが報告されている⁸⁴。本研究ではどのようなタンパク質種が 4-HNE によって修飾されたか

は不明である。本研究で変動が生じたバンドとは異なる分子量であるが、これまでにヒートショックプロテインやプロテインジスルフィドイソメラーゼといったタンパク質が 4-HNE との付加体を形成することが報告されている⁸³。4-HNE はタンパク質中のリジン、ヒスチジン、システイン残基と反応し付加体を形成することから、BCAS マウスではこれらのアミノ酸残基が豊富に含まれるタンパク質選択的に修飾が生じたと想定している。

BCAS 中 4-HNE 修飾タンパク質が 1 週から 4 週にかけて減少したことについては、慢性脳低灌流に対する自律的な保護機構が働き、LPO 産物を消去する機能が亢進したと推察している。実際に BCAS マウスではアストロサイトの Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) 活性化は leukemia inhibitory factor (LIF) の産生を誘導し、オリゴデンドロサイト前駆細胞の分化を促進することで病態保護に働く⁸⁵。TRPA1 は複数の酸化ストレス関連分子によって活性化されるが、4-HNE もその一つである⁸⁶。そのため、術後 1 週までに LPO が亢進し生じた 4-HNE が TRPA1 を介した組織修復経路を活性化させ、それ以降の 4-HNE 生成が抑制されたと考えられる。また虚血再灌流モデルマウスでは、処置後初期は炎症反応の亢進が生じるが、その後数日ほどでミクログリア等での炎症収束因子発現が亢進する^{87,88}。本研究で用いた右総頸動脈に 0.16 mm のコイルを装着するモデルでは、白質のみならず海馬や皮質領域の灰白質梗塞も生じる。このため、0.16 mm 装着時には強い狭窄に応答し細胞が傷害を受けた後、虚血再灌流時と同様に修復応答が生じている可能性がある (Fig. 21)。

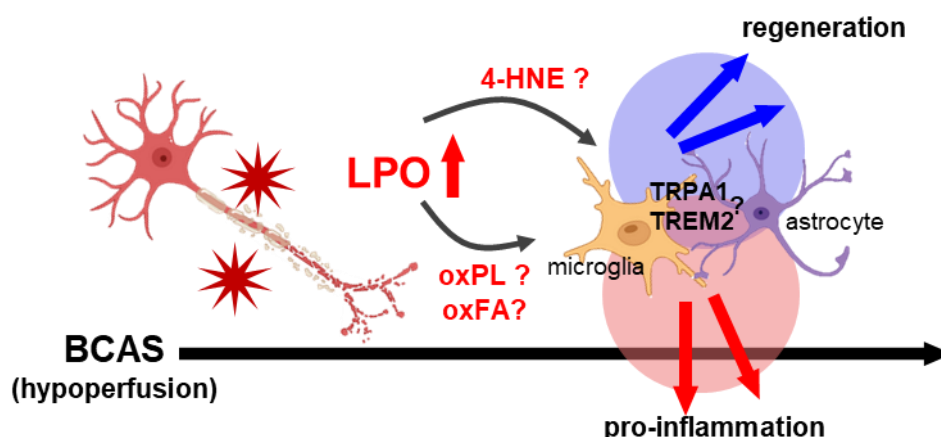


Figure 21. 慢性脳低灌流時において推定される LPO 亢進システム。低灌流により傷害を受けた細胞膜において LPO が亢進し、1 週においてピークとなる。生じた酸化脂質がミクログリアやアストロサイトを活性化させるが、炎症反応の亢進とともに修復因子の産生や貪食能の亢進が起こること、LPO 亢進が徐々に弱まっていったことが想定される。

LPO 代謝物の評価に続いて、BCAS 術後 1 週までに生じる酸化リン脂質の生成量変動について評価した。第二章では、BCAS 術後 1 週のマウスにおけるミクログリアやアス

トロサイトの活性化をエトキシキンおよびメチルドパが抑制可能であることを示した。この結果より、慢性脳低灌流において LPO の亢進で生じる酸化脂質が DAMPs としてグリア細胞を活性化させ、炎症反応を亢進させているのではないかと考えた。加えて、BCAS 処置直後は脳血流量が最も低下しており、低灌流の程度が強い (Fig. 8)。そのため、マイクロコイル装着後の最初期に病態進行を引き起こす酸化脂質生成が生じやすい可能性も考慮した。そこで、術後 6 時間から 1 週間の BCAS マウス脳組織における酸化リン脂質変動を経時的に測定した。

BCAS 処置を行ったマウスの脳梁および海馬中における酸化リン脂質を測定した結果、海馬ではいずれの酸化リン脂質の増加も観察されなかった。また、脳梁において BCAS 処置 3 日以降で一部の oxPC が増加した (Fig. 15)。

海馬には PUFA 含有リン脂質が豊富に存在し、また 4-HNE 修飾タンパク質の増加が観察されているにも関わらず、長鎖および断片化 oxPC は増加しなかった。その要因として、LPO の亢進によって酸化リン脂質のような中間生成物はより酸化され、結果として 4-HNE をはじめとしたアルデヒド体などの最終産物が増加したことが想定される。炭素鎖中に複数の二重結合を有する PUFA は ROS と反応すると二重結合に挟まれた活性メチレン部位より水素が引き抜かれることで LPO が開始するが、その後の連鎖的な LPO によって脂肪酸鎖が切断される場合がある⁸⁹。LPO による脂肪酸鎖切断を含めた脂質酸化により、二重結合を多く含むほど多様な構造を有する生成物が生じる (Fig. 22)。そのため、中間生成物が生じた後に周囲の PUFA と連鎖的に反応し、リン脂質の酸化体として検出されなかったことが考えられる。また酸化リン脂質の増加が観察されなかった他の可能性としては、リン脂質の酵素的な分解を挙げる。抗炎症性のメディエーターとして作用する Epoxyeicosatrienoic acids (EETs) は AA がチトクローム P450 により酸化

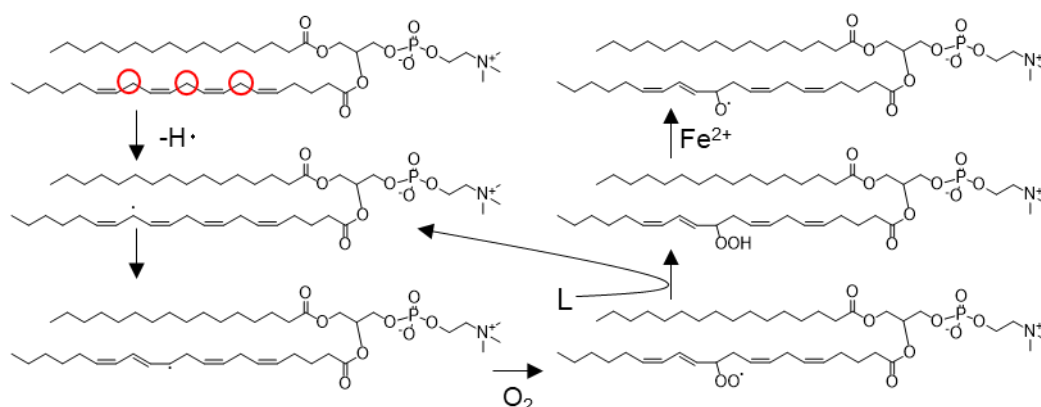


Figure 22. PUFA 含有リン脂質の酸化メカニズム。例として PC 16:0_20:4 の構造を示した。赤丸で囲まれた活性メチレン部位から水素が引き抜かれることにより、脂質ラジカルが精製し、酸素と反応することでペルオキシラジカル (LOO·)、脂質ペルオキシドが生成する。また脂質ペルオキシドと鉄が反応することでアルコキシルラジカル (LO·) が生成する。PUFA では活性メチレン部位の数、さらに酸化の程度により多様な構造を有する酸化脂質が生じる。

されることにより産生されるが、soluble epoxide hydrolase (sEH)はこれを加水分解し、活性の弱いジオール体へと変換する。実際、BCAS マウスに sEH 阻害薬を投与すると、白質病変を抑制したことが報告されており⁹⁰、BCAS 処置時には酵素的な酸化脂質の産生や分解が亢進している可能性が考えられる。

上記の考察は脳梁領域においても当てはまる一方で、一部の PC 二酸化物のみ有意な増加が観察された。上昇した脂質は PC 36:3;O2 であった。二酸化物は脂質ラジカルに酸素が反応することで生成する酸化脂質である (Fig. 22)。また、いくつかの二酸化物は lipoxigenase (LOX)により酵素的に生成される。本研究の結果では一部の酸化物の上昇のみ観察されたことから、この酸化物の生成は非酵素的な酸化に由来するものではなく、LOX 等の酵素的な酸化により増加しているのではないかと考えている。

メチルドパを投与した BCAS マウスでは、当初 LPO を抑制し oxPC の生成量が減少するのではないかと考えた。しかしながら、術後 3 日の脳組織中において、oxPC は減少せず、かえって、PC 36:3;O2 をはじめとしたいくつかの oxPC がさらに増加していた (Fig. 16)。

そこでまず、メチルドパの LPO 抑制能について考察する。所属研究室で行われたリポソーム膜酸化に対する抑制能評価では、メチルドパは鉄、AAPH いずれの刺激に対しても保護効果を示した (Fig. 5)。鉄刺激ではアルコキシラジカルが、また AAPH 刺激ではペルオキシラジカルが生成する⁹¹。そのため、メチルドパはこれら脂質ラジカルの生成を抑制することで、LPO の亢進を抑えることが出来ると想定される。

また、第二章の結果よりメチルドパの投与は BCAS マウスの基本病態を抑制するにも関わらず、いくつかの二酸化リン脂質の増加をもたらした。このことから、増加した二酸化リン脂質はこのままの状態であれば活性が弱いが、構造が変化し、例えば遊離脂肪酸の状態となった場合に病態に寄与するのではないかと考えた。

未酸化リン脂質である PC36:3 について脂肪酸鎖の構成を MS/MS により測定したところ、主に PC 18:1_18:2 あるいは PC 16:0_20:3 であることが分かった (Fig. 23)。同一の *m/z* を有する PC としては PC 18:0_18:3 も想定されたが、本検討では検出限度以下であった。そのため、PC36:3;O2 については LA あるいはジホモガンマリノレン酸 (dihomo- γ -linolenic acid; DGLA)が酸化された構造であることが考えられる。しかしながら、上記 2 種のリン脂質が酸化された際に生理活性を有するかについては文献情報がない。一方で、上記 2 種の遊離脂肪酸の代謝物については、脳血管障害時等における生理活性が明らかにされている。例えば、LA 由来のメディエーターは虚血時に神経活動を制御することが示唆されている⁹²。脳虚血再灌流マウスでは、DGLA 由来の脂質メディエーターである 15-hydroxy eicosatrienoic acid (15-HETre)が梗塞周辺部位で生成され、梗塞巣の修復に寄与している⁷³。一方でアテローム性動脈硬化症では LA 由来の 9-hydroxyoctadecadienoic acid (HODE)および 13-HODE がそれぞれ炎症促進あるいは抗炎症効果をもたらすことが明らかとなっている⁹³。

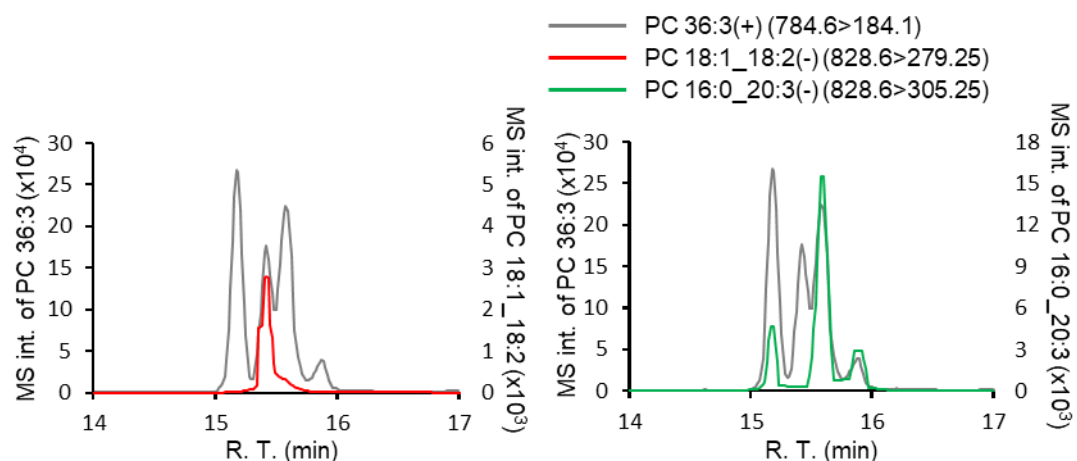


Figure 21. マウス脳梁における PC 36:3 で表されるリン脂質の解析。脳梁部位の脂質抽出液を 200 倍希釈し、LC/MS/MS にて各酸化リン脂質に相当する分子量を選択し、positive ion mode および negative ion mode にて MRM で測定した。

生成された酸化リン脂質が病態の進展に伴い切断され、脂肪酸代謝物として機能する可能性を考え、BCAS マウスにおけるホスホリパーゼの発現を測定した。その結果、BCAS 術後 3 日の線条体部位において *Pla2g16* の mRNA 発現量が増加した (**Fig. 19f**)。PLA2G16 は AdPLA との呼称もあり、脂肪組織におけるホスホリパーゼとして発見、同定された⁹⁴。リン脂質の *sn*-1 位および *sn*-2 位を切断する PLA_{1/2} 活性を有しており、他の極性頭部と比較し PC あるいは PE に選択性を有する一方で、脂肪酸鎖への選択性は報告されていない^{94,95}。また別の報告では、PLA2G16 のアシルトランスフェラーゼ活性も報告されている⁹⁶。脳は脂肪組織に次いで PLA2G16 の RNA 発現量が多く、特に白質領域に豊富である⁹⁷。本結果より、BCAS 処置を行い増加した酸化リン脂質が、PLA2G16 によって加水分解されたのではないかと考えられる。また、PLA2G16 の有するアシルトランスフェラーゼ活性により、生成したリゾリン脂質には異なる脂肪酸が結合し、加水分解で遊離した酸化脂肪酸が何らかの生理機能を有していることを想定している。

以上より、本研究では BCAS マウスにおいて炎症反応の亢進に先立って LPO が亢進し、一部の酸化リン脂質は白質病変が生じる脳梁領域で観察された。また、メチルドパ投与群における酸化リン脂質の増加とホスホリパーゼ発現の抑制より、遊離脂肪酸の生成をメチルドパが抑制した可能性がある。以下に今後の展望について記載する。

本研究では海馬を 1 匹由来、脳梁は 2 匹由来を 1 サンプルとして MS/MS 測定を行った。しかしながら、今回検出できたのは酸化リン脂質の極性頭部由来のフラグメントのみであり、検出感度が低い脂肪酸鎖由来のフラグメントは検出できていない。そのため、脳組織の脂質をより濃縮するなどして、酸化リン脂質脂肪酸部位を検出することが必要である。生じた酸化脂質の構造が明らかに出来れば、初代培養細胞に添加した際の細胞

応答を評価することや、また酸化脂質によって活性化される受容体の特定にもつながると期待出来る。これまでの報告では、TREM2、TLR4、CD36などの受容体が酸化脂質に応答するとされている⁹⁸。この他にも、TRPチャネルはLPO産物をリガンドとして活性化することも明らかになっている⁹⁶。そこでこれら受容体を候補として、病態下における酸化脂質の生理活性機序の解明を目指す。

またBCASマウスは慢性的な病態モデルである。そのため、酸化脂質は本研究で測定した1週以降も生成されていることが想定される。よりBCAS処置後長期のマウス脳組織において酸化リン脂質を測定することで、実際に生体内で酸化脂質を除去する作用が亢進しているのか、異なる酸化脂質生成が亢進しているかについて明らかに出来ると考える。

今後、実際に生じた酸化脂質の構造解析、および生じた酸化脂質の生理活性を明らかにすることが出来れば、LPOを起点としたVaDの発症メカニズムの解明の達成が期待される。本機構の解明は、VaDのみならずこれまでにLPOや酸化ストレスが関与すると報告されてきた疾患に対しても新たなメカニズムや治療標的の探索のための重要な情報を提供可能であると考ええる。

3-5. 小括

本章では、第二章に引き続き VaD モデルである BCAS マウスを用い、病態中で生成する酸化脂質生成機構について明らかにすることとした。

まず、酸化脂質依存的な細胞死であるフェロトーシスが関与しているかどうか明らかにするために関連因子の測定を行ったが、BCAS マウス中でのフェロトーシスマーカーの有意な変動は生じなかった。

続いて、BCAS マウスにおける LPO 亢進時期を明らかにするために、LPO 産物である 4-HNE 修飾タンパク質の発現を評価したところ、グリア細胞の活性化が起こる時期である術後 1 週で最も増加することが明らかとなった。そこで、BCAS マウス術後 1 週までに生成する酸化脂質の網羅的な解析を LC/MS/MS により実施した。

BCAS 術後 1 週までのマウス脳梁および海馬の oxPC 測定の結果、脳梁において術後 3 日で特定の酸化脂質が増加した。第二章で BCAS マウスにおける病態保護能を示したメチルドパを再び適用し oxPC を測定した結果、PC 36:3;O2 のさらなる増加が観察された。一方で、ホスホリパーゼの発現量を評価した結果、PLA2G16 が BCAS 術後 3 日で増加し、メチルドパの投与によって抑制された。

以上の結果より、慢性脳低灌流時には単に LPO が亢進し酸化リン脂質が増加するのみならず、低灌流に応答したリン脂質の加水分解が生じていることが示された。またメチルドパは、酸化リン脂質から脂肪酸の遊離を抑制することによって病態保護効果をもたらすことが示唆された。今後、病態モデルでの LPO 亢進と共に、それに伴った酸化脂質除去機構、病態下での修復機構にも着目することで、VaD のさらなる機序解明につながると考えた。

第四章

総括

血管性認知症 (VaD)は脳血管障害により引き起こされる認知症状であり、現在までに有効な治療薬がなく、治療ターゲットの探索が喫緊の課題であった。その一方、脳組織は酸化を受けやすい多価不飽和脂肪酸が豊富に含まれていること、酸素消費量が多い組織であることから、脂質過酸化反応 (LPO)が亢進しやすい環境である。また実際に VaD 患者では LPO 産物の有意な増加が観察されている。加えて、LPO により生成される酸化脂質は神経細胞やオリゴデンドロサイトの細胞死を誘発すること、ミクログリアやアストロサイトを活性化し炎症反応を亢進させることも報告されている。以上の報告から、LPO および生成された酸化脂質が原因となり VaD 病態を進展させ、認知機能障害をもたらしているのではないかと考えた。そこで、所属研究室で見出した高い LPO 抑制能を有する化合物を VaD モデルマウスに適用し、酸化脂質の関与について調べることにした。

第二章では、LPO 抑制剤の VaD モデルマウスに対する基本病態の保護作用について評価した。ここでは VaD のサブタイプとして最も多い皮質下血管認知症を再現し、慢性的な脳低灌流状態となる両側総頸動脈狭窄モデル (BCAS)マウスを用いた。また、LPO 抑制剤には所属研究室でスクリーニングにより見出された化合物であるエトキシキンおよびメチルドパを用いた。BCAS マウスにエトキシキンあるいはメチルドパを投与したところ、各化合物は術後 4 週に生じる白質病変を抑制した。また、BCAS マウス術後 4 週に生じる作業記憶障害を各化合物が有意に抑制した。さらに、作業記憶障害や白質病変に先立って生じるミクログリアおよびアストロサイトの活性化も、各化合物の投与により抑制された。このことから、LPO の抑制が VaD における基本病態を抑制可能であることが示された。本結果は、VaD 治療に対する LPO 抑制の有用性を示すものである。

第三章では、VaD 病態における LPO がいつ生成するか、またどのような酸化脂質が生成するかについて評価した。ここでは引き続き慢性脳低灌流モデルである BCAS マウスを用いて、発生時期および酸化脂質生成部位の検討を行った。その結果、BCAS マウスでは酸化脂質依存的な細胞死であるフェルトーシスの関連因子は変動しなかった。その一方で、術後 1 週までに LPO が亢進しており、また BCAS 術後 3 日には、一部の PC の二酸化物で増加が観察された。そこで第二章で用いた LPO 抑制剤のうちメチルドパを用い、増加した酸化脂質の生成を抑制可能かどうか検討した。その結果、BCAS 術後 3 日で増加した oxPC は、メチルドパの投与によりさらに増加していた。慢性的な脳低灌流時には、継続的に酸化脂質が生じており、それと同時に酸化脂質を還元もしくは加水分解することで切断する機構が働いているのではないかと考え、BCAS マウスモデル初期の脂質代謝酵素の遺伝子発現を検討した。その結果、ホスホリパーゼの術後 3 日での増加が観察された一方で、その増加はメチルドパの投与により抑制された。このことから、メチルドパは酸化リン脂質から切り出されて生成する脂質メディエーターの産生を抑制し、病態進行を抑制することが示唆された。

本研究では、VaD における LPO の関与を、抑制剤を用いて明らかにし、実際に生じる酸化脂質の解析を行った。生じた酸化脂質が本病態の原因分子となるか、またどのような生理活性を有するかは未だ不明である。しかしながら、今後生じた酸化脂質を分取もしくは合成し、神経細胞、オリゴデンドロサイト、ミクログリアもしくはアストロサイトといった脳実質細胞へ添加した際の応答を評価することで、細胞毒性や炎症反応への寄与を明らかにすることが可能であると考ええる。さらにそうした評価は、酸化脂質が VaD 病態を促進するメカニズムや、その下流のターゲット分子の解明にもつながることが期待される。

参考文献

1. Iadecola, C. The Pathobiology of Vascular Dementia. *Neuron* **80**, 844–866 (2013).
2. Tanimukai, S. *et al.* Prevalence and Causes of Early-Onset Dementia in Japan A Population-Based Study. *Stroke* **40**, 2709–2714 (2009).
3. Román, G. C. *et al.* Vascular dementia: Diagnostic criteria for research studies - Report of the NINDS-AIREN international workshop. *Neurology* **43**, 250–260 (1993).
4. Kalaria, R. N. Neuropathological diagnosis of vascular cognitive impairment and vascular dementia with implications for Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* **131**, 659–685 (2016).
5. Mizuta, I. & Mizuno, T. Vascular Dementia and Cerebral Small Vessel Disease. *J Kyoto Pref Univ Med* **125**, 805–812 (2016).
6. Dawson, J. *et al.* European Stroke Organisation (ESO) guideline on pharmacological interventions for long-term secondary prevention after ischaemic stroke or transient ischaemic attack. *Eur Stroke J* **7**, I–II (2022).
7. Leys, D. *et al.* Poststroke dementia. *Lancet Neurol* **4**, 752–759 (2005).
8. Blanco-Rojas, L. *et al.* Cognitive profile in patients with a first-ever lacunar infarct with and without silent lacunes: A comparative study. *BMC Neurol* **13**, 203 (2013).
9. 日本神経学会. 認知症疾患ガイドライン 第14章 血管性認知症. (2017).
10. Kavirajan, H. & Schneider, L. S. Efficacy and adverse effects of cholinesterase inhibitors and memantine in vascular dementia: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Lancet Neurology* **6**, 782–792 (2007).
11. Battle, C. *et al.* Cholinesterase inhibitors for vascular dementia and other vascular cognitive impairments: a network meta-analysis. *Cochrane Database Syst Rev* **2**, CD013306 (2021).
12. 医薬産業政策研究所. アンメット・メディカル・ニーズに対する医薬品の開発・承認状況 -2022年の動向-.
13. Raichle, M. E. & Gusnard, D. A. Appraising the brain's energy budget. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 10237–10239 (2002).
14. Choi, D. H. *et al.* NADPH oxidase 1, a novel molecular source of ROS in hippocampal neuronal death in vascular dementia. *Antioxid Redox Signal* **21**, 533–550 (2014).
15. Yadav, A. *et al.* Resveratrol loaded solid lipid nanoparticles attenuate mitochondrial oxidative stress in vascular dementia by activating Nrf2/HO-1 pathway. *Neurochem Int* **112**, 239–254 (2018).
16. Dong, Y. F. *et al.* Attenuation of brain damage and cognitive impairment by direct renin inhibition in mice with chronic cerebral hypoperfusion. *Hypertension* **58**, 635–642 (2011).
17. Jiao, L. *et al.* Edaravone alleviates delayed neuronal death and long-dated cognitive dysfunction of hippocampus after transient focal ischemia in Wistar rat brains. *Neuroscience*

- 182**, 177–183 (2011).
18. O'Brien, J. S. & Sampson, E. L. Lipid composition of the normal human brain: gray matter, white matter, and myelin. *J Lipid Res* **6**, 537–544 (1965).
 19. O'Brien, J. S. & Sampson, E. L. Fatty acid and fatty aldehyde composition of the major brain lipids in normal human gray matter, white matter, and myelin. *J Lipid Res* **6**, 545–551 (1965).
 20. Svennerholm, L. Distribution and fatty acid composition of phosphoglycerides in normal human brain. *J Lipid Res* **9**, 570–579 (1968).
 21. Adibhatla, R. M. & Hatcher, J. F. Lipid oxidation and peroxidation in CNS Health and disease: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* **12**, 125–169 (2010).
 22. Gustaw-Rothenberg, K. *et al.* Lipids' peroxidation markers in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Geriatr Gerontol Int* **10**, 161–166 (2010).
 23. Reed, T. *et al.* Redox proteomic identification of 4-Hydroxy-2-nonenal-modified brain proteins in amnesic mild cognitive impairment: Insight into the role of lipid peroxidation in the progression and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* **30**, 107–120 (2008).
 24. Dong, Y. *et al.* Oxidized phosphatidylcholines found in multiple sclerosis lesions mediate neurodegeneration and are neutralized by microglia. *Nat Neurosci* **24**, 489–503 (2021).
 25. Kagan, V. E. *et al.* Oxidized arachidonic and adrenic PEs navigate cells to ferroptosis. *Nat Chem Biol* **13**, 81–90 (2017).
 26. Wang, G. *et al.* Neuronal accumulation of peroxidated lipids promotes demyelination and neurodegeneration through the activation of the microglial NLRP3 inflammasome. *Nat Aging* **1**, 1024–1037 (2021).
 27. Imai, Y. *et al.* Identification of Oxidative Stress and Toll-like Receptor 4 Signaling as a Key Pathway of Acute Lung Injury. *Cell* **133**, 235–249 (2008).
 28. Di Gioia, M. *et al.* Endogenous oxidized phospholipids reprogram cellular metabolism and boost hyperinflammation. *Nat Immunol* **21**, 42–53 (2020).
 29. Chui, H. C. Subcortical Ischemic Vascular Dementia. *Neurol Clin* **25**, 717–740 (2007).
 30. Du, S. Q. *et al.* Molecular Mechanisms of Vascular Dementia: What Can Be Learned from Animal Models of Chronic Cerebral Hypoperfusion? *Mol Neurobiol* **54**, 3670–3682 (2017).
 31. Shibata, M. *et al.* White matter lesions and glial activation in a novel mouse model of chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke* **35**, 2598–2603 (2004).
 32. Hattori, Y. *et al.* Silent information regulator 2 homolog 1 counters cerebral hypoperfusion injury by deacetylating endothelial nitric oxide synthase. *Stroke* **45**, 3403–3411 (2014).
 33. Miyamoto, N. *et al.* A radical scavenger edaravone inhibits matrix metalloproteinase-9 upregulation and blood-brain barrier breakdown in a mouse model of prolonged cerebral hypoperfusion. *Neurosci Lett* **573**, 40–45 (2014).

34. Shibata, M. *et al.* Selective impairment of working memory in a mouse model of chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke* **38**, 2826–2832 (2007).
35. Jokinen, H. *et al.* Cognitive profile of subcortical ischaemic vascular disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **77**, 28–33 (2006).
36. Zhou, Z. *et al.* Deeper cerebral hypoperfusion leads to spatial cognitive impairment in mice. *Stroke Vasc Neurol* svn-2022-001594 (2022).
37. Yamada, K. I. *et al.* Fluorescence probes to detect lipid-derived radicals. *Nat Chem Biol* **12**, 608–613 (2016).
38. Błaszczuk, A. *et al.* Ethoxyquin: An antioxidant used in animal feed. *Int J Food Sci* **2013**, 585931 (2013).
39. Lockhart, B. *et al.* Protective effect of the antioxidant 6-ethoxy-2,2-pentamethylen-1,2-dihydroquinoline (S 33113) in models of cerebral neurodegeneration. *Eur J Pharmacol* **416**, 59–68 (2001).
40. Kryl'skii, E. D. *et al.* Neuroprotective effect of 6-hydroxy-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydroquinoline mediated via regulation of antioxidant system and inhibition of inflammation and apoptosis in a rat model of cerebral ischemia/reperfusion. *Biochimie* **186**, 130–146 (2021).
41. Zhu, J. *et al.* Ethoxyquin provides neuroprotection against cisplatin-induced neurotoxicity. *Sci Rep* **6**, 28861 (2016).
42. Liu, Y. *et al.* Ethoxyquin is neuroprotective and partially prevents somatic and autonomic neuropathy in db/db mouse model of type 2 diabetes. *Sci Rep* **11**, 10749 (2021).
43. Whelton, P. K. *et al.* 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA guideline for the prevention, detection, evaluation, and management of high blood pressure in adults: Executive summary: A report of the American college of cardiology/American Heart Association task. *Hypertension* vol. 72 (2018).
44. Dong, F. *et al.* Ebselen alleviates white matter lesions and improves cognitive deficits by attenuating oxidative stress via Keap1 / Nrf2 pathway in chronic cerebral hypoperfusion mice. *Behav Brain Res* **448**, 114444 (2023).
45. Wakita, H. *et al.* Glial activation and white matter changes in the rat brain induced by chronic cerebral hypoperfusion: an immunohistochemical study. *Acta Neuropathol* **87**, 484–492 (1994).
46. Allen Institute for Brain Science (2004). Allen Mouse Brain Atlas [dataset]. Available from mouse.brain-map.org. Allen Institute for Brain Science (2011). Allen Reference Atlas – Mouse Brain [brain atlas]. Available from atlas.brain-map.org.
47. Leger, M. *et al.* Object recognition test in mice. *Nat Protoc* **8**, 2531–2537 (2013).
48. Miyanohara, J. *et al.* TRPM2 Channel Aggravates CNS Inflammation and Cognitive Impairment via Activation of Microglia in Chronic Cerebral Hypoperfusion. *J Neurosci* **38**, 3520–3533 (2018).

49. Dong, Y. & Yong, V. W. Oxidized phospholipids as novel mediators of neurodegeneration. *Trends Neurosci* **45**, 419–429 (2022).
50. Dixon, S. J. *et al.* Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* **149**, 1060–1072 (2012).
51. Duelli, R. *et al.* Expression of large amino acid transporter LAT1 in rat brain endothelium. *J Cereb Blood Flow Metab* **20**, 1557–1562 (2000).
52. Kim, H. L. Accumulation of ethoxyquin in the tissue. *J Toxicol Environ Health* **33**, 229–236 (1991).
53. Opezzo, J. A. W. *et al.* Pharmacokinetic profile of methyldopa in the brain of sinoarctic-denervated rats. *Pharmacol Res* **48**, 61–67 (2003).
54. Tadokoro, T. *et al.* Ethoxyquin is a Competent Radical-Trapping Antioxidant for Preventing Ferroptosis in Doxorubicin Cardiotoxicity. *J Cardiovasc Pharmacol* **80**, 690–699 (2022).
55. Saggu, R. *et al.* Astroglial NF- κ B contributes to white matter damage and cognitive impairment in a mouse model of vascular dementia. *Acta Neuropathol Commun* **4**, 76 (2016).
56. Iben, L. *et al.* White matter astrocytes in health and disease. *Neuroscience* **100**, 130–134 (2012).
57. Sugiura, Y. *et al.* Visualization of the cell-selective distribution of PUFA-containing phosphatidylcholines in mouse brain by imaging mass spectrometry. *J Lipid Res* **50**, 1776–1788 (2009).
58. Butts, B. D. *et al.* Maturation-dependent sensitivity of oligodendrocyte lineage cells to apoptosis: Implications for normal development and disease. *Cell Death Differ* **15**, 1178–1186 (2008).
59. Stockwell, B. R. *et al.* Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease. *Cell* **171**, 273–285 (2017).
60. Beppu, K. *et al.* Optogenetic countering of glial acidosis suppresses glial glutamate release and ischemic brain damage. *Neuron* **81**, 314–320 (2014).
61. Justin, A. *et al.* Cerebral ischemia induced inflammatory response and altered glutaminergic function mediated through brain AT1 and not AT2 receptor. *Biomed Pharmacother* **102**, 947–958 (2018).
62. Tuo, Q. Z. *et al.* Tau-mediated iron export prevents ferroptotic damage after ischemic stroke. *Mol Psychiatry* **22**, 1520–1530 (2017).
63. Hambright, W. S. *et al.* Ablation of ferroptosis regulator glutathione peroxidase 4 in forebrain neurons promotes cognitive impairment and neurodegeneration. *Redox Biol* **12**, 8–17 (2017).
64. Ji, J. *et al.* Lipidomics identifies cardiolipin oxidation as a mitochondrial target for redox therapy of brain injury. *Nat Neurosci* **15**, 1407–1413 (2012).
65. Anthonymuthu, T. S. *et al.* Global assessment of oxidized free fatty acids in brain reveals an enzymatic predominance to oxidative signaling after trauma. *Biochim Biophys Acta Mol Basis*

- Dis* **1863**, 2601–2613 (2017).
66. Yeang, C. *et al.* Reduction of myocardial ischaemia-reperfusion injury by inactivating oxidized phospholipids. *Cardiovasc Res* **115**, 179–189 (2019).
 67. Solati, Z. *et al.* Oxidized phosphatidylcholines are produced in renal ischemia reperfusion injury. *PLoS One* **13**, e0195172 (2018).
 68. Matsuoka, Y. *et al.* Structural library and visualization of endogenously oxidized phosphatidylcholines using mass spectrometry-based techniques. *Nat Commun* **12**, 1–12 (2021).
 69. Yang, W. S. *et al.* Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell* **156**, 317–331 (2014).
 70. Wallis, T. P. *et al.* Saturated free fatty acids and association with memory formation. *Nat Commun* **12**, 3443 (2021).
 71. Petan, T. & Manček-Keber, M. Half is enough: Oxidized lysophospholipids as novel bioactive molecules. *Free Radic Biol Med* **188**, 351–362 (2022).
 72. Baik, S. H. *et al.* Hippocampal transcriptome profiling reveals common disease pathways in chronic hypoperfusion and aging. *Aging* **13**, 14651–14674 (2021).
 73. Nakamura, A. *et al.* PLA2G2E-mediated lipid metabolism triggers brain-autonomous neural repair after ischemic stroke. *Neuron* **111**, 2995-3010.e9 (2023).
 74. Liu, X. *et al.* Ferrostatin-1 alleviates cerebral ischemia/reperfusion injury through activation of the AKT/GSK3 β signaling pathway. *Brain Res Bull* **193**, 146–157 (2023).
 75. Fu, P. *et al.* Effect of ferroptosis on chronic cerebral hypoperfusion in vascular dementia. *Exp Neurol* **370**, 114538 (2023).
 76. Li, Y. *et al.* Disrupted iron metabolism and ensuing oxidative stress may mediate cognitive dysfunction induced by chronic cerebral hypoperfusion. *Biol Trace Elem Res* **150**, 242–248 (2012).
 77. Feng, H. & Stockwell, B. R. Unsolved mysteries: How does lipid peroxidation cause ferroptosis? *PLoS Biol* **16**, 1–15 (2018).
 78. Magami, S. *et al.* The Effects of Astrocyte and Oligodendrocyte Lineage Cell Interaction on White Matter Injury under Chronic Cerebral Hypoperfusion. *Neuroscience* **406**, 167–175 (2019).
 79. Mukherjee, C. *et al.* Oligodendrocytes Provide Antioxidant Defense Function for Neurons by Secreting Ferritin Heavy Chain. *Cell Metab* **32**, 259-272.e10 (2020).
 80. Poh, L. *et al.* AIM2 inflammasome mediates hallmark neuropathological alterations and cognitive impairment in a mouse model of vascular dementia. *Mol Psychiatry* **26**, 4544–4560 (2020).
 81. Ioannou, M. S. *et al.* Neuron-Astrocyte Metabolic Coupling Protects against Activity-Induced

- Fatty Acid Toxicity. *Cell* **177**, 1522-1535.e14 (2019).
82. Inaba, T. *et al.* Protective Role of Levetiracetam Against Cognitive Impairment And Brain White Matter Damage in Mouse prolonged Cerebral Hypoperfusion. *Neuroscience* **414**, 255–264 (2019).
 83. Guéraud, F. *et al.* Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radic Res* **44**, 1098–1124 (2010).
 84. Eshima, H. *et al.* Lipid hydroperoxides promote sarcopenia through carbonyl stress. *eLife* **12**, e85289 (2023).
 85. Kakae, M. *et al.* The astrocytic TRPA1 channel mediates an intrinsic protective response to vascular cognitive impairment via LIF production. *Sci Adv* **9**, eadh0102 (2023).
 86. Andersson, D. A. *et al.* Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. *J Neurosci* **28**, 2485–2494 (2008).
 87. Maehara, N. *et al.* AIM/CD5L attenuates DAMPs in the injured brain and thereby ameliorates ischemic stroke. *Cell Rep* **36**, 109693 (2021).
 88. Shichita, T. *et al.* MAFB prevents excess inflammation after ischemic stroke by accelerating clearance of damage signals through MSR1. *Nat Med* **23**, 723–732 (2017).
 89. Reis, A. & Spickett, C. M. Chemistry of phospholipid oxidation. *Biochim Biophys Acta Biomembr* **1818**, 2374–2387 (2012).
 90. Chen, Y. *et al.* Soluble epoxide hydrolase inhibition Promotes White Matter Integrity and Long-Term Functional Recovery after chronic hypoperfusion in mice. *Sci Rep* **7**, 7758 (2017).
 91. Saito, K. *et al.* Reaction targets of antioxidants in azo-initiator or lipid hydroperoxide induced lipid peroxidation. *Free Radic Res* **54**, 301–310 (2020).
 92. Hennebelle, M. *et al.* Linoleic acid participates in the response to ischemic brain injury through oxidized metabolites that regulate neurotransmission. *Sci Rep* **7**, 4342 (2017).
 93. Vangaveti, V. *et al.* Review: Hydroxyoctadecadienoic acids: Novel regulators of macrophage differentiation and atherogenesis. *Ther Adv Endocrinol Metab* **1**, 51–60 (2010).
 94. Duncan, R. E. *et al.* Identification and functional characterization of adipose-specific phospholipase A2 (AdPLA). *J Biol Chem* **283**, 25428–25436 (2008).
 95. Uyama, T. *et al.* The tumor suppressor gene H-Rev107 functions as a novel Ca²⁺-independent cytosolic phospholipase A_{1/2} of the thiol hydrolase type. *J Lipid Res* **50**, 685-693 (2009)
 96. Golczak, M. *et al.* Structural basis for the acyltransferase activity of lecithin:retinol acyltransferase-like proteins. *J Biol Chem* **287**, 23790–23807 (2012).
 97. The human protein atlas-PLAAT3. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000176485-PLAAT3>.
 98. Binder, C. J. *et al.* Innate sensing of oxidation-specific epitopes in health and disease. *Nat Rev Immunol* **16**, 485–497 (2016).

発表論文

1. **Abe M**, Sou M, Matsuoka Y, Morimoto K, Yamada KI. Ethoxyquin, a lipid peroxidation inhibitor, has protective effects against white matter lesions in a mouse model of chronic cerebral hypoperfusion. *Biol. Pharm. Bull.* (in press)

参考論文

2. Saito K, Matsuoka Y, **Abe M**, Kato N, Morimoto, K, Yamada KI. Triglyceride peroxidation progresses in lipid droplets of hepatocytes in nonalcoholic steatohepatitis. *Redox Exp. Med.* 1, e220024, 2023
3. Mori R*, **Abe M***, Saimoto Y*, Shinto S, Jodai S, Tomomatsu M, Tazoe K, Ishida M, Enoki M, Kato N, Yamashita T, Itabashi Y, Nakanishi I, Ohkubo K, Kaidzu S, Tanito M, Matsuoka Y, Morimoto K, Yamada KI. Construction of screening system for lipid-derived radical inhibitors and validation of hit compounds to target retinal and cerebrovascular diseases. (submitted) *equally contributed

謝辞

本研究を行うにあたり、終始懇篤な御指導、御鞭撻を賜りました九州大学大学院薬学研究院分子病態解析学分野 山田 健一 主幹教授に、謹んで感謝の意を表します。

本論文作成にあたり、御校閲と御指導を賜りました九州大学大学院薬学研究院創薬育薬産学官連携分野 濱瀬 健司 教授、薬物動態学分野 松永 直哉 教授、細胞生物薬学分野 石井 祐次 准教授、創薬構造解析学分野 山下 智大 講師に、深く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、終始適切な御指導と御助言を賜りました九州大学大学院薬学研究院分子病態解析学分野 森本 和志 助教、Jutanom Mirinthorn 助教に、心より御礼申し上げます。

本研究を進めていくうえで技術的な御支援、有益な御助言を賜りました九州大学大学院薬学府分子病態解析学分野の皆様心から感謝申し上げます。

最後になりましたが、常に支えとなり励ましてくださった友人、多大なる理解と、精神的、経済的に支え、温かく見守ってくれた家族に心から感謝いたします。