

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 :



【序論】

血管性認知症 (VaD)は、脳血管障害を起因として生じる、アルツハイマー病に次いで患者数の多い認知疾患であり、若年性認知症の要因としては最多である。本疾患に対する承認薬は現状存在せず、有効な治療ターゲットが求められている。その一方で、脳は酸化されやすい多価不飽和脂肪酸を豊富に含む臓器であり、重量に対する酸素消費量が多いため、脂質過酸化反応が亢進しやすい環境下にある。実際に、VaD 患者や認知機能障害患者において脂質過酸化反応代謝産物の有意な増加、蓄積が観察されている¹。加えて、脂質過酸化反応によって生じる酸化脂質の生理活性が明らかになってきている。これまでに、酸化リン脂質の一種が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、酸化脂質や代謝産物がミクログリアやアストロサイトの活性化を介し、炎症反応を亢進させることが報告されている²。以上の背景より、脂質過酸化反応が VaD の発症あるいは病態進行に寄与しており、VaD 病態抑制のためのターゲットになるのではないかと考えた。

そこで本研究では、VaD モデル動物としてヒトの皮質下血管性認知症を再現する慢性脳低灌流モデルマウスを用い、まず脂質過酸化反応抑制剤の投与により病態保護効果を示すか評価した。続いて、モデル動物の脳を時期および領域ごとに測定し、いつどのような酸化脂質が生成し、また抑制されるかについて調べることにした。

【方法】

VaD モデル動物の作成 VaD モデルとして、両側総頸動脈狭窄 (bilateral common carotid artery stenosis; BCAS)マウスを使用した。10–12 週齢の雄性 C57BL/6J マウスに対し、イソフルランによる吸入麻酔下で頸部腹側の皮膚を正中切開し、総頸動脈を露出した。右総頸動脈に内径 0.16 mm、左総頸動脈に内径 0.18 mm のマイクロコイルを装着し、慢性脳低灌流状態を作成した。

化合物の投与 本研究では、脂質過酸化反応抑制剤として、所属研究室でのスクリーニング系にて見出した化合物であるエトキシキンおよびメチルドパを BCAS マウスに投与した。エトキシキンは 50 or 100 $\mu\text{mol/kg}$ 、メチルドパは 100 or 200 $\mu\text{mol/kg}$ となるように、50% polyethylene glycol 300 を含有

する phosphate-buffered saline (PBS)に溶解させ、経口投与した。各化合物は術前 30 分および術後にエトキシキンは週 3 回、メチルドパは週 5 回となるよう反復投与した (Fig. 1)。また、陽性対照群として 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-piperidine-N-oxyl (Tempol) 5mM 水を自由飲水させる群を作成した。

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 BCAS 術後 4 週のマウスに対し、行動試験として新奇物体認識課題 (NORT)および Y 迷路を実施した。NORT では、2 つの馴染物体を提示させた 90 分後に 1 つを新奇物体に変更させマウスを自由探索させた際の、新奇物体の探索割合

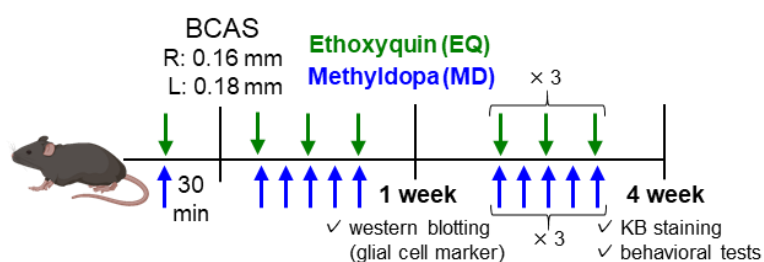


Figure 1. エトキシキンおよびメチルドパの投与スケジュール。

で評価した。Y 迷路では、各アームへの進入回数と、2 つ前までに進入したアームと異なるアームへの進入に成功した割合で評価した。また術後 4 週のマウスを安楽死させた後、脳を摘出し Klüver-barrera (KB)染色を実施し、脳梁部位における髄鞘の形態学的評価を行った。また BCAS 術後 1 週のマウスに対しては、脳梁、線条体および海馬領域を分取し、タンパク抽出した後 western blotting にてミクログリアおよびアストロサイトの細胞マーカータンパク質の発現変動を評価した。

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 BCAS 術後 1 日から 1 週までのマウス脳より脳梁あるいは線条体を分取し、RNA を抽出した。抽出サンプルは、RT-PCR を実施し、フェロトシス関連遺伝子およびホスホリパーゼの遺伝子発現を評価した。また、術後 6 時間から 1 週までのマウス脳より脳梁、海馬を分取し、Bligh-Dyer 法にて脂質を抽出した。抽出サンプルを適宜希釈し、液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC/MS/MS)を用いて酸化リン脂質および未酸化リン脂質を検出した。測定したリン脂質種として、脳に最も豊富な種であるホスファチジルコリン (PC)およびフェロトシスとの関与が報告されている一部ホスファチジルエタノールアミン (PE)を対象とした。

【結果・考察】

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

BCAS マウスでは、術後 4 週より脳梁において、髄鞘脱落による白質病変が観察される³。そこで KB 染色を用いて脳梁の形態変化を観察した。その結果、術後 4 週のマウスでは髄鞘染色性の低下および空胞の形成が観察されたが、エトキシキンおよびメチルドパの投与は、BCAS マウスにおけるこれらの白質病変を抑制した (Fig. 2a)。また、BCAS 術後 4 週では作業記憶障害が生じることが報告されている⁴。そこで、作業記憶の評価として NORT および Y 迷路を実施した。NORT での評価である新奇物体への探索割合は、BCAS 術後 4 週のマウスで有意に低下した一方、エトキシキンおよびメチルドパの投与により抑制された (Fig. 2b)。同様に、Y 迷路においても、エトキシキンおよびメチルドパの投与は術後 4 週の BCAS マウスにおいて評価項目である交代行動の成功率の低下を抑制し、各化合物が BCAS マウスで生じる作業記憶の障害を保護可能であることが示された。

BCAS マウスでは白質病変や作業記憶障害に先立ち、術後 1 週よりミクログリアやアストロサイトが活性化し、炎症反応が亢進する³。各細胞マーカータンパク質の発現量を western blotting にて測定したところ、エトキシキンおよびメチルドパの投与は BCAS 術後 1 週での脳梁や海馬領域における各タンパク質の発現量増加を抑制した。

以上の結果より、脂質過酸化反応抑制剤は VaD モデルマウスでのグリア細胞活性化、白質病変、作業記憶障害といった病態を抑制可能であり、VaD 治療に対する脂質過酸化反応抑制の有用性が示された。特にメチルドパはこれまで高血圧治療として臨床で使用されている化合物であり、 α_2 作動薬として作用する化合物

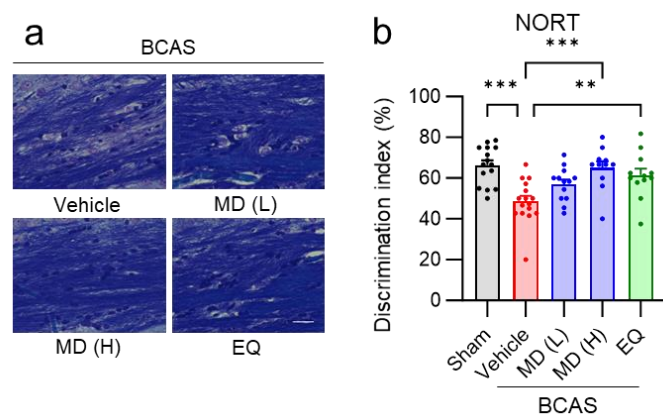


Figure 2. BCAS 術後 4 週における脳梁部位の白質病変評価 (a)および NORT における新奇物体を探索した割合 (b)。 (n = 11–16, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$) MD: メチルドパ、EQ: エトキシキン

である。しかしながら、本研究で BCAS マウスに投与した化合物量をヒト投与量に換算した場合、臨床での投与量と比較してかなり低用量であった。さらにメチルドパの投与は BCAS 処置による脳血流量低下に影響しなかったことから、メチルドパの保護作用は $\alpha 2$ 受容体に依存しないと考えられる。

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

続いて、BCAS マウスの脳を経時的に観察し、いつ脂質過酸化反応が亢進するのか、どのような酸化脂質が生成するかについて評価した。

そこでまず、脂質過酸化反応により誘導される細胞死であるフェルトーシスが BCAS マウス中で生じているか評価した。しかしながら、術後 1 週までに BCAS マウス脳中での有意なフェルトーシス関連遺伝子 (*Gpx4*, *Ptgs2*) の変動および、酸化 PE の増加は生じなかった。

続いて、脂質過酸化反応により生じる最終産物の一つである 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) の修飾タンパク質の発現を測定した結果、western blotting にて海馬の一部バンドが術後 1 週で最も増加していた (Fig. 3)。この結果より、BCAS 中では術後 1 週までに脂質過酸化反応が亢進しているのではないかと考えた。

そこで、BCAS 術後 6 時間から 1 週までのマウスの脳梁および海馬を脂質抽出し、LC/MS/MS にて酸化 PC の含量変動を測定した。その結果、海馬領域での長鎖および断片化した酸化 PC の有意な変動は観察されなかったが、術後 3 日および 1 日のマウス脳梁において、一部の酸化 PC の二酸化物の生成が増加した。ここでメチルドパを投与した BCAS マウスを作成し、増加した酸化 PC を抑制可能かどうか検討した。その結果、予想に反して、メチルドパを投与した BCAS 術後 3 日のマウスでは、さらに酸化 PC の二酸化物が増加した (Fig. 4a)。

メチルドパが BCAS 処置時に基質となる未酸化の PC の組成を変化させ、酸化 PC の増加を起こしたのではないかと考え、未酸化の PC の組成が変動するかどうか測定を行った。しかしながら、検出可能な PC 各種、また一方の脂肪酸鎖が切断された lysoPC において、いずれの群でも有意に変動しなかった。続いて、慢性的な脳低灌流時には継続的な酸化脂質が生じているが、それと同時に酸化脂質を還元、もしくは加水分解し切断する機構が亢進しているのではないかと考えた。そこで、BCAS マウスの脂質代謝酵素の遺伝子発現を RT-PCR にて測定した。その結果、一種のホスホリパーゼ mRNA 量が BCAS 術後 3 日の

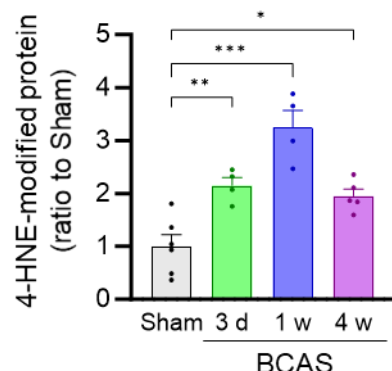


Figure 3. BCAS 術後 3 日から 4 週におけるマウス海馬中 4-HNE 修飾タンパク質の発現変動評価。ウェスタンブロットで 37–50 kDa に生じたバンド強度を CBB 染色による総タンパク質量で補正した。 (n = 4–6, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

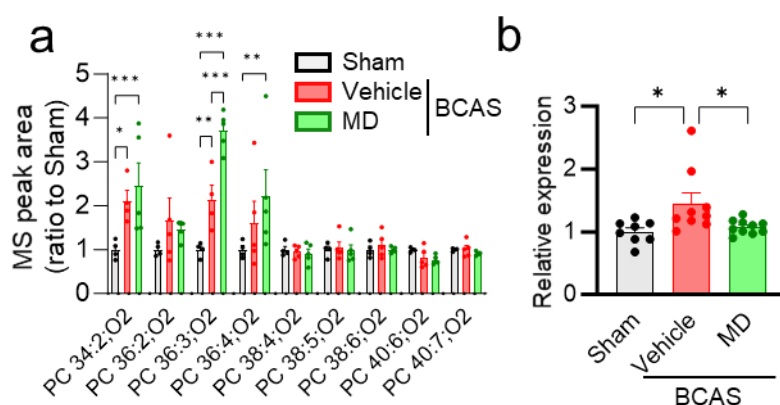


Figure 4. (a) BCAS 術後 3 日の脳梁における酸化 PC (二酸化物) の生成量変動 (n = 4–5, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$) (b) BCAS 術後 3 日の線条体におけるホスホリパーゼの mRNA 量 (n = 8–10, * $p < 0.05$) MD: メチルドパ

そこで、BCAS マウスの脂質代謝酵素の遺伝子発現を RT-PCR にて測定した。その結果、一種のホスホリパーゼ mRNA 量が BCAS 術後 3 日の

マウスで増加した。一方で、メチルドパの投与はホスホリパーゼ発現を抑制した (Fig. 4b)。

BCAS マウスおよびメチルドパを投与したマウスで増加した酸化リン脂質の分子量より脂肪酸鎖を推定すると、遊離可能な脂質メディエーターには、炎症/抗炎症反応に寄与するもの、脳血管障害時の修復因子として生じるものが含まれる。そのため、本研究での結果は、メチルドパがホスホリパーゼ活性を抑制することで、酸化リン脂質からの脂肪酸、メディエーター放出を保護していることを示唆するものとする。

【結論】

本研究では、VaD モデル、特に慢性病態時における脂質過酸化反応の関与について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。スクリーニング系にて見出した複数の脂質過酸化反応抑制剤による病態保護効果は、本病態の進行において脂質過酸化反応が重要な役割を果たすというエビデンスを提供する。また、モデルマウスにおいて一部酸化リン脂質の生成および脂質代謝に関わる酵素発現が、グリア細胞が活性化する時期までに上昇することが明らかとなった。しかしながら、本研究で明らかにした酸化脂質が本病態の原因分子となるか、どのような生理活性を有するかはいまだ不明である。今後、病態下で生じた酸化脂質を分取もしくは合成し、神経細胞やグリア細胞等の脳実質細胞へ添加した際の応答を評価することで、酸化脂質がどのような機能を有するか明らかに出来るものと考えられる (Fig. 5)。加えて、本研究により酸化脂質が 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つながるものが期待される。

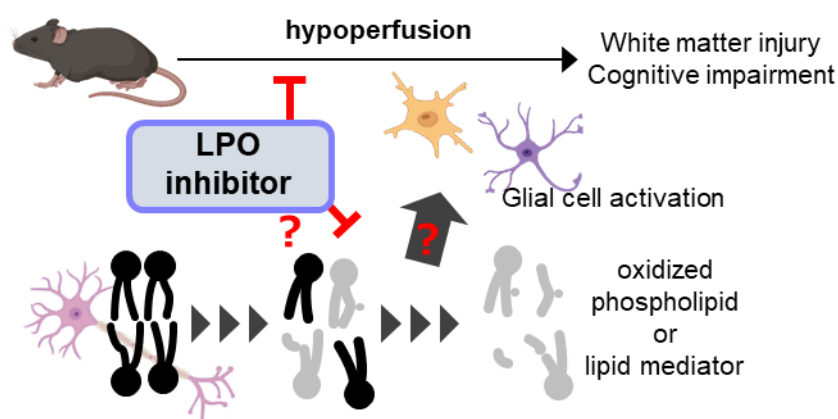


Figure 5. 脂質過酸化反応抑制剤による VaD 病態保護の推定機構。本研究では抑制剤により VaD 病態を保護可能であり、またグリア細胞の活性化以前に脂質過酸化反応が亢進していることを明らかにした。今後、本研究をもとに生じた酸化脂質の脳実質細胞への応答を評価することで、病態進行に寄与するような生理活性を有する酸化脂質の解明が期待される。

【引用文献】

1. Gustaw-Rothenberg, K. *et al. Geriatr. Gerontol. Int.* **2010**, 10, 161
2. Dong Y. *et al. Nat. Neurosci.* **2021**, 24, 489
3. Shibata M. *et al. Stroke*, **2004**, 35, 2598
4. Shibata M. *et al. Stroke*, **2007**, 38, 2826

【発表論文】

1. Abe M. *et al. Biol. Pharm. Bull.* **2024**, 47, 104