

## 論文の内容の要旨

論文題目 マウス慢性脳低灌流モデルを用いた大脳白質慢性虚血性変化  
に対する Cilostazol の投与効果に関する研究

大友 亮

### <序文>

血管性認知症(vascular dementia: VaD)とは脳血管障害に関連して出現した認知機能障害の呼称であり、全世界的にはアルツハイマー病に次いで2番目に多いタイプの認知症(20～30%)とされている。VaDには種々の病態が存在するが、その中においても罹患患者数が最も多い病態が、びまん性大脳白質病変を特徴とする皮質下血管性認知症(subcortical ischemic vascular dementia: SIVD)である。本病態は加齢性血管変化に伴う脳血流低下が誘因となるため、高齢社会において今後も患者数が増加の一途を辿る事が予想され、本質的な病態理解に基づく治療法の開発は急務であると考えられる。病態解明の一助として、本病態のモデルマウスである両側総頸動脈狭窄モデル(bilateral common carotid artery stenosis : BCASマウス)が存在する(Shibata et al. *Stroke* 2004)。同モデルにおける白質の病理学的変化としては術後7日目以降からのmicrogliaの活性化、14日目以降からのastrocyteの増生といった炎症性変化が観察され、30日後には軸索構造の乱れを伴わない白質髄鞘の脱落が見られる。モデルの弱点としては手術直後から翌日にかけて、急激な脳血流低下を来すために、厳密には加齢による緩徐進行性の脳血流低下を再現しきれていないという点が挙げられる。

### <目的>

BCASマウスを用いた先行研究においては、抗血小板薬であるCilostazolが内因性のmyelin修復機構を促進させる可能性が提唱されているが、手術当日より投与されていたため、その効果対象が術後急性期の血流低下であった可能性が否定出来なかった。また、投与期間が高々4週間であったため、緩徐進行性の病態であるSIVDの治療薬としてのインパクトは大きいものではなかった。そこで、本実験においては、既存のBCASモデルを用いつつ、術後急性期を回避するタイミングでCilostazolを長期投与した際の、大脳白質慢性虚血性変化に対する効果について検証する事を目的とした。具体的には、①慢性脳虚血に対する有効性を指摘されたCilostazolが、急性期を回避するタイミングで長期投与した場合においても同様の役割を果たしうるかを検証する実験、②BCASマウス群の脳梁において経時的に発現が増加する遺伝子群を調べ、その中から特に変動が大きかった遺伝子を抽出し、その脳梁における発現局在を確認した後、Cilostazol投与による同遺伝子の発現変化を検証する実験を

行う方針とした。

#### <方法>

モデルの再現性を Hematoxylin Eosin (HE)/Kluver Barrera (KB)染色で確認した後、手術から1週間経過し、血行動態が安定した BCAS マウス(n=32) に対して最長 10 週間にわたり、Cilostazol(100mg/kg/day)と placebo の経口投与を行った。Cilostazol 投与群については投薬開始後 2, 6, 10 週に、placebo 群については 2, 4, 6, 8, 10 週にそれぞれ 4 匹ずつ sacrifice した。得られた検体から凍結切片を作成し、myelin proteolipid protein に対する免疫蛍光染色により、KB 染色で脱髄性変化が最も目立った帯状束における myelin 密度の経時的変化を各投与群間で比較した。続いて、同モデルマウスの脳梁においてマイクロアレイ解析を行い(解析①: sham operation 後 4 週と術後 4 週を比較; n=3 each, 解析②: 術後 2 週と術後 6 週を比較; n=3 each), 解析①においては手術の有無による発現遺伝子の変動を、解析②においては手術施行後の経時的変化による発現遺伝子の変動について検証した。発現変動解析には Rank product 法を用いた。本解析の結果、FDR<0.1 を満たし、かつ 2 倍以上の発現上昇が見られた遺伝子について、各群において Gene Ontology (GO)解析を行った。また、解析②において、FDR<0.01 を満たし、2 倍以上の発現上昇を来した遺伝子のうち、定量 RT-PCR 法においても有意な発現増加が確認されたものに関しては、それらの翻訳産物に対して sham operation 後 6 週、または術後 6 週のマウス脳から得られたパラフィン切片を用いた免疫組織染色を行い、白質における発現を確認した。その後、Cilostazol と placebo を各々 6 週間投与した BCAS マウス脳梁(n=4 each)における同遺伝子群の発現差異を定量 RT-PCR 法により検討した。

#### <結果>

Placebo 投与群における myelin 密度は 2 週毎に低下傾向を示したが(2 週後と 10 週後の蛍光輝度に有意差あり。p=0.003), Cilostazol 投与群においては 6 週後から 10 週後にかけて myelin 密度の低下が抑制され、投薬 10 週後においては両群間に有意差が認められた(p=0.02)。マイクロアレイ解析①においては GO 解析の対象となった遺伝子は 23 個あり、類似先行研究同様に、免疫応答に関連した遺伝子群の発現が増加傾向である事が確認された。一方、解析②においては 17 個の遺伝子が GO 解析の対象となり、細胞分化や組織形成に関与する遺伝子群の発現が増加傾向であった。解析②で抽出された遺伝子の中では *Btg2*, *Duspl*, *Egr2*, *Fos*, *Rarb* が定量 RT-PCR 法においても有意に変動していた。同遺伝子群の翻訳産物に対して行った免疫組織染色では、それらが白質においては一部の oligodendrocyte で強く発現している事が確認された。また、Cilostazol 投与群においては placebo 投与群に比して脳梁における *Btg2* の発現が有意に上昇していた(p=0.03)。

#### <考察>

本研究において、慢性脳低灌流下で発現増加が確認された遺伝子群が細胞分化や組織形

成に関与するものであった事や、それらの翻訳産物が白質においては oligodendrocyte で強く発現していた事からは、慢性脳虚血状態の大脳白質においては、炎症性変化による myelin 脱落の背景に oligodendrocyte の分化を中心とした myelin 再生機構が働いている可能性が示唆された。

また、本研究において Cilostazol が BCAS マウス白質の myelin 脱落を長期間抑制した事や、虚血下の大脳白質において oligodendrocyte で強く発現している *Btg2* の発現を上昇させた事からは、慢性脳低灌流状態においては Cilostazol が oligodendrocyte において特定の遺伝子の発現を亢進させ、その分化を促進している可能性も考えられた。しかしながら、白質においては oligodendrocyte の他に astrocyte, microglia, pericyte, 血管内皮細胞等、様々な構造物が一体をなしており、今回の結果が種々の薬理作用を有する Cilostazol の oligodendrocyte への直接的な作用の結果であるのか、または他の経路を介しての結果であるのかについては追加の検証が必要であると考えられた。

#### <結論>

両側総頸動脈狭窄マウスに最長 10 週間 Cilostazol を投与し、本薬剤が慢性脳低灌流による白質の粗鬆化を長期的に抑制する事を確認した。続いて、マイクロアレイ解析により同マウス脳梁において経時的発現増加を来す遺伝子群を同定し、その翻訳産物に対して免疫組織染色を行い、これらが白質においては oligodendrocyte で強く発現する事を特定した。本遺伝子群中の *Btg2* は Cilostazol 投与により発現が促進された。以上より、Cilostazol は慢性脳低灌流状態において白質保護効果を発揮するとともに、oligodendrocyte において、特定の遺伝子の発現増加を促進する可能性が示唆された。