

# 動物睡眠時無呼吸症モデルを用いた間歇的低酸素の及ぼす

## 脳白質病変と高次機能への影響とそのメカニズムの検討。

研究代表者 東京大学先端臨床医学開発講座 特任助教 若山幸示

### まとめ

睡眠時無呼吸症候群(SAS)は睡眠障害や日中の眠気をもたらす、なおかつ加齢により罹患率増加もみられる。近年 SAS が高齢女性における高次脳機能障害と関連するとの報告がなされたが<sup>1</sup>、高次脳機能障害をもたらすメカニズムは十分にわかっていない。最近、SAS患者を対象にした脳MRIによる画像診断学的研究で、脳白質障害がSASの患者で高率にみられるとの報告があり<sup>2</sup>、SAS動物モデルをもちいて、脳に見られる病理学的変化を検討した。その結果、間歇的低酸素(IH)曝露による、脳白質における成熟オリゴデンドロサイトの有意な減少がみとめられた。またIH暴露2週間目までの初期にはマイクログリア、アストロサイトの有意な増加がみられ、炎症性変化と考えられた。IHラットの灰白質構造である海馬には室内気(RA)ラットと同様に神経細胞障害はみられなかった。また脳梁白質に限ってIHラットではRAラットに比べて、アポトーシス細胞増加がみられた。髄鞘染色では有髄線維の粗造化がみられ、IHによる白質障害と考えられたが、ミエリンベースックプロテインの発現に明らかな変化は認められなかった。

### 目的

睡眠時無呼吸症候群(SAS)は、近年、認

知症発症の危険因子として考えられるようになりつつあるが、その機序に関しては十分わかっていない。動物モデルの確立が、基礎研究の進展には必須であるが、筆者は効率よくラットSASモデルを作成可能なIHチャンバーを開発した、東京大学法医学研究グループによる協力を得て、睡眠時無呼吸症候群の主たる病態である、IH負荷が高次脳機能障害にどのように関連するかを、これまでも研究されている灰白質、神経障害の観点とは異なり、脳白質障害との関連に注目し、高次脳機能障害発症のメカニズムの解明を最終目的として研究を計画遂行した。

### 方法

#### 睡眠時無呼吸動物モデルの作成

SASをシミュレートし、IH負荷を20サイクル/時( $FiO_2$  4%→21%,  $CO_2$  0%)の頻度で1日あたり8時間繰り返し低酸素負荷が可能なケージあるいは通常のケージに7週齢オスのSDラットを飼育し、間欠的低酸素暴露ラット(IHラット)、通常室内気で飼育したコントロールラット(RAラット)の2群を設定した。各群のラットを、実験開始後、2週間目、4週目そして6週目の各時点で犠牲死させ、経時的に脳を採取した。免疫組織化学用に、凍結ブロックを作成、髄鞘染色用にパラフィンブロックを作成した。

## 脳白質障害の評価

脳梁における、成熟オリゴデンドロサイト (APC 陽性細胞) オリゴデンドロサイト前駆細胞 (NG2 陽性細胞) によるオリゴデンドロサイト系列細胞に加え、マイクログリア (Iba1 陽性細胞)、アストロサイト (GFAP 陽性細胞) の活性化反応を免疫組織化学法にて定量評価した。脱髄性変化はミエリンベースックプロテイン (MBP) 染色、ルクソールファストブルー (LFB) 染色を行い評価した。灰白質障害の有無の評価は海馬における Fluoro Jade B (FJB) 染色にて評価を行った。

## 白質、灰白質におけるアポトーシス細胞の検討

TUNEL 染色により脳梁 (脳白質)、海馬 (脳灰白質) でのアポトーシス細胞出現頻度も比較検討した。

## 研究の成果

### IH 曝露による脳梁 (白質) の病理学的変化

各群 2 週 (n=3)、4 週 (n=5)、6 週 (n=3) で検討を行った。成熟オリゴデンドロサイト (APC 陽性細胞) は 2 週、4 週、6 週の全経過を通して IH 群において RA 群に比べ有意に減少がみられた (図 1 A)。オリゴデンドロサイト前駆細胞 (NG2 陽性細胞) は IH 負荷 2 週の時点で IH 群で有意に細胞数の増加がみられた (図 1 B)。マイクログリア (Iba1 陽性細胞) は 2 週の時点で IH 群に有意な増加をみとめ (図 1 C)、アストロサイト (GFAP 陽性細胞) は 4 週の時点で IH 群で有意な増加をみとめた (図 1 D)。

## IH 曝露の海馬 (灰白質) への影響

海馬 CA1 領域、CA3 領域、歯状回 (DG) 領域において、RA 群、IH 群で神経細胞マーカーである NeuN、MAP2 の発現を検討した。2 週の時点で検討した結果、これらの神経細胞マーカーの発現に明らかな差は認めなかった (図 2 A)。次に FJB 染色を行い、変性神経細胞の有無を検討した。海馬の CA1 領域、CA3 領域、DG 領域いずれにおいても、IH 群 (2 週目、4 週目) において神経変性を示す FJB 染色陽性細胞は認めなかった (図 2 B)。

## 脳白質、灰白質における TUNEL 陽性細胞の検討

脳梁 (白質)、海馬 (灰白質) の各領域における TUNEL 陽性細胞の経時的変化を RA 群、IH 群 (2 週)、IH 群 (4 週) の脳組織で検討した (各群 n=3)。脳梁 (CC) における TUNEL 陽性細胞は RA 群に比べ IH 2 週群、IH 4 週群で有意に増加がみられた。海馬各領域 (CA1, CA3, DG) における TUNEL 陽性細胞数は RA 群、IH 2 週群、IH 4 週群の比較で有意な差は認めなかった (図 3 A)。共焦点顕微鏡を用いた検討では、IH 曝露ラットの脳梁における TUNEL 陽性 (白矢印)、GST-pi 陽性細胞 (白矢印) の共局在 (白矢頭) を認め (図 3 B)、脳梁 (白質) における成熟オリゴデンドロサイト (GST-pi 陽性細胞) のアポトーシスが確認された。

## 髄鞘染色、MBP による脳梁白質統合性の評価

LFB 染色による検討の結果 (図 4 A)、IH 2 週群のラットの脳梁で白質の粗造化が認

められた(赤矢印)。IH 4週群の脳梁では、はっきりとした白質の粗造化は認められなかった。免疫組織化学による MBP 発現の検討(図 4B、各群 n=3)では、RA 群に比し、IH 2週群、IH 4週群の脳梁における MBP 発現レベルに大きな差は認められなかった。

## 今後の課題

今回の研究では、IH 群においていずれの時点においても、脳梁(白質)における成熟オリゴデンドロサイトの減少がみとめられるという点において、IH が脳白質障害を生じることが示された。また、細胞死という側面において IH2 週、IH4 週のラットではいずれも、海馬における神経細胞変性が認められず、TUNEL 陽性細胞の有意な増加もみられなかったが、IH2 週、IH4 週のラットの脳白質組織である脳梁で TUNEL 陽性細胞が RA ラットに比べ有意に増加していたことは、IH が脳白質により選択的に障害をきたしうることを示すデータとして興味深い。一方で、脳梁における白質の粗造化が IH2 週に比べ IH4 週で目立たなくなっていた点、また MBP の発現レベルという点において IH ラットでも明らかな変化をみとめなかった点に関しては、今回の実験のデータのみでは不明であり、今後さらにサンプル数を増やし、ウェスタンブロットやリアルタイム PCR など、他の手法による検討を加える必要がある。また今回の研究ではマイクログリアやアストロサイトの活性化は IH 負荷を初めて比較的早い時期に確認されたものの、時間の経過とともに収束傾向がみられた。炎症反応の程度に比べ、オリゴデンドロサイトの有意な減少が

継続していることについて、その動態に乖離がみられ、また今回の検討サンプル数が十分とは言えないことから、今後、炎症反応が比較的是っきりとみられた、初期 2 週目までの変化をサンプル数の増加や、より初期の時点でのサンプリングも含めて検討を進めていく必要があると考えられた。

また、病理変化と関連して、神経機能障害、とくに高次脳機能障害の有無も、行動試験による検討を併せて行うことで、引き続き検討を進める必要がある。

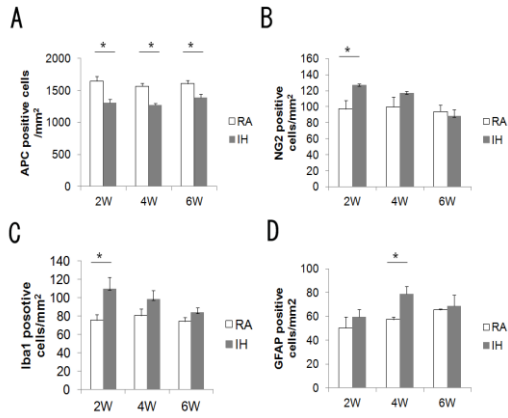
## 公表方法

2013 年 日本神経学会総会で発表を行った。今後英文国際雑誌への投稿に向けて、データを追加し、早期の論文化を目指す。

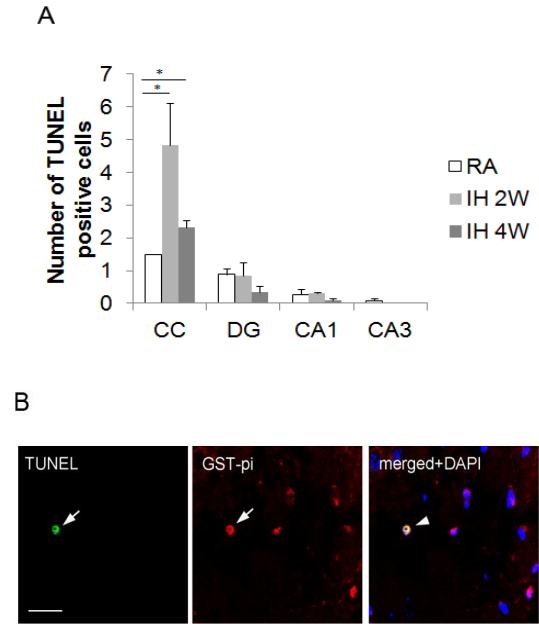
## 文献

1. Gianakos D, Mehra A. Sleep-disordered breathing and cognitive impairment in older women. *JAMA*. 2011 Nov 2;306(17):1863
2. Kim H, Yun CH, Thomas RJ, Lee SH, Seo HS, Cho ER, Lee SK, Yoon DW, Suh S, Shin C. Obstructive sleep apnea as a risk factor for cerebral white matter change in a middle-aged and older general population. *Sleep*. 2013 May 1;36(5):709-715B

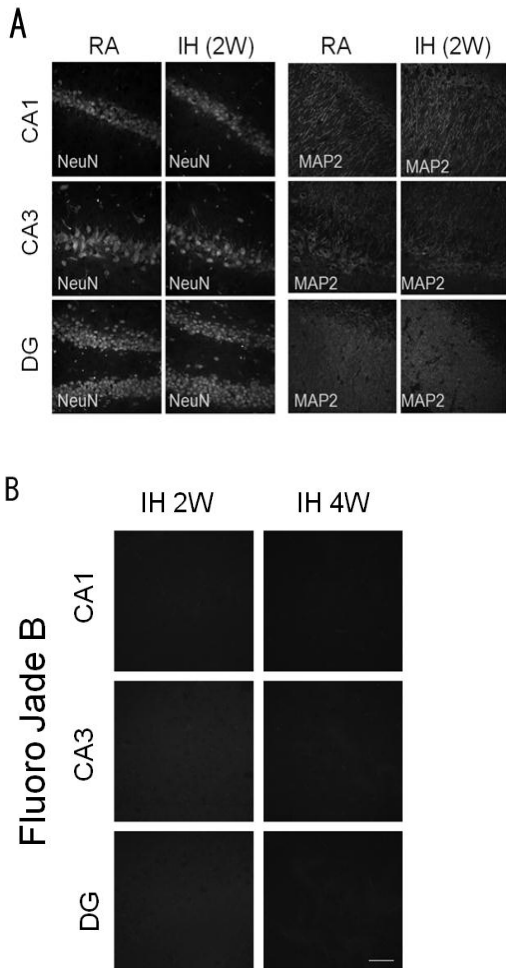
☒ 1



☒ 3



☒ 2



☒ 4

