

<研究課題>

脳血管ユニットにおける血管の老化とそれに伴うグリア病態のメカニズム解明

代表研究者	東京医科大学	組織・神経解剖学分野	准教授	大山恭司
共同研究者	東京医科大学	組織・神経解剖学分野	講師	篠原広志
	山形大学	法医学教室	教授	前田秀将

【抄録】

本研究により、海馬の正常発生・発達過程において血管の老化が生じることが示唆された。また、子宮内低酸素 (IH) 曝露を受けた仔マウスの海馬では、血管の老化、新生が生じることが明らかとなった。さらに、血管密度の上昇、アストログリア、ミクログリアの増生、グリア血管カップリングが亢進していた。その一方で、血管の透過性には異常は見られなかった。上記の結果から、増生したグリアと新生血管のカップリングの亢進は、海馬保護的にはたらく適応反応であると考えられた。今後、血管の老化、新生、グリア増生がどのような分子メカニズムによって制御されているかを明らかにする必要がある。

1. 研究の目的

本研究では、以下を明らかにすることを目指した。

- 1-1 血管の正常老化シグナルを同定する
- 1-2 子宮内低酸素が血管およびグリア細胞に及ぼす影響を明らかにする

2. 研究方法と経過

2-1 免疫染色

マウスを 4%PFA にて灌流固定後、脳組織を 4°C で 1 晩浸漬固定した。PBS 洗浄後、30%スクロース/0.1M PB にて 1 晩浸漬した後、OCT に包埋、凍結切片を作成した。1 次抗体で 4°C で 1 晩反応した後、蛍光色素標識 2 次抗体で室温にて 45 分反応した。PBS 洗浄後、封入し、共焦点レーザー顕微鏡にて写

真撮影、Photoshop にて画像解析を行った。

2-2 *Ex vivo* 組織培養

マウス海馬組織を DMEM/F12、Motoserum, Glutamax (Glutamine, Penicillin, Streptomycin) 存在下で 5 日間培養した後、4%PFA にて固定、上記同様の方法で解析した。

2-3 子宮内間欠的低酸素 (IH) 実験

妊娠マウスを間欠的低酸素環境下にて飼育した(妊娠 11-18 日目)。生まれてきた仔マウスを 4%PFA にて灌流固定後、上記と同様の方法で解析した。

3. 研究の成果

3-1 血管の正常老化シグナル

海馬の発生・発達期から成体期に至るまで、血管壁 (Isolectin B4+) に少数ながら老化細胞 (SAbgal+、p21+、

Endonuclease G+) が恒常的に存在することが明らかとなった (第 40 回韓国基礎老化学会 (2023) 招待講演)。また *ex vivo* で海馬を培養したところ、Wnt 活性化剤(CHIR99021)が血管内皮細胞の老化を抑制するのに対して、Wnt の下流転写因子 **b-catenin** に対する阻害剤(ICG-001)を作用させると、老化細胞が増加することが明らかとなった。これらの結果は、**Wnt/b-catenin** シグナル経路が海馬における血管の老化を抑制する可能性を示唆する。また、子宮内低酸素曝露(IH)を受けたマウス新生仔の海馬における血管内皮細胞の老化亢進 (SAbgal↑, p21 発現↑)、血管新生を示唆するデータを得た。

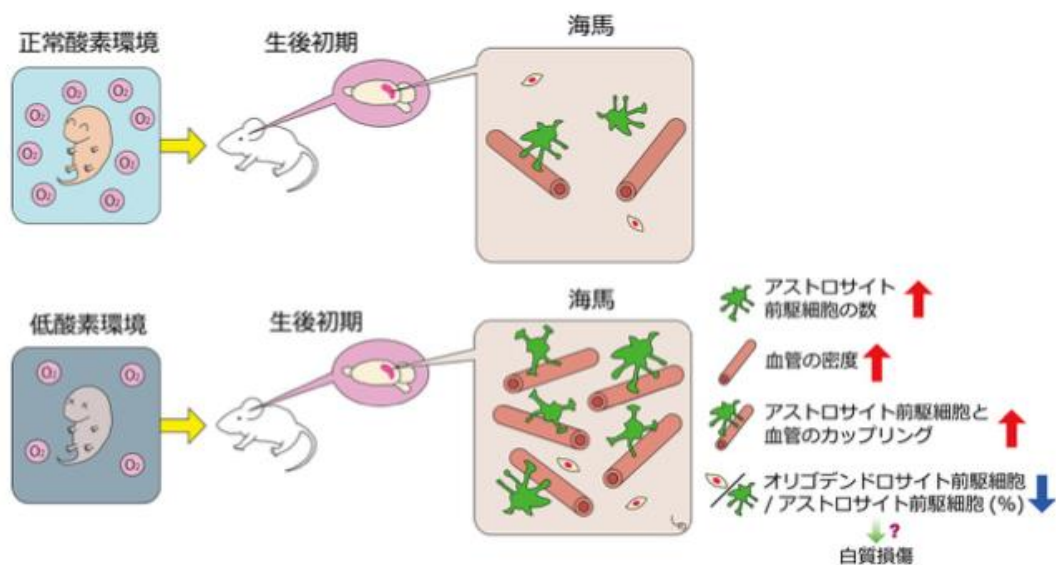
3-2 子宮内低酸素曝露(IH)が血管に及ぼす影響

妊娠マウス (妊娠 11—18 日目) を IH 曝露後、仔マウス海馬の血管に及

ぼす影響を検討した。その結果、生後 2、6 日目において海馬における血管密度が高くなることが明らかとなった (図)。IH により血管透過性が高い不完全な血管が新生した可能性も考えたため、血管内皮のタイト結合タンパク質の発現を免疫染色にて検討した。IH 曝露を受けた仔マウスとコントロールマウスの海馬組織を固定、凍結切片を作成した。そして、海馬の新生血管におけるタイト結合タンパク質 **Claudin5** の発現を免疫染色にて検討した。その結果、**Claudin5** の発現に顕著な影響は見られなかった。同様に、有窓性血管のマーカである **MECA32** の発現についても顕著な違いは認められなかった。これらの結果は、血管の透過性には IH による影響はなかったことを示唆する。

3-3 IH がグリアに及ぼす影響

母胎内低酸素環境が新生仔マウスの海馬形成に及ぼす影響



妊娠マウス（妊娠 11—18 日目）を IH 曝露後、仔マウスの海馬におけるグリアに及ぼす影響を検討した。その結果、生後 2、6 日目において海馬 Olig2+/Sox9+/BLBP+アストロサイトの増生、Iba1+ミクログリアの増生が認められた。また、これら 2 種のグリアと血管のカップリングも亢進した。その一方で、オリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC) の全 Olig2 陽性細胞に対する割合は減少していた (図)。

4. 今後の課題

以上の結果から、IH による血管新生やグリア血管カップリングの亢進は、低酸素環境に対する海馬の適応反応と考えられる。海馬はこのようにしてその正常な発生・発達を維持すること

で、脳を保護すると考えられる。

低酸素環境ではたらく転写因子 HIF は、b-catenin を阻害することが知られていることから (Kaidi et al., *Nat Cell Biol*, 2007)、血管の老化制御における HIF と Wnt シグナルのクロストークについて明らかにする必要がある。

5. 研究成果の公表方法

本研究の成果の一部を発表した (Omura et al., *Front Cell Neurosci*, 18:1464402., 2024)。また、本研究課題を遂行する過程で EMT 関連転写因子群が海馬顆粒ニューロン新生の過程で段階的に発現することを見出し、報告した (Ohyama et al., *Front. Neurosci.* 18:1425849., 2024)。

Vascular endothelial cell senescence and hypoxia-induced remodeling of gliovascular unit

Primary Researcher:

Kyoji Ohyama, Associate Professor, Tokyo Medical University

Co-researchers:

Hiroshi M Shinohara, Assistant Professor, Tokyo Medical University

Hideyuki Maeda, Professor, Yamagata University

Abstract

Here we first show that vascular senescence occurs in the developing hippocampus. Our data also show that in utero intermittent hypoxia (IH) induces both vascular senescence and angiogenesis, thereby turnover of vascular endothelial cells. Moreover, IH induces gliosis and facilitates gliovascular coupling without affecting vessel permeability. These data suggest that IH-induced gliovascular coupling is an adaptive response to the IH, thereby protecting the hippocampus. Future studies will be needed to uncover the mechanism of both the turnover of vascular endothelial cells and the remodeling of the gliovascular unit.