

(様式4)

## 学位論文の内容の要旨

( 島内寛也 ) 印

The dynamics of revascularization after white matter infarction monitored in Flt1-tdsRed and Flk1-GFP mice.

(Flt1-tdsRed, Flk1-GFPトランスジェニックマウスを用いた白質梗塞後の血管再生動態に関する解析)

## ◎ 背景・目的

脳血流障害によって白質梗塞が起こり、虚血性脱髄変化に代表される組織障害が生じる。临床上、白質梗塞は認知機能障害や運動機能障害の原因となるものの、白質梗塞後の組織回復過程には不明な点が残されている。特に、再生過程の一つとされる血管新生に関する詳細は不明である。これは、白質梗塞モデル動物に関する研究が少ないこととあわせ、白質梗塞に対する根本的治療が確立されていない要因と考えられる。そこで、我々は、白質梗塞モデルマウスを利用し、白質梗塞後の血管新生過程を明らかにすることを目的とした。

## ◎ 方法

血管収縮薬であるendothelin-1 (ET-1)と血管拡張抑制薬であるN(G)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)をマウス内包に定量的に注入し、白質梗塞を誘導する系を用いた。Flk1(VEGFR2)-GFP::Flt1(VEGFR1)-tdsRed double transgenic mouse をこの系に導入し、既存の血管内皮をtdsRed、血管新生能を有する血管内皮をGFPで標識することで、白質梗塞後の血管修復過程を可視化・検討した。さらに、血管構成要素のペリサイトのマーカーであるPDGFR $\beta$ 染色を行い、ペリサイトの動態を検討した。

## ◎ 結果・考察

・ET-1/L-NAMEを内包へ局所注入し、白質梗塞モデルマウスを作成した。梗塞誘導翌日のMRI T2強調画像で内包内の高信号域を確認し、同部における脱髄所見をLuxol fast blue(LFB)染色で確認した。

・この系をFlk1-GFP::Flt1-tdsRed Tg マウスに導入し、梗塞誘導後の血管再生過程を検討した。Flt1-tdsRed陽性血管内皮(既存の血管内皮)面積は梗塞誘導1日目から減少し、7日目まで有意な回復は認められなかった。一方、Flk1-GFP強陽性の血管内皮(血管新生能を有する血管内皮)は3日目から出現し、7日目までに経時的な面積増加を認めた。これらの結果から、白質梗塞後1日目から血管の減少が引き起こされ、3日目から血管新生が誘導され、7日目まで持続していることが示された。さらに、これらのFlk1-GFP強陽性の血管内皮の構造的・機能的特徴を検討した。共焦点顕微鏡を用いることで、Flk1-GFP陽性血管内皮の管腔構造や枝分かれ構造が確認された。さらに、レクチンを全身灌流することで、血流評価を行い、一部のFlk1-GFP陽性血管で血流を有することが示された。また、Flk1-GFP陽性血管内皮がKi67と共陽性になることが確認され、これらの血管内皮が増殖能を有することが示唆された。Flk1は、VEGF-Aを介した血管新生のmajor mediatorであることが報告されているが、深部白質梗塞後においても、VEGF-Flk1シグナルが血管新生過程における調節因子と

して機能している可能性が考えられた。

・血管内皮細胞とペリサイトのinteractionが血管の安定性と成熟に必要であることがこれまで報告されており、ペリサイトマーカーであるPDGFR  $\beta$  陽性細胞とFlk1-GFP陽性血管内皮との関与を検討した。PDGFR  $\beta$  陽性細胞はFlk1-GFP陽性血管周囲に3日目から出現し、7日目には血管分布に関係なく梗塞巣内に著しく増加した。また、梗塞側内包内のpdgfb mRNAの増加をreal time RT-PCRで確認した。PDGFR  $\beta$  陽性のペリサイトは梗塞後の血管新生過程早期に梗塞巣内に出現することが示され、PDGF-B/PDGFR  $\beta$  シグナルが、ペリサイトの動員と新生血管の安定に寄与している可能性が考えられた。どの細胞がPDGF-Bを産生しているかは不明だが、梗塞誘導3日目でFlk1-GFP陽性細胞周囲にPDGFR  $\beta$  陽性のペリサイトが出現していたことと、angiogenic sproutにおけるtip cellからPDGF-Bが分泌されるという報告から検討すると、Flk1-GFP陽性血管内皮からPDGF-Bが産生されている可能性があると考えている。また、7日目に集積していたPDGFR  $\beta$  陽性細胞はfibroblastマーカーのfibronectinと共陽性であり、脳梗塞後の癒痕形成に寄与している可能性が考えられた。これらの細胞集団は中大脳動脈閉塞モデルや脊髄損傷モデルにおいても報告されており、組織修復過程の役割について更なる解明が必要である。

#### ◎ 結論

白質梗塞後の血管新生は梗塞発症後早期に始まると考えられる。白質梗塞巣内に出現したペリサイトは、早期より血管を被覆し、さらに線維芽細胞様の細胞を産生し、組織の癒痕形成に関与していると考えられた。