

主論文

Time-dependent Change of In Vivo Optical Imaging of Oxidative Stress in a Mouse Stroke Model

(脳梗塞モデルマウスを用いた生体内酸化ストレスイメージングの経時的変化)

【緒言】

脳梗塞急性期における早期再灌流は、梗塞巣周辺を救済するために必須である一方で、再灌流障害をもたらすリスクがある。脳虚血で産生される活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) は、再灌流時に爆発的に増加し、DNA や脂質、蛋白質の酸化ストレス障害をもたらす、神経細胞死に至る。このように、ROS の同定と産生制御は虚血再灌流障害において重要である。

Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) は、抗酸化ストレス因子の発現を調節する転写因子である。Nrf2 は通常状態では、kelch-like ECH associating protein 1 (Keap1) と結合しており、ユビキチン・プロテアソーム系で分解されるが、酸化ストレス存在下では、Nrf2 のユビキチン化が減弱することで Nrf2 が安定化、活性化する。Keap1 から遊離した活性化 Nrf2 は、核内の antioxidant response element (ARE) に結合し、下流の抗酸化ストレス因子群の発現を調節する。

脳梗塞モデル動物における、Keap1-Nrf2 系の発現レベルについて検証している研究もあるが、生体内の経時的変化を観察した研究は少ない。本研究では、Nrf2 の発現制御の仕組みを利用した酸化ストレスイメージングモデルである OKD (Keap1-dependent oxidative stress detector) マウスを用いて、脳梗塞後に生じる酸化ストレスを、in vivo imaging で経時的に観察するとともに、Nrf2 の発現分布について組織学的な評価も加えた。

【材料と方法】

実験動物

OKD マウスをヘテロで交配し、得られた個体を PCR によるジェノタイプングで選別し、11-13 週齢の雌雄それぞれを本実験に使用した。OKD 遺伝子は 3×ARE から成るプロモーターと、Nrf2、FLAG タグ、luciferase で構成されており、酸化ストレス存在下で活性化された内在性の Nrf2 が 3×ARE プロモーター領域に結合し、安定して OKD 遺伝子 (luciferase) を発現することで、生体外から投与されたルシフェリンと反応して生物発光が得られる。

一過性中大脳動脈閉塞後再灌流

山下ら(2006)の過去の報告と同様に、インフルランによる吸入麻酔導入後(笑気 69%:酸素 30%:インフルラン 1%)、頸部を正中切開して右総頸動脈を剖出し、先端をシリコンコーティングした 7-0 ナイロン(塞栓子)を右総頸動脈より挿入し、右中大脳動脈を 45 分間閉塞し、次いで塞栓子を抜去し再灌流した。

in vivo imaging・ex vivo imaging

再灌流 12 時間、1 日、3 日、7 日後に in vivo imaging を行い、発光ピークとなる再灌流 1 日後に ex vivo imaging を行った。撮影 20 分前にルシフェリン 150mg/kg を腹腔内投与し、IVIS システムを使用して撮影を行った。右半球に ROI (region of interest) を設定し、発光強度 (photons/sec) を計測した。

組織学的評価

各タイムコースでの in vivo imaging 施行後、4%PFA で還流固定し、脳をサンプリングし-80°C で凍結保存した。クライオスタットを用いて 20 μm で切片を作成し、脳梗塞体積は Nissl 染色を用いて評価し、内在性の Nrf2 および luciferase、Keap1、HO-1 の発現は DAB 染色を行い評価した。内在性の Nrf2 の発現の分布については、各細胞特異的のマーカー (ニューロン: NeuN、アストロサイト GFAP、ミクログリア: Iba1、オリゴデンドロサイト: GST π、ペリサイト: NG2) と蛍光二重染色を行い評価した。

統計解析

梗塞巣と in vivo imaging データについては正規性の検討を行い、梗塞体積の比較には t 検定を、24 時間後の生物発光強度には Mann-Whitney 検定を用いた。7 日モデルでは、経時的な生物発光の変化を Wilcoxon の符号順位検定を用いて解析した。梗塞体積とピーク時の in vivo シグナルの相関については、Kendall rank correlation coefficient を用いて評価した。各切片につき、梗塞巣とその周辺部をランダムに 3 か所ずつ 200 倍で撮影し、DAB 陽性細胞数をカウントし、ANOVA を使用し各タイムコー

ス間でそれぞれ比較した。

【結果】

in vivo imaging では、術前と比して再灌流 1 日後に発光強度が有意に上昇し、再灌流 3 日後よりシグナルは徐々に減衰し、1 週間後には消退した (pre = $2.7 [2.4 - 2.9] \times 10^6$ photons/sec; 1 d = $4.0 [3.1 - 9.3] \times 10^6$ photons/sec; n = 8; **p < 0.01, Wilcoxon signed-rank test)。ex vivo imaging では、Nissl 染色で認めた脳梗塞中心部と比較し、その周辺部でより強いシグナル変化を認めた。再灌流 1 日後 (ピーク時) の発光強度と脳梗塞体積の間には有意な相関を認め、ピーク時の発光が強い程、梗塞体積が大きいことが示された (R=0.333, p=0.072, Kendall rank correlation coefficient)。

免疫組織学的検討では、内在性の Nrf2 陽性細胞数は、再灌流後に増加し、再灌流 12 時間後をピークに徐々に減少した (F_{4, 25} = 13.0; n = 30; p < 0.01, one-way ANOVA; sham control [n = 4] vs 12 h [n = 7], 1 d [n = 5], 3 d [n = 6], and 7 d [n = 8]; *p < 0.05, **p < 0.01, Turkey's honestly significant difference test)。また梗塞中心部に比して梗塞周辺部で発現が有意に増加した (n = 5-8; ##p < 0.01, paired t-test)。Keap1 については内在性 Nrf2 の発現と対照的に、DAB 陽性細胞数は再灌流 12 時間後までに減少し、7 日後までに徐々に回復した。一方外因性の Nrf2 を示す luciferase の発現は、再灌流 3 日後をピークに増加し、その後は減少した。内在性 Nrf2 と同様に梗塞周辺部で発現が有意に増加した。ARE 下流の抗酸化ストレス因子である HO-1 については、luciferase と同様に再灌流 3 日後をピークに増加し、その後は減少した。梗塞中心部と比して梗塞周辺部で有意に発現増加が認められた。

蛍光二重染色では、Nrf2 は再灌流 12 時間から 1 日後にかけて核と細胞質にともに発現の増加を認め、一方 luciferase は 1 日後から 3 日後にかけて主として細胞質内に発現の増加を認め、Nrf2-luciferase 二重陽性細胞は、再灌流 1 日後に最も多く認めた。各種細胞特異的のマーカーによる、内在性 Nrf2 の細胞別の発現では、先行研究と同様にニューロン (NeuN) における発現が最も高頻度に見られ、オリゴデンドロサイト (GST π)、ペリサイト (NG2) との二重染色で、Nrf2 二重陽性細胞が次いで多く観察された。アストロサイト (GFAP)、ミクログリア (Iba1)、血管内皮細胞 (LEL) と Nrf2 の二重陽性細胞はわずかに認められた。

【考察】

本研究では、脳虚血再灌流障害で生じる酸化ストレスを、生体内イメージングとして経時的な変化を捉えることができた。*in vivo* シグナルは再灌流 1 日後にピークに達しており、この結果は既報告 (Takagi et al., 2014) と一致した。高木らは、OKD 遺伝子の luciferase の代わりに GFP を組み込んだモデルを用いて評価しており、脳切片上の GFP シグナルは梗塞周辺部で強く認め、これも我々の ex vivo シグナルの分布と一致していると考えられた。これまでの脳梗塞モデルの生体イメージングの報告では、虚血再灌流で促進されるオートファジー (Tian et al., 2010) や炎症 (Takamiya et al., 2012)、アポトーシス誘導 (Liu et al., 2010) に焦点を当てて検討されているが、いずれも梗塞周辺部でより強く可視化されており、今回の酸化ストレス動態についても、治療のターゲットとして梗塞周辺部が重要であることが示唆された。

本研究における生物発光シグナルは、ルシフェラーゼをレポーターとして利用した、Keap1-Nrf2 系を介した応答であるため、内在性 Nrf2 や Keap1-Nrf2 系に関わる蛋白の発現動態について、免疫組織化学的な検証を加えた。*in vivo* シグナルが再灌流 1 日後にピークに達するのに対し、内在性 Nrf2 発現は再灌流 12 時間後に梗塞周辺部で増強していた。前述の通り、虚血再灌流で爆発的に増加した ROS により Keap1 の構造変化が生じ、それによって活性化された Nrf2 が核内に移行し、ARE を介して下流の抗酸化ストレス因子の転写を調整している。外因性の Nrf2-luciferase の発現、すなわち *in vivo* シグナルは、安定した内在性の Nrf2 の活性化に依存するため、内在性 Nrf2 と *in vivo* シグナルのピークに若干のずれが生じた可能性が考えられた。さらに、蛍光染色において luciferase は細胞質内のみ蛍光シグナルを認めたが、これは外因性の Nrf2-luciferase が DNA 結合ドメインをもたないためと考えられた (Oikawa et al., 2012)。

内在性の Nrf2 の発現局在については、これまでの報告ではニューロンが主体であり、アストロサイトやミクログリアにわずかに認めるとされている (Dang et al., 2012; Shih et al., 2003; Takagi et al., 2014; Tanaka et al., 2011)。一方で、最近の報告では血管内皮やペリサイトにおいてもその発現を認められており (Imai et al., 2016)、本研究でもこれらの既報告と同様にニューロンにおける発現が最も多く、そ

の他の細胞においてもわずかに認められた。また、本研究ではニューロンに次いでオリゴデンドロサイトでも **Nrf2** の発現が強く認められ、これは他のグリア細胞に比して虚血傷害に脆弱であるためではないかと考えられた (Mifsud et al., 2014; Petito et al., 1998)。神経血管ユニット (neurovascular unit, NVU) に焦点を当てると、その構成細胞全てにおいて **Nrf2** の発現を認め、特に虚血障害に脆弱なニューロンやオリゴデンドロサイトなどの細胞における発現が強いことが分かり、**Nrf2** は NVU の保護に関連する可能性が考えられた。

【結論】

本研究では、**Keap1-Nrf2** 依存性酸化ストレス検出遺伝子を挿入した OKD マウスを用いて、脳梗塞後に生じる酸化ストレスを同一個体で経時的に観察することができた。*in vivo* シグナルの時間的変化は組織学的な **Nrf2** の発現動態とほぼ一致し、梗塞周囲でよりシグナル変化が強く、またピーク時のシグナル強度は脳梗塞体積と相関した。また、内在性の **Nrf2** の発現は、細胞種類別にはニューロンで最も多かった。本研究により確立した酸化ストレス可視化脳梗塞モデルを用いることで、急性期治療としての薬物効果判定などに有用である可能性が示された。