

# ゼブラフィッシュによる新規脳梗塞モデルを用いた

## 薬効評価系の創出

富山大学大学院医学薬学研究部（薬学）応用薬理学研究室  
教授 久米 利明

脳血管疾患は多くの国において主要な死因となっており、その中で我が国においてもっとも頻度の高い疾患は脳梗塞である。脳梗塞では血管の閉塞による虚血に加え、血流の再灌流後に誘発される神経細胞死が病態形成に重要とされている。しかしながら、神経保護に基づく疾患治療薬の開発は十分ではなく、新たな戦略に基づいた治療薬開発に資する新規病態モデルが渴望されている。近年、脳実質細胞と血管、それらの周囲の細胞をひとつの機能的な単位として捉える、neurovascular unitという考え方が注目されている。これまでの脳梗塞研究では動物モデルとしてげっ歯類が頻用されてきたが、これらの研究では脳全体における脳実質と血管の両者への作用を同時に評価することは難しい。そこで我々は、胚および稚魚が透明で生きた状態での観察が容易であることから、ゼブラフィッシュを用いた研究に着手した。

これまでに低酸素負荷によりゼブラフィッシュで脳細胞障害および運動障害が引き起こされるとの報告があるが、血管や血流に対する影響については知られていない。そこで、低酸素負荷が血流に対する影響を調べるため、赤血球前駆細胞にmRFP、血管内皮細胞にeGFPを発現させ、血流の可視化を可能にしたトランスジェニックゼブラフィッシュを用いて検討を行った。低酸素負荷を行うと、脳血流が停止した後、体幹部血流が停止した。定量化のために頭部血管としてmiddle mesencephalic central artery (MMCtA)、体幹部血管としてdorsal aorta (DA)に着目したところ、MMCtAはDAよりも有意に早く血流が停止することが明らかになった。これらの結果から、頭部血管MMCtAの血流停止直後に、再酸素化を行うことにより、脳血管の再灌流が生じることが考えられた。実際、低酸素負荷によりMMCtAの血流が停止した直後に再酸素化を行うことによって、一定時間後に脳血管が再灌流した。この時、DAの血流は保たれていたため、我々は脳虚血再灌流モデルゼブラフィッシュの作出に成功したと考えた。続いて、このモデルにおける生体内変化を明らかにする目的で表現型解析を行った。脳虚血再灌流により神経細胞をはじめとする脳実質細胞が傷害を受けること、さらにアストロサイトが活性化することが知られている。そこで、まずアクリジンオレンジ染色により低酸素負荷・再酸素化後の脳実質細胞死を評価した。低酸素再酸素後、脳において顕著な細胞死が見られた。次に、細胞死が誘導された細胞種を明らかにする目的で、神経細胞に蛍光タンパクKaedeを発現させたゼブラフィッシュを用いて検討したところ、低酸素再酸素処置後Kaedeの蛍光輝度が有意に低下した。また、低酸素・再酸素処置後、アストロサイトのマーカータンパク質であるGFAPの染色輝度が上昇したことから、アストロサイトの活性化が確認された。以上の結果から、本モデルは神経細胞障害、アストロサイトの活性化といっ

た脳梗塞病態の重要な要素を反映するものであることが明らかとなった。

次に、脳梗塞を含む脳血管疾患の治療薬の効率的な探索のため、よりスループットの高い薬効評価系の構築を試み、一度により多くの魚を処置できる脱酸素剤法を採用した。脱酸素剤を用いて低酸素処置時間を検討したところ、低酸素処置を2時間以上行うことで、再酸素化24時間後に、頭部および胸部に浮腫が生じ、アクリジンオレンジ陽性細胞数が増加した。また、その増加は、NMDA受容体アンタゴニストであるMK-801ならびにラジカルスカベンジャーであるエダラポンの処置により抑制された。以上の結果から、脱酸素剤法によって、これまでより効率的に、低酸素負荷による脳細胞障害を惹起できることが示唆された。

以上、本講演ではゼブラフィッシュを用いた新規脳梗塞モデル動物の作出の過程とそれを用いた薬効評価系の構築について紹介する。

## 略歴

### 学歴

1994年 3月 京都大学薬学部薬学科卒業

1996年 3月 京都大学大学院薬学研究科修士課程薬学専攻修了

2001年 5月 博士（薬学） 京都大学

### 職歴

1996年 4月 日本学術振興会 特別研究員

1998年 6月 京都大学大学院薬学研究科 助手

2007年 4月 京都大学大学院薬学研究科 准教授

2018年 2月～ 富山大学大学院医学薬学研究部(薬学) 教授

### 学会

日本薬理学会(学術評議員)、日本薬学会、日本神経科学学会、日本ケミカルバイオロジー研究会、  
日本バイオイメージング学会

### 受賞

2009年 3月 日本薬理学会 第24回学術奨励賞

2014年 8月 平成 25 年度 日本薬学会薬理系薬学部奨励賞