

脳虚血再灌流障害モデルラットの多角的評価と その応用に関する研究

学位論文内容の要旨

医学の発達により虚血性脳疾患の病態が明らかにされつつある。脳虚血再灌流後障害では血流再開後も組織障害が進行し、遅発性ニューロン死あるいは遅発性機能障害を生じる。脳虚血再灌流に伴って産生される種々のフリーラジカルが遅発性再灌流障害の誘因と考えられており、ラジカルスカベンジャーなど急性期の病態に基づいた新たな治療法が導入され始めている。しかしながら、再灌流後の酸素誘導性フリーラジカルの動態は複雑であり、病態生理学的意義を含め不明な点が多い。

本研究は、脳虚血再灌流障害治療のエンドポイントを脳機能改善に求め、より適切な評価系の構築を図ること、ならびに遅発性機能障害の病態を再灌流後のフリーラジカル動態から明らかにすることを目的とした。海馬領域の組織学的変化を伴わない一過性不完全脳虚血モデルとして、両側総頸動脈血流の10分間遮断による2血管閉塞(2-vessel occlusion; 2VO)ラットを作製し、脳血流、脳波、海馬シナプス伝達を指標として、虚血再灌流後の脳機能の動的変化を検討した。また、脳虚血関連分子として一酸化窒素合成酵素(Nitric oxide synthase; NOS)および血管新生因子である血管内皮細胞増殖因子(vascular endothelial growth factor; VEGF)と塩基性線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor; bFGF)の蛋白発現誘導を解析した。さらに、虚血再灌流後機能障害に対するラジカルスカベンジャー・エダラボンとNO捕捉・供与能を有するヘモグロビン修飾体 S-nitrosylated pegylated hemoglobin (SNO-PEG-Hb)の効果を時間治療域(therapeutic time window)から検討し、虚血再灌流障害と各フリーラジカル動態との関連性をから追究した。

皮質脳血流は10分間の2VOによって約40%まで低下し、再灌流直後一時的に虚血前のレベルまで増加した後、80%前後の血流レベルを推移した。また、再灌流1日後にはほぼ虚血前のレベルに回復したが、4日後には逆に虚血前のレベルを上回る傾向を示した。大脳皮質脳波は、虚血中ならびに再灌流直後に徐波成分 δ 波の有意な増加と α 波および速波成分 β 波の減少を認めた。この周波数帯域別脳波の変化は、再灌流後1日目には逆転し、 δ 波の減少および α 波と β 波の増加に転じ、4日目には虚血前へ回復する傾向を示した。このように、脳血流ならびに大脳皮質脳波は虚血後の時間に応じて異なった変化を示したが、遅発性脳機能低下を窺わせる所見は得られなかった。一方、虚血再灌流後4日目に測定した2VOラット海馬歯状回シナプスにおける長期増強(long-term potentiation; LTP)は、偽手術群に比較して有意に抑制された。このLTP形成障害は再灌流1日目に比較して強く、虚血再灌流後の遅発性機能障害を反映していると考えられた。

エダラボンは脳保護薬として脳梗塞急性期の治療に用いられているフリーラジカルスカベンジャーである。なかでもヒドロキシラジカル(\cdot OHラジカル)に対して高い除去能を示す。再灌流直後に投与したエダラボン(10mg/kg, i.v.)は、2VOラット海馬における \cdot OHラジカル生成を抑制し、再灌流4日目でのLTP障害を改善した。このことは、虚血再灌流

直後に生成された $\cdot\text{OH}$ ラジカルが神経機能障害の引き金となり得ること、つまり、エダラボンによる $\cdot\text{OH}$ ラジカルの除去作用が本剤のLTP障害改善作用に寄与し得ることを示している。さらに、エダラボンは2VOラット海馬にみられた再灌流4日目におけるNOS isoforms発現増加を変化させた。すなわち、nNOSおよびiNOS発現を偽手術群のレベルまで回復させたのに対して、虚血再灌流障害において保護的役割を果たしていると考えられているeNOS発現をさらに増加させた。このようなエダラボンによるeNOS活性の亢進は、nNOSおよびiNOS発現の正常化とともに、虚血再灌流後のLTP形成障害の改善に寄与しているかも知れない。少なくともエダラボン処置後の3つのNOS isoformsの発現様式は、虚血再灌流障害が緩和する方向にあった。

SNO-PEG-HbはHbの β 鎖システイン残基(SH基)にNOが結合したニトロソHbで、局所組織への酸素運搬能に加えて、組織環境に応じたヘム鉄へのNO捕捉作用あるいはSH基からのNO遊離作用を持つ人工酸素運搬体である。SNO-PEG-Hbは虚血組織において酸素運搬とNO供給による血管拡張作用が期待されることから、2VOラットの海馬シナプス機能障害に対する効果を検討した。SNO-PEG-Hb (250mg/kg, i.v.)は虚血再灌流後4日目のLTP形成を投与時間依存性に改善した。すなわち、虚血再灌流直後の投与では明らかなLTP形成障害の改善がみられなかったのに対して、24時間後および48時間後の処置では改善がみられ、特に、48時間後処置群ではvehicleを処置した2VO群との間に有意差が認められた。このLTP改善効果は、SH基がニトロソ化されていないPEG-Hb (250mg/kg, i.v.)では認められず、逆に、虚血再灌流直後のPEG-Hb処置はLTP形成障害を増悪した。これはPEG-HbのNO捕捉作用によって局所脳血管が収縮し、結果として脳血流低下が生じた可能性を示している。これらの事実は、虚血再灌流直後のおそらくeNOSを介するNO産生が虚血後脳に対して保護的に働いていることを示す間接的証拠なのかもしれない。SNO-PEG-Hbがエダラボンより遅い治療時間域を示した理由は明らかではないが、虚血後発生するフリーラジカル種の動態の違いを反映しているものと思われる。

一方、2VOラットにおいて再灌流4日目に認められたVEGFとbFGFの蛋白発現増加は、再灌流直後に投与したエダラボンならびに1日目に投与したSNO-PEG-Hbいずれによっても抑制された。このように虚血再灌流誘導性の血管新生因子発現に対する抑制効果が、共通して認められたことは、虚血再灌流後に生成されたフリーラジカル種を捕捉することによって、間接的に虚血後の脳血管リモデリングの進展を予防することによって、結果としてLTP形成障害を改善したことを意味しているのかもしれない。

以上、一過性不完全脳虚血ラットについて血行動態学的、電気生理学的ならびに神経生化学的側面から多角的評価することによって、虚血再灌流後における脳機能障害の指標としての海馬歯状回シナプスLTPの有用性を明らかにした。さらに、フリーラジカルスカベンジャー・エダラボンおよびNO捕捉・供与能を有するHb修飾体SNO-PEG-Hbが、それぞれ異なった治療時間域を以って、脳虚血再灌流後の海馬LTP形成障害を改善することを明らかにした。これらの事実は、 $\cdot\text{OH}$ ラジカルやNOを含むフリーラジカルの、虚血再灌流障害における時間的に異なった役割を唆しており、エダラボンとSNO-PEG-Hbの併用も視野に入れた脳循環障害の新たな治療戦略の可能性を示唆するものと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 岡 充 弘

副 査 教 授 佐々木 秀 直

副 査 教 授 神 谷 温 之

学 位 論 文 題 名

脳虚血再灌流障害モデルラットの多角的評価と

その応用に関する研究

脳虚血再灌流に伴って産生される種々のフリーラジカルは、遅発性ニューロン死あるいは遅発性機能障害の誘因と考えられているが、その動態は複雑で病態生理学的意義を含め不明な点が多い。

本研究は脳虚血再灌流障害の適切な評価系の構築および遅発性機能障害の病態をフリーラジカル動態から明らかにすることを目的とし、海馬領域の組織学的変化を伴わない一過性不完全脳虚血モデルである 2 血管閉塞(2VO)ラットを用い、脳血流、脳波、海馬シナプス伝達を指標として、虚血再灌流後の脳機能の動的変化を検討した。また、虚血関連分子である一酸化窒素合成酵素(NOS)および血管内皮細胞増殖因子(VEGF)と塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)の蛋白発現誘導を解析した。さらに、虚血再灌流後機能障害に対するラジカルスカベンジャー・エダラボンと NO 捕捉・供与能を有するヘモグロビン修飾体(SNO-PEG-Hb)の効果を治療時間域から検討し、虚血再灌流障害とフリーラジカル動態との関連性を追究した。

大脳皮質脳血流は 2VO によって約 40%まで低下したが、再灌流 4 日後にはほぼ虚血前のレベルに回復した。大脳皮質脳波は、虚血中と再灌流直後に徐波化を認めたが、再灌流後 4 日目には虚血前へ回復する傾向を示した。このように、脳血流ならびに皮質脳波では遅発性脳機能低下を窺わせる所見は得られなかった。一方、虚血再灌流後 4 日目に測定した 2VO ラット海馬歯状回シナプスの長期増強(LTP)は、偽手術群に比較して有意に抑制された。この LTP 形成障害は再灌流 1 日目に比較して強く、虚血再灌流後の遅発性機能障害を反映していると考えられた。

エダラボンはヒドロキシラジカル($\cdot\text{OH}$ ラジカル)に対して高い除去能を示すラジカルスカベンジャーである。再灌流直後に投与したエダラボン(10mg/kg, i.v.)は、2VO ラット海馬における $\cdot\text{OH}$ ラジカル生成を抑制し、再灌流 4 日目での LTP 障害を改善した。このことは、エダラボンによる $\cdot\text{OH}$ ラジカルの除去作用が LTP 障害改善に寄与していることを示している。さらに、エダラボンは 2VO ラット海馬にみられた再灌流 4 日目における nNOS, iNOS, VEGF および bFGF 発現を偽手術群のレベルまで回復させたのに対して、保護的役割を果すと考えられている eNOS 発現をさらに増加させた。このようなエダラボンによる eNOS 発現の亢進は、nNOS および iNOS 発現の正常化とともに、虚血再灌流後の LTP 障害の改善に寄与している可能性がある。SNO-PEG-Hb は虚血組織において酸素運搬に加えて NO 供給による血管拡張作用が期待される人工酸素運搬体である。

SNO-PEG-Hb (250mg/kg, i.v.)は虚血再灌流後4日目のLTP形成を投与時間依存性に改善し、Day 2投与群では2VO群との間に有意差が認められた。NO供与能を持たないPEG-Hb (250mg/kg, i.v.)のDay 0投与は、逆に、LTP形成障害を増悪した。これはPEG-HbのNO捕捉作用によって局所脳血管が収縮し、結果として脳血流低下が生じた可能性を示している。これらの事実は、虚血再灌流直後のおそらくeNOSを介するNO産生が虚血後脳に対して保護的に働いていることを間接的に示している。SNO-PEG-Hbがエダラボンより遅い治療時間域を示したことは、虚血後発生するフリーラジカル種の動態の違いを反映しているものと思われる。

以上、2VOラットについての多角的評価から、虚血再灌流後における脳機能障害の指標としての海馬歯状回シナプスLTPの有用性が明らかになった。さらに、エダラボンおよびSNO-PEG-Hbが、それぞれ異なった治療時間域を以って、脳虚血再灌流後の海馬LTP形成障害を改善することが明らかになった。これらの事実は、フリーラジカル種の、虚血再灌流障害における時間的に異なった役割を示唆しており、エダラボンとSNO-PEG-Hbの併用も視野に入れた脳循環障害の新たな治療戦略の可能性を示すものと考えられる。

公開発表後、副査佐々木秀直教授からHb修飾体とエダラボンの効果発現の時間的な差異ならびにエダラボンによるNOS isoforms抑制のパターンの違いについて、また、副査神谷温之教授から2VOによるLTP障害のメカニズムとSNO-PEG-Hbの臨床応用に際しての副作用について質問がなされた。さらに、主査吉岡充弘教授からは、現在の脳梗塞に対する治療戦略としてのエダラボンの有用性ならびにエダラボンとSNO-PEG-Hb併用治療の可能性について質問がなされた。これらに対して申請者は、実験成績と過去の文献を引用し、概ね適切に回答した。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。