

## 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 栗栖 宏多

### 学位論文題名

脳梗塞急性期治療としての経動脈的局所脳低温による神経保護作用の研究  
(Studies of neuroprotective effect of trans-arterial regional hypothermia on ischemic stroke)

【背景と目的】脳主幹動脈閉塞による脳梗塞に対して、血栓溶解療法や血管内血栓除去療法が有効な治療として行われているが、虚血再灌流傷害(Ischemia-reperfusion injury, I-R injury)は残された重要な問題である。この I/R injury に対する脳保護療法として様々な研究が行われてきた。「低体温治療」は強い脳保護作用を有する治療で、蘇生後脳症・重傷頭部外傷などに対してはすでに臨床応用されているが、脳梗塞に対する臨床研究ではその有効性を示せていない。原因として低体温による全身への影響が重大な弊害となっていることが考察されている。そこで経動脈的局所脳低温(trans-arterial regional hypothermia)という新規治療概念が提唱された。これは、冷却生理食塩液を経動脈的に灌流し、局所脳を選択的に低温化し脳保護効果を期待するもので、本治療は容易に臨床応用可能で安全性も高く、世界的にも期待されている新規急性期脳梗塞治療法である。しかし、その作用機序については未だ十分に解明されてはいない。

今回我々はこの経動脈的局所脳低温の脳保護作用に関する研究を行った。まず、その神経保護作用と抗炎症作用を確認し、次いで作用機序解明を試みた。I/R injury 後には、脳微小血管周囲に裏打ちするように存在する Astrocytic end-foot 膨化(swelling)とそれに伴う血管の物理的圧迫による微小血管内腔狭小化(microvascular narrowing)が一時的に生じることが報告されている。本研究では、この現象を観察・検討することとした。さらに、その原因として細胞膜に存在する水分子トランスポーターのアクアポリン 4(Aquaporin-4, AQP4)の関与についても検討した。AQP4 は中枢神経の Astrocytic end-foot に集中して存在し、細胞内外への水輸送を調節し局所浮腫形成に関与していることが知られており、本研究において検討するに値する分子と考えられた。

また、経動脈的局所脳低温の臨床的汎用性を検討するため、過去の研究報告とは異なる脳梗塞モデルである partial reperfusion injury モデルラットを用い、その効果を検討した。

【対象と方法】糸栓子による一過性中大脳動脈閉塞(transient MCAO)モデルラットに対する経動脈的局所脳低温の神経保護作用と抗炎症作用を検討した。2 時間虚血後、内頸動脈から動物用カテーテルを挿入し、冷却した生理食塩液(20ml/kg)を経動脈的に 15 分間かけて灌流し経動脈的局所脳低温を実施した(Cold saline (CS)群)。Control 群では通常の再灌流のみを行い、Warm saline(WS)群では 37°C の生理食塩液を同様の方法で灌流した。I/R injury 24hr 後に脳を摘出して神経症状、脳梗塞・浮腫体積、血液脳関門(Blood brain barrier, BBB)破綻の評価を行った。また、Western blotting(WB)・免疫組織染色(Immunohistochemistry, IHC)を行い炎症関連因子(Intracellular adhesion molecule 1 (ICAM1), myeloperoxidase (MPO), matrix metalloproteinase 9 (MMP9), ionized calcium binding adapter molecule 1 (Iba1))の発現も定量的に評価した。

次いで、その作用機序解明のために I/R injury 0hr 後、2hr 後、6hr 後、24hr 後の時点でラットを sacrifice し、神経保護効果、各炎症関連因子の経時的変化を観察した。各時相での微小血管の形態学的変化(microvascular narrowing, astrocytic end-foot swelling)は抗 von Willebrand factor (vWF)抗体による IHC と電子顕微鏡(transmission electron

microscopy、TEM)で行い、各時相での AQP4 発現の検討は IHC により行った。

partial reperfusion injury モデルに対する治療効果の検討には craniotomy MCAO モデルラットを使用した。治療介入遅滞の影響も検討すべく、MCAO 手術後早期に治療を行う群(early CS (eCS)群)と、遅れて治療を行う群(delayed CS (dCS)群)を分けて作成し、ラットを 5 群(eCS 群、eWS 群、dCS 群、dWS 群、control 群)に分類した。MCAO48hr 後の脳保護効果(神経症状・脳梗塞・浮腫体積)を検討した。加えて、抗 cleaved caspase 3 (CC3)抗体 + 抗 NeuN 抗体による二重蛍光免疫組織染色(fluorescent IHC、fIHC)で神経細胞死(neuronal apoptosis)への作用を検討し、抗 glial fibrillary acidic protein(GFAP)抗体と抗 Iba1 抗体の fIHC で反応性神経膠症(reactive gliosis)への作用も検討した。

【結果】経動脈的局所脳低温によって有意な脳温の低下は速やかにもたらされ、効果は 45 分間程持続した。CS 群では control・WS 群と比較し I/R injury24hr 後の有意な神経症状改善、脳梗塞・浮腫体積縮小、BBB 破綻抑制を認めた。炎症反応関連因子に関しても、CS 群で control・WS 群と比較し有意な ICAM1・MPO・MMP9・Iba1 の発現抑制を認めた。I/R injury 後の経時的変化の観察によると、治療による有意な脳保護作用(脳梗塞・浮腫体積の縮小、BB 破綻抑制)は I/R injury 6hr 後からすでもたらされていた。炎症反応関連因子は、control 群では ICAM1 の有意な発現亢進を 6hr 後より認め、24hr 後になると MPO・MMP9・Iba1 の有意な発現亢進を認めるようになった。CS 群ではこれらは全て有意に抑制されていた。微小血管の形態学的変化は、control 群では血管内腔が I/R injury 2hr 後、6hr 後と進行性に狭小化(microvascular narrowing)していたが、CS 群ではこの現象は有意に抑制されていた。血管周囲の間隙を示す perivascular halo は、control 群では I/R injury 2hr 後から 24hr 後に至るまで有意な拡大を認めたが、CS 群ではこの現象は有意に抑制されていた。TEM では、perivascular halo に一致した astrocytic end-foot swelling と、この物理的圧迫による microvascular narrowing を確認でき、CS 群でのこの抑制作用も確認可能であった。AQP4 の発現は、control 群で I/R injury 2h 後に一過性の有意な発現亢進(acute AQP4 surge)を認めたが、CS 群ではこれが有意に抑制されていた。

partial reperfusion injury モデルに対する経動脈的局所脳低温の実験では、eCS 群・dCS 群において有意な神経症状改善、脳梗塞・浮腫体積縮小を認めた。また、eCS 群・dCS 群では control・WS 群と比較し、有意な neuronal apoptosis 抑制効果と reactive gliosis 抑制効果を認めた。eCS 群と dCS 群の比較では治療効果に有意差を認めた。

【考察】経動脈的局所脳低温は I/R injury に対して強い神経保護作用(神経症状改善、脳梗塞・浮腫縮小、BBB 破綻の軽減など)を有していることが確認できた。本研究では炎症反応・脳微小血管の形態学的変化・AQP4 の発現などの I/R injury 後に起きる多様な反応の経時的変化を観察した。その結果、I/R injury 2hr 後の acute AQP4 surge は検討したすべての現象に先んじて現われており、経動脈的局所脳低温はこれを抑えることで一連の反応を抑制している可能性があると考えられた。また、本研究では経動脈的局所脳低温が partial reperfusion injury モデルに対しても強い神経保護作用をもたらすことを明らかにした。partial reperfusion injury モデルは実臨床をより反映したモデルであり、本研究結果はその臨床応用に向けた広い汎用性を示唆するものであった。

本治療の特徴・利点として、短時間・緩やかな脳冷却効果にも関わらず、強固な脳保護作用をもたらすことが挙げられる。これは脳微小血管内皮細胞を直接的かつ重点的に冷却するという本治療に特徴的な冷却システムに起因するものと考えられた。しかし本治療をヒトへ臨床応用するに当たっては更なる研究が必要であろう。

【結論】経動脈的局所脳低温は多様な作用機序を介して強固な脳保護作用をもたらす魅力的な治療であり、脳梗塞急性期治療の新たな選択肢になり得る。適切な臨床応用に向けて、今後更なる研究が望まれる。