HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	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［全文の要約］
Author(s)	栗栖, 宏多
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。　配架番号：2206 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12102号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/61796
Type	doctoral thesis
File Information	Kota_Kurisu_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文（要約）

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)

２０１６年　３月
北 海 道 大 学
栗 栖　宏 多

学　位　論　文（要約）

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)

２０１６年　３月
北 海 道 大 学
栗 栖　宏 多

緒　言

脳主幹動脈閉塞による脳梗塞は、重度の神経障害を引き起こし、致死的な経過を辿る可能性のある重篤な病態である。治療においては、発症後速やかに閉塞血管を再開通させ虚血脳への血液供給を回復せしめることが肝要であり、血栓溶解療法、血管内血栓除去療法が臨床で行われている。しかし、この再開通療法の有効性は、発症から治療までの時間(therapeutic time window)に依存しており、再開通までに時間がかかると虚血再灌流傷害(Ischemia-reperfusion injury: I/R injury)のために予後不良となってしまうことが知られている。
従来より、脳保護療法として様々な研究がなされてきたが、「低体温治療」はその代表的なものである。多くの研究で多様な中枢神経傷害（脳梗塞・脳出血・くも膜下出血・神経外傷など）において神経保護作用を有することが証明されてきた。しかし脳梗塞に対しては、動物実験レベルでは神経保護作用を認めるものの、大規模臨床試験においてはその有効性を示すことが出来ていない。この原因は、低体温治療による全身への様々な影響によると考察される。そこで想起されたのが、経動脈的局所脳低温治療(trans-arterial regional hypothermia)である。本治療は、冷却灌流液を経動脈的に流入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ある。本治療は臨床応用を考慮した場合、安全で容易に実現可能で、高く注目されている。
今回我々はこの経動脈的局所脳低温療法を研究主題とした。本研究では、まず、経動脈的局所脳低温療法の作用機序を明らかするために、脳微小血管レベルでの血管反応に焦点を絞って検討を行った。ラットの一過性脳虚血モデルを用いて、脳微小血管の微細な形態変化を電子顕微鏡(transmission electron microscopy: TEM)で観察し、また、分子発現などの機能的変化を分子生物学的・免疫組織学的な手法を用いて検討した。次いで、本治療法の有効性が一過性脳虚血だけではなく永続性脳虚血でも期待できるのかを明らかにするために、ラットの partial reperfusion injury モデルを使用しその神経保護効果を検討した。

第　一　章

虚血再灌流傷害に対する経動脈的局所脳低温治療の神経保護作用

【緒言】

経動脈的局所脳低温治療は、実臨床への応用が期待される新規的な治療法である。本章では、まず経動脈的局所脳低温の I/R injury モデルラットに対する脳冷却効果や神経保護作用を確認することを目的とした。また、その神経保護作用には抗炎症作用が重要な役割を果たすという報告が散見されたので、本研究でもその抗炎症作用を検証することとした。

【結果】

1）経動脈的局所低脳温による脳冷却効果

経動脈的局所脳低温により有意な脳冷却効果(約 2℃)は治療後 30 分間、すなわち治療開始から 45 分間持続した。直腸温の有意な変化は認めなかった。

2）生理学的パラメーターに与える影響

治療によって各群ラット間で生理学的パラメーターの有意差は認めなかった。

3）神経症状

I/R injury 24 時間後の 18-point neurological scoring scale を用いた神経症状評価では、経動脈的局所脳低温治療によって有意な神経症状の改善を認めた。

4）脳梗塞、脳浮腫体積

I/R injury 24 時間後の TTC 染色の結果では、経動脈的局所低温治療群において有意な脳梗塞・脳浮腫体積の縮小効果を認めた。

5)血液脳関門(Blood Brain Barrier; BBB)の破綻

経動脈的局所脳低温治療群では他群と比較してエバンスブルー(Evans Blue; EB)色素の脳内への漏出量が少なく BBB の破綻は有意に抑制されていた。

6）抗炎症作用

I/R injury 24 時間後、各炎症反応関連因子(myeloperoxidase (MPO), intercellular adhesion molecule 1(ICAM1), matrix metalloproteinase 9 (MMP9), ionized calcium binding adapter molecule 1 (Iba1))の免疫染色(Immunohistochemistry; IHC)、ウェスタンブロッティング(Western blotting; WB)を行った。

MPO の IHC 及び WB では、脳内に浸潤している好中球の発現が治療群で有意に抑制されているのを認めた。ICAM1 の発現、MMP9 の発現も、治療群では有意に抑制されていた。Iba-1 の IHC では、治療による有意なミクログリア活

性化抑制を認めた。

【考　察】

本章の実験では経動脈的局所脳低温治療の脳冷却効果と、それによる神経保護作用・抗炎症作用を検証した。15 分の冷却(10℃)生理食塩液の潅流によって、30 分から 45 分にわたるラット脳冷却効果(約 2℃)を認めた。この作用により、I/R injury 後に起こる神経症状の悪化、脳梗塞・脳浮腫形成は抑制されていた。これは、過去の報告と相違ない結果であった。

また、経動脈的局所低能温の作用機序に言及した報告では、抗炎症作用が重要であると報告されている。我々の結果でも I/R injury 24 時間後に起こる ICAM1 の発現、好中球の脳内浸潤、ミクログリア活性化、MMP9 産生などといった炎症関連因子の有意な抑制効果を、既報告と同様に認めた。

第二章

脳微小血管レベルでの血管反応に焦点を当てた経動脈的局所脳低温治療の作用機序の解明

【緒言】

経動脈的局所脳低温の作用機序に関しては、まだ不明な点が多い。第一章で我々が研究題材とした抗炎症作用以外の作用機序に迫った報告は無い。

我々は、本治療が著明に強固な神経保護作用をもたらす理由として、I/R injury 後生じる一連の反応の上流（超急性期の現象）を抑制している可能性を考察した。そこで、経動脈的局所脳低温により最も早く冷却作用を受ける脳微小血管レベルでの血管反応に焦点を当てて検討することとした。特に経時的な検討により、血管反応の動態を明らかにし、神経保護効果の機序解明につなげることを考えた。

本研究では、微小血管での形態変化を光顕レベルでの定量的検討と電子顕微鏡による微細構造観察で行うこととした。虚血再灌流における電子顕微鏡での検討については、微小血管周囲に裏打ちするように存在するアストロサイト終足の膨化が血管の物理的圧迫による微小血管内腔狭小化を引き起こすとされている。我々は経動脈的局所脳低温治療が、このアストロサイト終足の膨化と微小血管内腔狭小化に与える影響を検討することとした。加えて、アストロサイト終足の膨化の原因として、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)の関与を検討することとした。AQP4 は中枢神経でアストロサイト終足に集中して分布し、細胞内外への水の移動を調節していることが最近発見・報告されたためである。

【実験結果】

1) 梗塞・浮腫体積、BBB 破綻の経時的変化

I/R injury 0 時間、2 時間、6 時間、24 時間において脳梗塞体積と浮腫体積の経時的変化を観察した。持続する脳梗塞体積と浮腫体積の増加がコントロール群で認められたが、治療群ではこの進行は抑制されていた。統計学的有意差は梗塞体積・浮腫体積ともに I/R injury 6 時間後の時点で認められた。

BBB 破綻も control 群では I/R injury 6 時間後の時点から顕著となったが、治療群ではそれは有意に抑制されていた。

2) 炎症反応の経時的変化

ICAM1、MPO、MMP9 、Iba1 の発現の経時的変化を観察した。ICAM1 の発現は I/R injury 6 時間後より有意に亢進し、24 時間後まで亢進持続していたが、これは治療群で有意に抑制されていた。MPO と MMP9 の発現亢進は I/R injury 24 時間後になると出現し、これも治療群で有意に抑制されていた。ミクログリア活性化も 24 時間後に有意に上昇していたが、治療群ではこれも有意に抑制していた。

以上より、I/R injury による炎症反応の進行は、内皮細胞障害による ICAM1 発現が先んじて生じ、この接着因子発現を介して好中球の脳内浸潤、MMP9 産生、ミクログリア活性化など一連の炎症反応が惹起・進行するものと考えられた。また、局所脳低温はこれら炎症反応の惹起・進行を全て抑制していた。

3) 微小血管の形態学的な経時的変化

微小血管の形態学的な変化については、IHC で定量的評価を行い、TEM で微細構造の観察を行った。微小血管内腔径は、コントロール群では 0 時間(5.1±2.1μm)と比較して 2 時間（4.5±2.3μm)、6 時間(3.2±1.8μm)と狭小化の有意な進行を認めた。治療群ではこの変化は有意に抑制され、コントロール群と比較すると 2 時間、6 時間で微小血管内腔径は有意に保たれていた。

また微小血管の周囲に認めた perivascular halo は、コントロール群では 2 時間から 24 時間に至るまで有意な拡大を認めた。この現象は、治療群においては、すべての時相(2~24 時間 I/R injury 後)で有意に抑制されていた。

同部位の TEM による微細構造観察においては、IHC で perivascular halo と認識されていた部位には、膜構造や細胞質内顆粒と思われる構造物が存在しており、これは微小血管を取り囲んで存在しているアストロサイト終足が局所的に膨化したものと確認できた。経時的な変化を観察すると、IHC での所見と同様

にアストロサイト終足の膨化は I/R injury 後 2 時間~24 時間の間認められ、6 時間でピークとなっていた。この時相では、物理的な圧迫による顕著な微小血管内腔狭小化も確認可能であった。

4) AQP4 発現の経時的変化

AQP4 は血管内皮細胞上に恒常的に発現していたが、I/R injury 2 時間後の時点ではコントロール群で発現亢進を認めた。治療群ではこの反応は認められず有意な AQP4 発現抑制効果を認めた。

【考察】

今回、我々は経動脈的局所脳低温による分子生物学的な作用機序を解明するため、様々な側面から I/R injury 後に起きる反応の経時的変化を観察し多くの情報を得た。

今回の実験結果では好中球の脳内浸潤、ミクログリアの活性化、MMP9 産生に代表される炎症反応亢進は I/R injury 24 時間後の時点で賦活化されていた。しかし、脳梗塞・浮腫の出現・進行、血管内皮細胞傷害(ICAM1 の発現、BBB 破綻)は I/R injury 6 時間後から出現しており、経動脈的局所脳低温は I/R injury 6 時間後の時点においてすでに有意な治療効果をもたらしていた。このことから、本治療作用機序には抗炎症反応以外の機序が存在することが示唆された。

I/R injury 後早期に起こる事象として、アストロサイト終足の膨化とそれによる微小血管内腔狭小化を I/R injury 6 時間後に認めた。この微小血管内腔狭小化は再灌流後の 2 次性脳血流減少を引き起こし、脳傷害を助長している可能性がある。

また、今回の結果では AQP4 の I/R injury 2 時間後の発現亢進(acute AQP4 surge)を認めた。この超急性期の AQP4 発現亢進がアストロサイト終足の膨化に先んじて起きていたことに加えて、AQP4 の役割（水分子の細胞内取り込み促進）とその特徴的な分布(アストロサイト終足に主に存在)から、超急性期の AQP4 発現亢進が I/R injury 後の一連の反応の上流にあるものの可能性があると考えられた。

第三章

経動脈的局所脳低温による異なる脳梗塞モデルに対する治療効果

【緒言】

経動脈的局所脳低温が I/R injury に著明な神経保護作用を示すのは上述の如く

である。
しかし経動脈的局所脳低温に関する過去に行われてきた基礎実験は、すべて一過性中大脳動脈閉塞(transient middle cerebral artery occlusion; tMCAO)モデルラットを使用したもので、異なる脳梗塞モデルに対するその治療効果を検討した報告はない。
実臨床では、当然のことながら脳梗塞の病態は多岐にわたる。そこで、本章ではこれまでと異なる脳梗塞モデルとして craniotomy middle cerebral artery occlusion (MCAO)モデルラットを使用して経動脈的局所脳低温の有効性を検討することとした。
さらに、分子生物学的作用機序検討として新たに脳虚血性傷害後に生じる神経細胞死(neuronal apoptosis)と反応性神経膠症(reactive gliosis)への経動脈的局所脳低温の作用も検討した。

【実験結果】

1) 神経症状

18-point neurological scoring scale 用いた神経症状評価では、治療群で有意な神経症状改善を認めた。

2) 脳梗塞、脳浮腫体積

治療介入群において有意な脳梗塞体積の縮小を認めた。治療群の中でもより早期に治療介入した群の方が有意な梗塞体積縮小効果を認めた。脳浮腫体積は治療によって有意な抑制作用を認めた。

3) Neuronal Apoptosis

ischemic core 領域では neuronal apoptosis に治療による明らかな影響は認めなかったが、penumbra 領域では治療によって apoptosis 陽性細胞の発現抑制と、生存神経細胞の保護を認めた。このことから経動脈的局所脳低温治療は penumbra 領域での neuronal apoptosis を抑制することが示唆された。

4) Reactive gliosis

penumbra 領域で治療介入群においては glial fibrillary acidic protein (GFAP) 発現亢進、Iba1 発現亢進が有意に抑制されていた。経動脈的局所脳低温は penumbra 領域でのアストロサイト活性化・ミクログリア活性化を抑制していた。

【考察】

これまでの基礎研究で用いられてきた tMCAO モデルは I/R injury を模す代表的な脳梗塞モデルであり、虚血脳組織への完全な再開通を再現できる。しかし、実臨床では閉塞血管再開通を目指した適切な治療を行ったとしても、虚血領域

の完全なる再灌流を得られるケースは多くない。大半の患者は部分再開通状態(partial reperfusion)で治療を終える。今回我々が使用した craniotomy MCAO モデルラットも代表的な脳梗塞モデルであり、MCA 遠位部の永久閉塞(permanent MCAO, pMCAO)と両側総頚動脈の一時閉塞を組み合わせたもので、partial reperfusion injury モデルとも呼ばれている。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、強固な神経保護作用を有することを示し、本治療の臨床的な広い汎用性を示唆した。
また本研究では経動脈的局所脳低温による神経細胞死と反応性神経膠症への作用を検討した。現在のところ、前章で認めた AQP4 抑制作用や抗炎症作用との関連の詳細は不明であるが、penumbra 領域でのこれらの抑制も経動脈的局所脳低温の脳保護作用における重要な現象であると考えられた。

考　察

本研究では、経動脈的局所脳低温による I/R injury に対する強い神経保護作用を証明し、その作用機序として超急性期 AQP4 発現亢進の関与と、それに伴うアストロサイト終足の膨化、微小血管内腔狭小化の関与を示した。加えて、この治療が部分再灌流傷害に対しても有効であることも証明した。

本治療は、血管内治療によるアプローチで実施可能で、冷却した生理食塩液を使用するのみで治療できるため、比較的容易に臨床応用にトランスレーション出来る可能性は高いと考えられる。我々の今回の検討においてその神経保護作用は確実で強固なものであることが示され、脳梗塞治療の新たなブレークスルーとなり得るものと考えている。

この強い神経保護作用を考察した場合、全身低体温治療とは異なる作用が考察される。全身低体温治療によって強い神経保護作用を得るためには十分な時間(duration)と深度(depth)の全身冷却を要する。しかし、本治療は短時間の軽微な脳冷却で、著明な神経保護作用をもたらしていた。この全身低体温とは異なる点は、その異なる冷却システムによって説明可能と考えられた。経動脈的局所脳低温はまず脳微小血管から冷却効果を脳実質へと波及させる。治療によって、血管内皮細胞やその周囲構造物が冷却される。この血管内皮細胞を中心とした、直接的かつ集中的で速やかな冷却がより強固な神経保護作用をもたらす要因の一つであると考えられた。

本研究はラットを使用した実験でありこの研究結果がそのままヒトに反映されるかはまだ検討されていない。動物種によって虚血性中枢神経傷害は異なる反応を示すことが知られており、異なる動物種を用いた更なる基礎研究データの蓄積が必要であろう。

総括および結論

本研究によって以下の新たな知見が得られた。

1) 経動脈的局所脳低温は速やかで効果的な局所脳冷却を実現し、I/R injury に対して強固な神経保護作用（神経症状改善、脳梗塞・浮腫縮小、BBB 破綻の軽減など） をもたらす。

2) 本治療の重要な作用機序として、抗炎症作用だけでなく、微小血管での AQP4 発現抑制効果や引き続いて起こるアストロサイト終足の膨化、微小血管内腔狭小化抑制効果を認める。

3) また、本治療は閉塞血管再開通治療後の部分再開通状態を模す脳梗塞モデルに対しても神経細胞死抑制や反応性神経膠症抑制を介した強い神経保護作用を有する。

以上の知見から、経動脈的局所脳低温は実現可能性・治療有効性ともに高い治療であり今後の急性期脳梗塞の新たな選択肢になり得ると考えられた。さらに詳細な新規作用機序の解明や、臨床応用に向けたデータ収集のための基礎研究の蓄積が望まれる。

【実験方法】

1）Ischemia Reperfusion injury モデルラット

すべての実験は北海道大学動物実験に関する規定に従って実施した。
実験動物は 6-8 週齢の Sprague-Dawley (SD)ラットで、体重 240~310g のものを使用した。一過性中大脳動脈閉塞の方法は糸栓子を使用した方法(intra-luminal suture method)で行った。

2）partial reperfusion injury (Craniotomy MCAO) モデルラット

ラットは右眼及び右耳の中間に垂直に 1.5cm 程の皮膚切開を行い、側頭筋を側頭骨より剥離しデンタルドリルを使用して約 5×5mm の側頭開頭を行った。開頭後、硬膜上から MCA を透見し視認した。硬膜上から 10-0nylon 糸で MCA 本幹を結紮し切断し MCA の永久閉塞を完成させた。その後、両側頚動脈遮断を 1 時間行った。

3）経動脈的局所脳低温(trans-arterial regional hypothermia)

経動脈的局所脳低温は虚血側内頚動脈に冷却生理食塩液を灌流して実施した。小動物用カテーテル PE 50 catheter (brck LTD, Tokyo, Japan)を外頚動脈の小孔から挿入し、内頚動脈まで誘導し、冷却生理食塩液を持続投与した。

4）神経症状

Bederson score grade と 18-point neurological scale score を用いて神経症状評価を行った。

5）脳梗塞、浮腫体積

脳梗塞・浮腫体積は 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC; Sigma-Aldrich Chemice GmbH, Buchs, Switzerland)による染色で評価した。

6）脳血液関門（Blood Brain Barrier、BBB）破綻の評価

EB 色素の脳内漏出を定量的に評価し BBB 破綻の検討を行った。

7）免疫染色(Immunohistochemistry、IHC)

4%パラホルムアルデヒドで潅流固定後、2 日間の浸透固定を行った摘出脳サンプルをスライスし、2mm 厚の冠状切片とした。これをパラフィン包埋して線条体レベルで 4μm の薄切切片を作成した。各切片をキシレンに 30 分間浸し、パラフィン除去を行った。pH6.0 クエン酸緩衝液を加熱沸騰させ、切片を投じ 2 分間の加熱処置による抗原賦活を行った。10%正常ヤギ血清にて Blocking 後、各種一次抗体を使用し、室温 1 時間で反応させた。2 次抗体反応はエンビジョンポリマー試薬(Dako, Glostrup, Denmark)を室温 1 時間で反応させた。DAB による発色には Dako Real DAB+Chromogen(Dako, Glostrup, Denmark)にて行い、ヘマトキシリン染色を行った。

8）Western blotting (WB)

患側大脳を RIPA lysis buffer (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA,

USA)を使用し homogenize し、遠心分離した上清を保存してタンパク質抽出を行った。抽出したタンパク質 10μg を、泳動用ゲル(NuPage 4-12% Bis－Tris Gel (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA))を使用して 200mV、35 分間の電気泳動を行った。ゲルはニトロセルロース膜に転写した。膜は 5%bovine serum albumin (BSA)で室温 1 時間のブロッキングを行い、1 次抗体反応は 4℃ over night で行った。その後、Horse Radish Peroxidase (HRP)標識 2 次抗体(1:10000, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA)と反応させた。標識されたタンパク質は化学反応(ECL detection kit; GE Healthcare, Piscataway, NJ)による検出を行い lumino image analyzer で撮影した。検出されたタンパク質のバンドは Image J soft ware を用いて定量化し、内在性コントロールタンパクβ-actin と比較した。

9) 蛍光免疫染色(Fluorescent Immunohistochemistry、FIHC)

4%パラホルムアルデヒドで潅流固定後、2 日間の浸透固定を行った摘出脳サンプルをスライスし、2mm 厚の coronal 切片とした。これをパラフィン包埋して線条体レベルで 4μm の薄切切片を作成し FIHC を行った。

各切片をキシレンに 30 分間浸し、パラフィン除去を行った。pH6.0 クエン酸緩衝液を加熱沸騰させ、切片を投じ 2 分間の加熱処置による抗原賦活を行った。切片は 10%正常ヤギ血清にて Blocking した。

一次抗体は室温で 1 時間反応させた。二次抗体として、Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:200, life technologies, Carlsbad, CA, USA) および Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG (1:200, life technologies)を室温で 1 時間反応させた。これらの後、すべての切片は 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland)による核染色を行い封入した。

10)統計学的解析

データは、mean±SD で表した。2 群間の比較には two-tailed Student's t-test を用い、3 群間以上の比較には one-way analysis of variance と Bonferoni's test を用い、$p<0.05$ を統計学的に有意とした。

謝　辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会をくださいました北海道大学大学院医学研究科脳神経外科学分野　寶金清博教授に謝意を表します。併せて本研究全般にわたり、直接ご指導・ご鞭撻を賜りました北海道大学大学院医学研究科脳神経外科学分野　鐙谷武雄助教に深く感謝いたします。
また、電子顕微鏡による解析にご協力をいただいた北海道大学大学院医学研究科皮膚科学分野　清水宏教授、北海道大学大学院医学研究科医歯学総合研究棟中央研究部門　中村秀樹助手に深く感謝いたします。
最後に、本研究にご協力いただきました四戸由美子実験助手、長島里香実験助手、その他の脳神経外科教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。