



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	新規人工酸素運搬体HemoActを用いた脳虚血再灌流障害治療開発に関する研究 [全文の要約]
Author(s)	月花, 正幸
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：2378 他
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12999号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70400
Type	doctoral thesis
File Information	Masayuki_Gekka_summary.pdf



学 位 論 文 の 要 約

新規人工酸素運搬体 HemoAct を用いた
脳虚血再灌流障害治療開発に関する研究
(**Studies on neuroprotective therapy for cerebral
ischemic-reperfusion injury using HemoAct**)

2018 年 3 月
北 海 道 大 学
月花 正幸

学 位 論 文の要約

新規人工酸素運搬体 HemoAct を用いた
脳虚血再灌流障害治療開発に関する研究
(**Studies on neuroprotective therapy for cerebral
ischemic-reperfusion injury using HemoAct**)

2018 年 3 月
北 海 道 大 学
月花 正幸

【背景】

近年、主幹動脈閉塞を伴う重症脳虚血症例に対して、tPA 静注療法・血管内血栓除去療法が積極的に行われており非常に高い閉塞血管再開通率を獲得している。しかし、再開通が得られても虚血再灌流障害によって著名な脳浮腫、出血性梗塞を来し予後不良となる症例は少なくない。この軽減目的で脳保護療法薬としてエダラボンが臨床の現場において使用されているが、脳虚血再灌流障害を抑えきれない現状がある。我々は以前より、人工酸素運搬体が脳虚血再灌流障害に有効であることを報告している。ヘモグロビンを基剤とする人口酸素運搬体のうち、ヘモグロビンを赤血球の 1/40 の大きさの liposome 内に封入した liposome-encapsulated hemoglobin (LEH) は、酸素運搬能の高さにより、脳虚血動物モデルにおいて静脈投与により脳保護効果があることが報告されている。我々はラット脳虚血再灌流モデルを用い、閉塞血管再開通後の内頸動脈にカニューレーションをして再灌流領域にこの LEH を選択的に投与することにより、酸素投与の目的のみならず、炎症反応を惹起する白血球の物理的流入を抑制して虚血再灌流傷害を改善することを検討した。その結果、LEH の経動脈的投与は、白血球の再灌流領域への流入を抑制し、径がより小さい微小血管 (5 μ m 以下) へも効果的に酸素を運搬し、脳保護効果を示すことがわかった。当該研究では、従来、我々の研究で使用してきた LEH ではなく、新たな人工酸素運搬体としてヘモグロビン-アルブミン複合体の HemoAct™を用いて研究を行った。HemoAct は、ヘモグロビン 1 分子とヒトアルブミン 3 分子がクラスター構造となった人工酸素運搬体であり、動物投与実験で生体内動態、半減期、安全性についての検討はされているが、虚血疾患モデル動物に対しての治療研究はなく今回が初めての検討となる。HemoAct は粒径 10nm と赤血球の 1/800 と小さく、微細粒子であることでの良好な微小循環酸素運搬能が期待できる。またアルブミンによる循環血漿量増加作用や抗酸化作用が期待され、内径の小さい微小血管においても良好な灌流状態を維持する能力や再酸素化による過酸素状態の参加ストレスを軽減することが期待される。特に微小循環障害が本態である脳虚血再灌流障害において、より強い脳保護効果を発揮しうるものと期待される。学位論文では、脳虚血再灌流障害の治療法開発のため、新規の人工酸素運搬体 HemoAct の効果を in vivo と in vitro の両方の系を用いて調査している。実験では、糸栓子法で作成した脳虚血再灌流モデルラットに HemoAct を経動脈的に投与し、その神経保護効果を検討するとともに、再灌流後の微小血流動態への影響を組織学的に調べた。また、ラット脳微小血管内皮細胞に低酸素・再酸素化処理を行い、HemoAct の効果を検討した。

【目的】

脳虚血再灌流ラットモデルにおいて、再灌流時に HemoAct を再開通動脈に灌流し、I/R injury に対する脳保護効果を検討した。次いで再灌流急性期に微小血管灌流における HemoAct の局在・酸素運搬能・微小血管の形態変化を検討し、脳虚血再灌流障害急性期の病態解明と HemoAct を用いた新規治療法を開発することを目的とする。また、ラット脳微小血管内皮細胞 (Rat brain microvascular endothelial cells, RBMECs) を低酸素再酸素化処理し、細胞レベル虚血再灌流モデルに対して HemoAct を投与することにより、その活性酸素産生量を評価

し In Vitro での HemoAct の効果を検討した。

【対象・方法】

In Vivo の実験として、雄 SD ラット(7-8 週齢)で糸栓子による一過性中大脳動脈閉塞モデル (tMCAO) を作成した。右総頸動脈・内頸動脈・外頸動脈を露出し外頸動脈から内頸動脈側に向けて糸栓子 (4-0 ナイロン糸にシリコンコートしたもの) を挿入・留置し、中大脳動脈領域の血流を 2 時間遮断した。2 時間遮断後、以下の 4 群に分類してそれぞれの検討項目につき比較検討を行った。①HemoAct 群 (n=7) : 再灌流後内頸動脈より選択的に HemoAct(37°C, 2ml/5min)を投与する群、②50%HemoAct 群(n=7) : PBS にて 2 倍希釈した HemoAct (37°C, 2ml/5min) を投与する群、③Vehicle 群(n=7) : PBS (37°C, 2ml/5min)、④Control 群(n=8) : 再灌流のみの群である。再灌流 24 時間後に 18 point scale で神経症状を評価、sacrifice して TTC 染色で脳梗塞、脳浮腫の範囲を評価、Western blotting にて MMP-9 の発現、活性酸素の産生(4-HNE)を検討し微小血管に関わる炎症変化の免疫組織学的定量及び活性酸素産生量測定をした。また、再灌流後 0、2、6 時間の時点で sacrifice し、微小血管の経時的変化(vWF の免疫染色と電子顕微鏡による評価)、微小血管内における HemoAct の局在(ヒトアルブミン抗体による免疫染色による評価)、脳組織酸素分圧の経時的変化(酸素電極刺入型の組織酸素分圧測定装置による評価)を検討した。

In Vitro の実験として、RBMECs を低酸素ワークステーション内 (1% O₂, 5% CO₂, 94% N₂ at 37°C) で 2 時間低酸素負荷した後に、再酸素化した際に HemoAct を投与群、Hb 投与群、20% アルブミン投与群、何も投与しない群の 4 群に振り分け、再酸素化 6 時間後に DHE 産生量を比較した。

【結果】

In vivo 実験 : 再灌流 24 時間後の検討では、神経症状は HemoAct 群で他の 3 群に対して有意に良好であった (p<0.05)。脳梗塞/脳浮腫の範囲は、Control 群 : 55.2%/26.4%・Vehicle 群 : 53.2%/27.1%・50%HemoAct 群 : 27.1%/15.2%・HemoAct 群 : 20.2%/14.1%で、脳梗塞 (P<0.01) 脳浮腫 (P<0.05) とともに HemoAct 群で Control 群に対して有意に小さかった。MMP-9 の発現・活性酸素の産生 (P<0.05) も HemoAct 群で有意に抑制された。虚血再灌流急性期 (2 時間後、6 時間後) の検討では、虚血再灌流域の脳皮質の CBF 及び脳組織分圧では、Control 群は、再灌流 2 時間後から徐々に CBF・PtO₂ の低下を来し、再灌流 6 時間後には大幅に CBF・PtO₂ の低下を来した。HemoAct 群では、再灌流 2 時間後・6 時間後と、CBF・PtO₂ が維持されていた。また、HemoAct 群では Control 群に対して、再灌流 6 時間の時点で見られるはずの微小血管狭小化が抑制 (P<0.05) され、5μm 以下の微小血管で HemoAct がより多く灌流しているのが確認された。HemoAct 2 時間後及び 6 時間後の微小血管内での HemoAct の局在が確認でき、虚血再灌流域の微小血管灌流において有効な灌流を来していることがわかった。

In vitro 実験 : RBMECs 2 時間低酸素化モデルに対し再酸素化時にそれぞれ薬液を投与し 4 群に振り分け、その 6 時間後における DHE 産生量の比較を行った。20%アルブミン群の DHE

産生量が最も低く、次いで HemoAct 群が DHE 産生量の抑制を認めた。20%アルブミン群と HemoAct 群に有意な差は認められないが、20%アルブミン群・HemoAct 群は Control 群・Hb 群に比較して有意に DHE 産生量の抑制を認めた。Hb 群が最も DHE 産生量が高く、低酸素再酸素化細胞モデルにおいて、Hb 毒性が示唆された。

【考察・結論】

本研究にて、脳虚血後、再灌流時に HemoAct に単回投与することによる神経学的所見の改善、脳梗塞及び脳浮腫の抑制といった神経保護効果を示した。HemoAct の神経保護効果は、脳虚血再灌流領域における MMP-9 及び 4-NHE 産生の減少に関連していた。再灌流 6 時間後の、虚血再灌流領域の脳皮質における CBF 及び PtO₂ の低下によって示された再灌流後の微小血管における低灌流は HemoAct を投与することにより改善された。HemoAct を投与したラットにおける HemoAct の脳微小血管における灌流状態は、HemoAct を投与しなかったラットにおける自己赤血球の脳微小血管における灌流状態と比較して、脳虚血再灌流領域における微小血管狭窄変化の改善を伴う灌流の優位性を示した。更に HemoAct は、アルブミンと同様に低酸素再酸素化処理した培養 RBMEC において抗酸化能をしめしていた。

閉塞脳血管の再開通の遅延による虚血再灌流における微小血管灌流障害のメカニズムは複雑であり、過灌流や低灌流といった矛盾した応答を示す。過灌流は、浸透圧上昇・蛋白質増加・細胞外漏出に伴う脳浮腫や出血性変化につながると考えられている。一方、過灌流に引き続き低灌流が起こり、微小血管灌流障害による二次虚血を生じることがある。これは、no-reflow 現象として知られており、霊長類一過性脳虚血モデルにおける白血球接着、血小板蓄積及びフィブリン形成による微小血管閉塞として実証されている。しかし最近では、微小血管低灌流の別の可能性のある原因が電子顕微鏡研究の時間経過分析において実証されている。齧歯類一過性脳虚血モデルを用いた研究では、再灌流後急性期に血管内皮の星状細胞末端足が膨化することにより微小血管狭窄が一時的に誘導されることを実証した。今回の研究では、再灌流 6 時間後に血管周囲腔の拡大（おそらく星状細胞末端足の膨化による）により微小血管が狭窄変化を起こし、CBF の低下・PtO₂ の減少・赤血球の灌流低下を来す虚血再灌流時の微小血管低灌流が観察された。小粒子サイズの人工酸素運搬体の特性は、虚血再灌流領域の微小血管狭窄変化を伴う状態は、不可逆的損傷から脳組織を救出するために適していると考えられる。

現在までに、未解決の副作用があるため、HBOCs の臨床使用が承認されていない。架橋された Hb ポリマーは、輸血代用として長年にわたり積極的に研究されてきたが、Hb による一酸化窒素捕捉のために急激な血圧上昇を来すため臨床使用が承認されていない。一方、アルブミンで覆われた HemoAct は、正常動物に投与しても生理学的、組織学的にも支障を来さず、血圧上昇の副作用を認めなかった。また脳虚血再灌流モデル動物でさえ、血圧上昇など有害な効果を示さなかった。これは、アルブミンコーティングによる効果であることが考えられる。HemoAct の他の有利な特徴もまたアルブミンによって認められる。アルブミン自体が、循環血液量の増加及び抗酸化剤の能力のために、脳虚血再灌流障害に対する神経

保護効果を有する。追加実験で、20%アルブミン単独投与でも、同じ脳虚血再灌流モデルにおいて HemoAct 程ではなかったが梗塞容積が中等度に減少した。したがって、HemoAct には他の HBOCs とは異なる付加的な神経保護効果があると考えられる。実際、本研究では、*in vitro* 及び *in vivo* 実験で、ROS 産生の抑制によって表される抗酸化効果を証明することができた。梗塞体積は LEH 投与によりコントロールの 60%に縮小させたが、HemoAct 投与によりコントロールの 36%に縮小させ、HemoAct は LEH と比較してより強い神経保護効果を示した。HemoAct は虚血性疾患の治療において使用する有望な HBOCs の一つと期待できる。

今後、脳卒中治療の臨床応用において、HemoAct の使用方法を決定することは重要である。本研究で検討したモデルは、血管内血栓除去術を施行し閉塞した動脈の再開通後にカテーテルを介して動脈内薬物投与をした場合は想定している。我々が経動脈投与を選択した理由は、できるだけ早く虚血組織に HemoAct を送達することを目的としたためであった。経動脈投与においても、有害事象はきたさなかった。