

平成 21 年 5 月 7 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590982
 研究課題名 (和文) 新規脳梗塞治療薬 Bevacizumab による脳血管内皮細胞保護作用の検討
 研究課題名 (英文) Analysis of the neurovascular protection by the novel therapeutic agent, Bevacizumab
 研究代表者
 下畑 享良 (Shimohata Takayoshi)
 新潟大学脳・研究所・准教授
 研究者番号：60361911

研究成果の概要：本研究において、われわれは以下の点を明らかにした。

- ① ラット脳塞栓組織型プラスミノゲン・アクチベーター (tPA) 投与モデルを確立し、tPA 療法後の脳出血抑制を目的とする新規治療薬のスクリーニングが可能となった。
- ② 上記モデルにて、治療可能時間 (3 時間) を過ぎて tPA 療法を行った場合、血管内皮細胞において高度の VEGF 発現が生じていることを初めて明らかにした。
- ③ tPA と同時に抗 VEGF 抗体を投与することで、血管透過性を亢進し、血液脳関門を破壊させる VEGF 発現の抑制が生じたことから、VEGF 発現の抑制は、tPA 療法の欠点を改善する手段として有望である可能性がある。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：神経病態薬理学・脳虚血

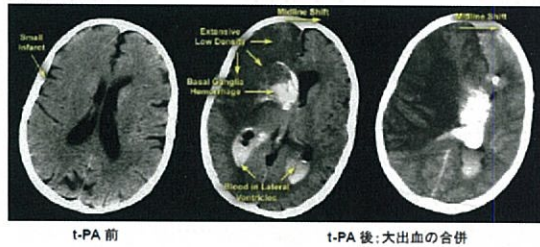
1. 研究開始当初の背景

1995 年、脳梗塞患者に対し血栓溶解薬 tPA を発症 3 時間以内に静脈注射すると、発症から 3 ヶ月後の機能回復が偽薬群に比べて有意に良好であることが示された (N Engl J Med 333:1581-1587, 1995)。この結果、tPA は米国において「初の本格的脳

卒中治療薬」と認められ、以後、世界各国でその使用が承認された。しかし tPA による血栓溶解療法にも問題点が存在する。なかでも虚血による血管内皮細胞の障害は出血性梗塞をひき起こし (図 1)、予後を増悪させるため極めて重要である (Stroke 35: 2220-2225, 2004)。これらの問題点の解決は脳梗塞患者の予後を大きく改善する

ことから、全力で取り組むべき重要な課題と言える。

図1. tPA後に合併した脳出血



2. 研究の目的

本研究の目的は「血管内皮細胞の保護が脳梗塞に対する新しい治療アプローチになる可能性について検討すること」である。最終的に血管内皮細胞障害を抑制する新規治療薬を同定し、tPAによる血栓溶解療法と併用することで、脳梗塞サイズの縮小や合併する脳出血の抑制を目指す。

血管内皮細胞の保護薬の候補としては、脳梗塞急性期において梗塞巣に発現し (Acta Neurochir 86:213-217, 2003)、血液脳関門の破綻に関与する可能性が示唆されている血管内皮細胞増殖因子 VEGF (vascular endothelial growth factor) (Stroke 35:2220-2225, 2004) を標的分子とし、その中和抗体である bevacizumab (抗 VEGF 中和抗体) が有効であるか検討する。

Bevacizumab は、VEGF 分子に結合して、その血管内皮細胞特異的受容体型チロシンキナーゼへの結合を阻止し、シグナル伝達を遮断して、VEGF の作用を阻害する。Bevacizumab は VEGF の血管内皮細胞へのさまざまな作用 (血管透過性亢進、血管拡張、マトリックス・メタロプロテアーゼ発現増加、血管新生など) を阻害することが報告されている。

3. 研究の方法

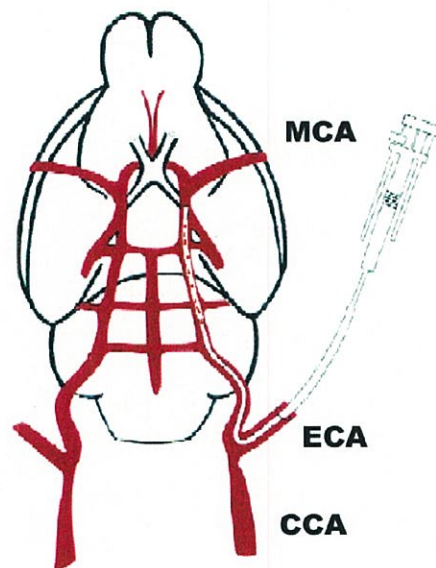
実際に血栓を溶解するラット脳塞栓モデルを確立し、抗 VEGF 中和抗体を tPA と併用する治療介入が、tPA 単独の場合と比較し、脳出血の合併を増やすことなく、予後を改善することが可能か検討する。

【1】ラット脳塞栓 tPA 投与モデルの検討

脳梗塞作成は分担研究者の五十嵐らの方法に従う (Neurol Res 24:311-316, 2002)。まずラット動脈血にトロンピンを添加し、内径 0.38mm のポリエチレンチューブ内に注入して放置し、自家血血栓を作成する。それを 1mm 長に切り分けておく。

オス Sprague-Dawley ラット (275~300g) をハロセンにて麻酔後、外頸動脈から内頸動脈内に挿入したポリエチレンチューブを通して、中大脳動脈起始部近傍に血栓を複数個注入し脳梗塞を作成する (図2) この血栓注入により、安定したサイズの脳梗塞が 24 時間後に作成できる条件を、TTC 染色により決定する。

図2. ラット脳塞栓 tPA 投与モデル



【2】tPA 投与の遅延により出血性梗塞をきたすモデルの検討

血栓注入による脳虚血ののち、複数の時間後に tPA (alteplase ; 10mg/kg) を静脈注射する。血栓の溶解を血流エコーにて確認したのち、虚血から 24 時間後に TTC 染色により脳梗塞体積を測定し、さらに各時間毎の標本における肉眼的な出血や spectro-photometric assay を用いての一定脳組織におけるヘモグロビン濃度を測定する。

【3】血管内皮細胞における VEGF 発現の検討

上述【2】のモデルを用いて、tPA の投与時間ごとの VEGF の発現変化を Western blot と免疫染色にて評価する。免疫染色に関しては、ラット VEGF 抗体 (Upstate #05-443) と血管内皮細胞のマーカー CD31 に対する抗体 (Pharmingen #550300)、核染色 (DAPI) を用いた三重染色を行い、血管における VEGF の発現の状態について蛍光顕微鏡および今日焦点レーザー顕微鏡を用いて検討する。

【4】抗 VEGF 抗体静脈注射の効果の検討

上述【2】のモデルを用いて、tPA と同時に抗 VEGF 抗体を静脈注射し、24 時間後における VEGF の発現の変化を偽薬群と比較する。

4. 研究成果

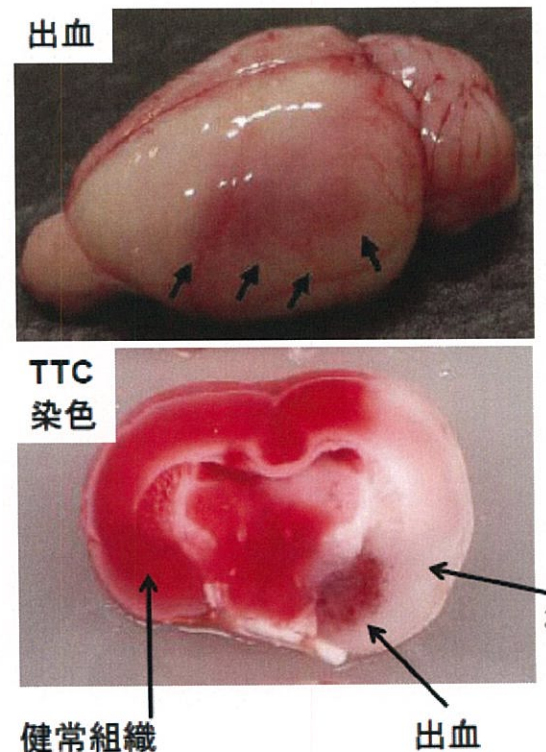
【1】ラット脳塞栓 tPA 投与モデルの確立

1 mm 長のラット自家血血栓を 17 個、中大脳動脈へ注入することにより、基底核および中大脳動脈領域の脳皮質に安定した梗塞巣を形成することが可能になった。

【2】tPA 投与の遅延により出血性梗塞をきたすモデルの確立

自家血血栓注入の 1 時間後に tPA (10mg/kg) を投与した場合、著明に TTC 染色により評価した脳梗塞巣は生理食塩水投与群と比較し有意に減少した。一方、4 時間後に投与した場合、脳梗塞巣の拡大に加え、肉眼的な脳実質の出血を来した (図 3)。さらに単位脳組織あたりのヘモグロビン濃度も有意に増加した。

図 3. tPA 投与後の脳出血の合併



【3】遅延した tPA 投与後の虚血血管内皮細胞において VEGF 発現は亢進する

虚血 4 時間後より、VEGF は虚血中心と虚血性ペナンプラの脳皮質アストロサイトと血管内皮細胞に高発現することが明らかになった。とくに虚血性ペナンプラの抗 CD31 抗体陽性血管内皮細胞では 24 時間後まで VEGF が強く発現した (図 4)。

ウェスタンブロットのデンストメトリー解析 (図 5) でも虚血性ペナンプラにおいて VEGF の可溶性アイソザイムである VEGF165 と VEGF121 の有意な発現増加を認めた。

図 4. 血管内皮細胞における VEGF の発現

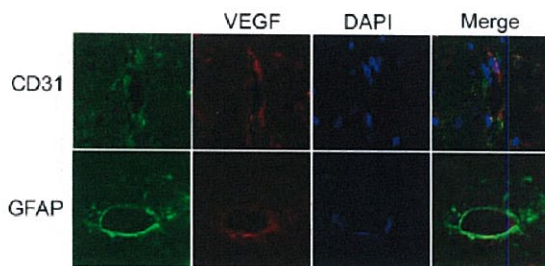
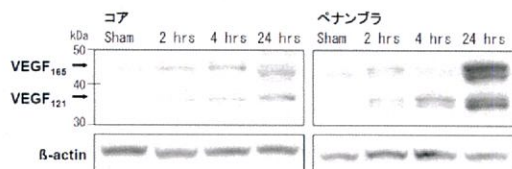


図 5. ウェスタンブロット法による解析



【4】抗 VEGF 抗体静脈注射は VEGF 発現を中和する

ウェスタンブロットによる評価で、ラット VEGF 特異的中和抗体は、ラット脳において tPA 投与後に誘発される虚血 24 時間の VEGF 発現を有意に抑制した。この効果は tPA 投与が虚血の 1 時間、および 4 時間のいずれにおいても認められた。これらの

効果は免疫染色によっても確認することができた。

(研究のまとめと今後の展望)

tPA 投与後の脳出血合併に対する新規治療薬のスクリーニングを可能とするモデルを確立した。今後、VEGF 抑制療法の有効性を検討し、さらに最適な抑制療法の方法について検討を行う必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

下畑 享良, 金澤雅人, 高橋哲哉, 西澤正豊: 綜説 ポスト tPA 時代の神経・血管保護療法. 新潟県医師会報 706;1-5, 2009 査読無

[学会発表] (計 2 件)

金澤雅人, 五十嵐博中, 柿田明美, 高橋均, 西澤正豊, 下畑 享良. ラット中大脳動脈塞栓モデルにおける血管内皮細胞の VEGF 発現. 日本神経学会総会 2008 年 5 月 20 日

Kanazawa M, Kakita A, Igarashi H, Takahashi T, Takahashi H, Nishizawa M, Nakada T, and Shimohata T. TDP43 may contribute to the protective effects of hypothermia against rat focal cerebral ischemia. International Stroke conference 2008 (SanDiego) 2008 年 2 月 19 日

[その他]

以下のホームページにて研究内容を報告している。

http://www.bri.niigata-u.ac.jp/~neuroweb/laboratory/research_basic_004.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下畑 享良 (Shimohata Takayoshi)
新潟大学・脳研究所・准教授
研究者番号: 60361911

(2) 研究分担者

五十嵐 博中 (Igarashi Hironaka)
新潟大学・脳研究所・准教授
研究者番号: 20231128