

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(G)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590997

研究課題名（和文）虚血脳における側副血行路発達促進手段の開発

研究課題名（英文）Development of Collateral Circulation in the Ischemic Brain

研究代表者 北川 一夫 (KITAGAWA KAZUO)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：70301257

研究成果の概要（和文）：マウス一側総頸動脈閉塞により誘導される脳軟膜動脈での側副血行発達は造血因子 顆粒球コロニー刺激因子の投与で促進され、その機序として流血中単核球数増加、脳表面への単核球集積増加作用を介していることを明らかにした。またラット一側総頸動脈閉塞による脳軟膜動脈側副血行発達は 高血圧自然発症ラットで阻害されているが、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬による降圧治療で回復することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）:Enhancing collateral artery growth is a potent therapeutic approach to treat ischemic brain disease from occlusive artery. Brain ischemia was created by occluding left common carotid artery (CCA) in C57/BL6 mice. Following the surgery, G(granulocyte)-CSF (100  $\mu$ g/kg/day) was administered daily for 5 days. G-CSF increased circulating blood monocytes and Mac-2 positive cells in the brain dorsal surface, and promoted leptomeningeal collateral growth. In spontaneously hypertensive rats (SHR), CCA occlusion did not enlarge the leptomeningeal anastomosis in contrast to that in normotensive rats. However, decreasing blood pressure using an angiotensin II AT1 receptor blocker restored the beneficial effect of CCA occlusion on collateral growth. Enhancement or preservation of collateral growth by G-CSF or anti-hypertensive treatment would be a future target for developing a new strategy against ischemic brain disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：脳虚血、側副血行、血管新生、高血圧、慢性低灌流、造血因子

## 1. 研究開始当初の背景

我が国の死因の第3位を占める脳卒中の約7割は脳梗塞である。脳梗塞の原因は脳血管閉塞であるが、その中には生命を失うほど重症な例から軽い神経後遺症しか残さない軽症例まで様々な重症度の症例が含まれている。脳梗塞で重症度を規定する主な因子は脳梗塞の大きさ、障害部位であるが、同じ脳主幹動脈が閉塞しても、灌流領域全域が梗塞に陥るほど重症な場合から、何ら症状を有さず梗塞病変もまったく認めない例まで、その重症度、梗塞範囲は様々である。脳主幹動脈が閉塞した場合、脳梗塞重症度を規定する主な要因は残存血流の程度であり、ウイリス動脈輪、脳軟膜動脈吻合(leptomeningeal anastomosis)を介した側副血行路発達の程度が虚血の重症度を規定する最も重要な因子である事は広く認識されているが、脳軟膜動脈吻合での側副血行路発達のメカニズムについては殆ど検討されていなかった。我々は、2005年にマウス脳虚血モデルで予め一侧脳半球を低灌流状態に曝しておく、脳軟膜動脈吻合を介した側副血行路の発達を誘導する実験系を開発し(Stroke 36: 2270-2274, 2005)、さらに顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)の投与により慢性低灌流脳における脳軟膜動脈での側副血行路発達が、促進されることを明らかにした(Stroke 2008;39:1875-1882)。

欧米では虚血性心疾患症例を対象にGM-CSF投与による側副血行発達効果が臨床試験されたが、GM-CSF投与群においてプラーク破綻に伴う心筋梗塞発症例が報告され、安全性の観点から臨床開発は中止されている。一方 同じ造血因子に属する顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)は、神経細胞保護、アポトーシス抑制作用が実験的に証明され、脳卒中臨床症例でも投与され安全性が確認されている。しかしG-CSFの脳軟膜動脈でのArteriogenesisへの影

響、作用は検討されていなかった。

脳血管閉塞時に虚血重症度を規定し脳軟膜動脈吻合を介した側副血行発達の良否を規定する因子として、高血圧の存在が指摘されている。高血圧自然発症ラットでは正常血圧ラットに比し、脳軟膜動脈吻合を介した側副血行は不良で中大脳動脈閉塞時に梗塞体積が増大することが知られているが、慢性低灌流時の脳側副血行発達への高血圧の影響 および降圧治療を行った際の軟膜動脈吻合発達への影響は検討されていなかった。

## 2. 研究の目的

マウスおよびラット一側総頸動脈閉塞による脳慢性低灌流モデルを用いて以下の点を明らかにせんとした。

- (1) 各種造血因子(G-CSF, GM-CSF, マクロファージコロニー刺激因子 M-CSF)の脳軟膜動脈吻合発達への影響を明らかにし、Arteriogenesis への流血中単核球の関与を明らかにする。
- (2) 高血圧自然発症ラット(SHR)での脳軟膜動脈吻合の側副血行発達程度と、降圧治療の側副血行発達促進効果について明らかにする。

## 3. 研究の方法

- (1) 造血因子の脳軟膜動脈吻合発達への影響

C57BL/6 マウスを用い、ハロセン吸入麻酔下に 左総頸動脈を閉塞(または偽手術)した。手術当日から 連日 偽薬(生理食塩水), G-CSF, GM-CSF, M-CSF (100mg/kg)を5日間皮下投与した。手術5日目に各群マウスでの血液中白血球数、顆粒球数、単核球数、リンパ球数を計測した。

手術7日目に各群マウス (n=5) を深ネン

ブタール麻酔下に開胸し、左心室より墨汁ガラテックスを注入したのち 脳を取り出しホルマリン固定した上で 脳表面の軟膜動脈吻合を観察した。中大脳動脈と前大脳動脈または後大脳動脈の吻合血管の血管径を各群 10 本以上計測した。脳表面への単核球の集積は、抗 MAC2 抗体を用いた免疫組織染色にて施行し (各群 n=5)、脳表面での MAC2 陽性細胞数を計測した。また G-CSF 投与群では術前に 5-フルオロウラシル(5-FU; 150 mg/kg, i. p.)を投与し 白血球が枯渇した状況下で、G-CSF の軟膜動脈吻合血管径への影響も併せて検討した。

手術 7 日目に各群マウス (n=6) をハロセン吸入麻酔下に 左中大脳動脈を露出、電気凝固により永久閉塞した。48 時間後に深ネブタール麻酔下に脳を摘出し 2mm の冠状切片を作成し TTC 染色を施行し 梗塞体積を算出した。

(2) 高血圧の脳軟膜動脈吻合発達への影響-  
アンジオテンシン II 受容体拮抗薬による降圧の影響-

10 週令高血圧自然発症ラット (SHR) をハロセン吸入麻酔下に左総頸動脈を露出 二重結紮により閉塞 (または偽手術) した。対照として正常血圧ウイスターラットを用いた。

総頸動脈閉塞または偽手術 14 日目に SHR (各群 n=5) を深ネブタール麻酔下に開胸し、左心室よりラテックス下墨汁を注入したのち 脳を取り出しホルマリン固定した上で 脳表面の軟膜動脈吻合を観察した。中大脳動脈と前大脳動脈または後大脳動脈の吻合血管の血管径を各群 10 本以上計測した。総頸動脈閉塞または偽手術 14 日目 (各群 n=6) に ハロセン吸入麻酔下に 頸部内頸動脈よりナイロン糸を挿入し右中大脳動脈を永

久閉塞した。48 時間後に深ネブタール麻酔下に脳を摘出し 2mm の冠状切片を作成し TTC 染色を施行し 梗塞体積を算出した。

降圧治療の影響を検討するため、10 週令 SHR の総頸動脈閉塞 (または偽手術) 当日から偽薬、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬オルメサルタン (低用量 0.5 mg/kg/day ; 高用量 5 mg/kg/day) を投与した。血圧は尾動脈カフ法により非観血的に測定し、手術 14 日目に血圧測定後、各群 5 匹ずつ深ネブタール麻酔下に 左心室より墨汁ガラテックスを注入したうえで 脳軟膜動脈吻合血管径を計測した。また別に各群 6 匹ずつをハロセン吸入麻酔下に右中大脳動脈を永久閉塞し 48 時間後に脳を摘出 TTC 染色により梗塞体積を算出した。

#### 4. 研究成果

(1) 造血因子の脳軟膜動脈吻合発達への影響

偽薬投与群に比し、M-CSF 投与群は 血球数の有意な変化を認めなかった。一方 G-CSF 投与群では 白血球数、顆粒球数、単核球数、リンパ球数の、GM-CSF 投与群では単核球数の有意な増加が認められた。

脳軟膜動脈吻合血管径は、偽手術群に比し総頸動脈閉塞 7 日・偽薬投与群、M-CSF 投与群では 有意な拡大はみられなかったが、G-CSF 投与群、GM-CSF 投与群では有意な拡大が観察された (図 1)。

脳表面への単核球集積は、偽手術群に比し総頸動脈閉塞 7 日・偽薬投与群、M-CSF 投与群でも有意な増加はみられたが、G-CSF 投与群、GM-CSF 投与群ではさらなる集積増加が観察された (図 2)。

G-CSF 投与群で、総頸動脈閉塞前に 5-FU を投与しておく と 偽薬投与群で観察される脳軟膜動脈血管径の拡大が抑制された (5-FU

投与群 21.5±1.1 mm vs 偽薬投与群 27.5±1.9 mm, P<0.01)。

中大脳動脈閉塞による脳梗塞体積は、偽手術群に比し総頸動脈閉塞 7 日・偽薬投与群、M-CSF 投与群では 有意な縮小はみられなかったが、G-CSF 投与群、GM-CSF 投与群では有意な梗塞サイズ縮小が観察された (図 3)。

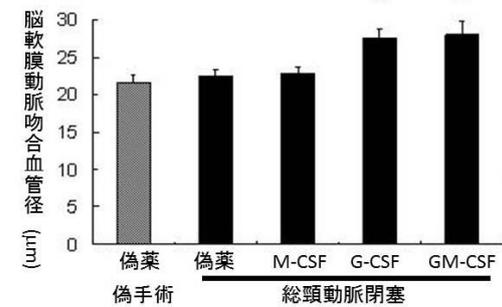
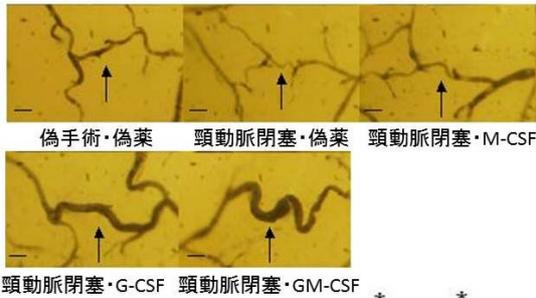


図 1:慢性低灌流による脳軟膜動脈吻合発達 - 造血因子による促進効果 -

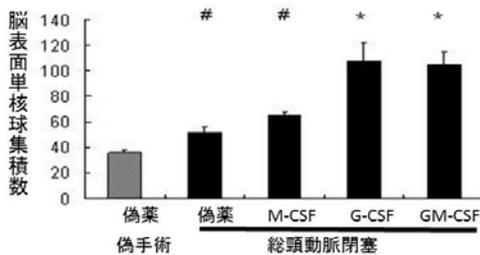
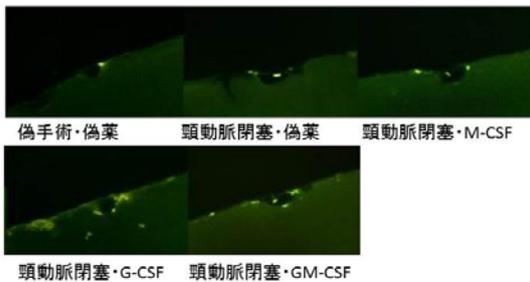


図 2:慢性低灌流による脳軟膜への単核球集積 - 造血因子による促進効果 -

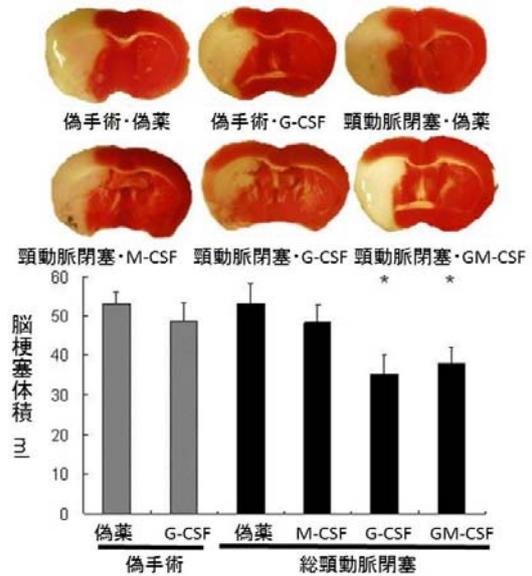


図 3:慢性低灌流負荷後の中大脳動脈閉塞による脳梗塞 - 造血因子の梗塞縮小効果 -

(2) 高血圧の脳軟膜動脈吻合発達への影響- アンジオテンシン II 受容体拮抗薬による降圧の影響-

頸動脈閉塞 2 週間後に正常血圧 Wistar ラットで観察される脳軟膜動脈吻合血管径の拡大は、高血圧自然発症ラット (SHR) では見られなかった。また正常血圧ラットでは頸動脈閉塞 2 週間後に中大脳動脈閉塞を負荷したところ 偽手術群に比し梗塞体積が顕著に縮小するが SHR では梗塞体積の縮小は観察されなかった (図 4)

SHR で降圧による脳軟膜動脈吻合発達への影響を検討するため アンジオテンシン II 受容体拮抗薬オルメサルタンを投与したところ、収縮期血圧は偽薬、低用量オルメサルタンでは 200mmHg 前後であったが 高用量オルメサルタンでは 170mmHg に低下した。脳軟膜動脈吻合血管径は 偽手術群 (偽薬およびオルメサルタン高用量投与群)、頸動脈閉塞に偽薬投与群または低用量オルメサルタン投与群の間では 有意な差は見られなかったが、頸動脈閉塞に高用量オルメサルタン投

与した群では 有意な血管径の拡大を認め  
た。また中大脳動脈閉塞後の脳梗塞体積も  
頸動脈閉塞にオルメサルタン高用量投与群  
でのみ有意な縮小が観察された (図5)。以  
上の結果より 高血圧状態では慢性低灌流  
に伴って発生する脳軟膜動脈での側副血行  
の発達が阻害されるが アンジオテンシン  
II 受容体拮抗薬による降圧治療を行うと  
側副血行発達効果が回復することが示され  
た。

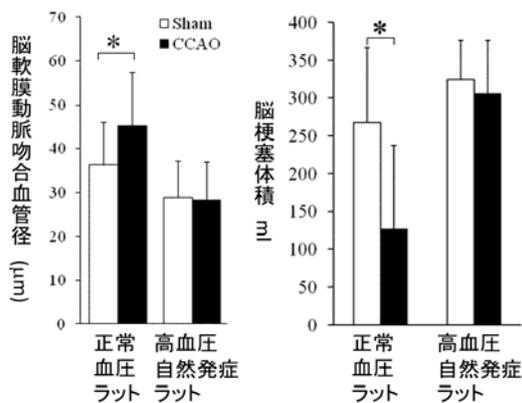


図4：脳慢性低灌流による脳軟膜動脈吻合血  
管径拡大、中大脳動脈後の脳梗塞サイズ -  
正常血圧ラットと高血圧自然発症ラットの  
比較 -

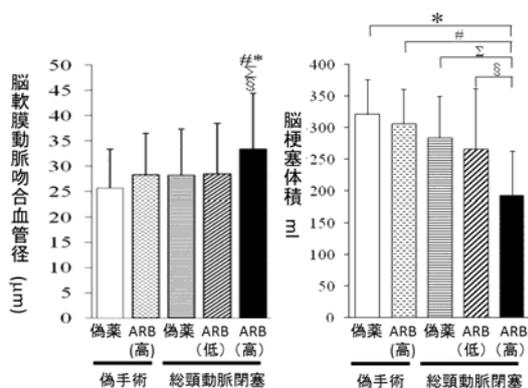


図5：高血圧自然発症ラットでのアンジオテ  
ンシン II 受容体拮抗薬投与 (低用量または  
高用量) の脳軟膜動脈吻合血管径 中大脳動  
脈閉塞による脳梗塞サイズへの影響

## 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2件)

- ① Sugiyama Y, Yagita Y, Oyama N, Terasaki Y, Omura-Matsuoka E, Sasaki T, Kitagawa K. Granulocyte Colony-Stimulating Factor Enhances Arteriogenesis and Ameliorates Cerebral Damage in a Mouse Model of Ischemic Stroke. *Stroke*, 2011, 42: 770-775, 査読有
- ② Omura-Matsuoka E, Yagita Y, Sasaki T, Terasaki Y, Oyama N, Sugiyama Y, Todo K, Sakoda S, Kitagawa K. Hypertension Impairs Leptomeningeal Collateral Growth after Common Carotid Artery Occlusion - Restoration by Anti-Hypertensive Treatment-. *J Neurosci Res*, 89: 108-116, 2011、査読有

[学会発表] (計2件)

- ① Sugiyama Y, Yagita Y, Oyama N, Terasaki Y, Omura-Matsuoka E, Sasaki T, Kitagawa K. Granulocyte Colony-Stimulating Factor Enhances Arteriogenesis and Ameliorates Cerebral Damage in a Mouse Model of Ischemic Stroke. In International Stroke Conference. 2011. 2.9-2011.2.11、Los Angeles, USA
- ② Omura-Matsuoka E, Yagita Y, Sasaki T, Terasaki Y, Oyama N, Sugiyama Y, Okazaki S, Kitagawa K. Treatment with angiotensin II receptor blocker, olmesartan, recovers protective effect of chronic mild hypoperfusion after MCA occlusion in hypertensive rats.

XXIVth International Symposium on Cerebral Blood Flow, metabolism and Function & IXth International Conference on Quantification of Brain Function with PET, Jun2 29- July 3, 2009, Chicago, USA

[その他]  
ホームページ  
<http://www.osaka-njm.net/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北川 一夫 (KITAGAWA KAZUO)  
大阪大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号：70301257

### (2) 研究分担者

八木田 佳樹 (YAGITA YOSHIKI)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：20403066

### (3) 連携研究者

佐古田 三郎 (SAKODA SABURO)  
国立病院機構刀根山病院・院長  
研究者番号：00178625