

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390234

研究課題名(和文)造血因子の脳軟膜側副血行促進機序の解明—脳梗塞亜急性期への臨床応用を目指して—

研究課題名(英文)Mechanisms of arteriogenesis enhancement by granulocyte colony stimulating factor &amp;#8211; Potential application to patients with subacute ischemic stroke

研究代表者

北川 一夫 (KITAGAWA, KAZUO)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70301257

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円、(間接経費) 4,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、脳慢性低灌流状態における脳軟膜動脈吻合発達に対する各種造血因子投与、高血圧、糖尿病の影響を明らかにした。マウス総頸動脈閉塞による慢性脳低灌流モデルでは、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)は側副血行発達を促進することを明らかにした。しかし高血圧自然発症ラットや糖尿病モデルであるdb/dbマウスでは側副血行発達促進効果は観察されなかった。造血因子G-CSFは脳軟膜動脈吻合促進効果を有するが、脳血管内皮機能の低下した高血圧、インスリン抵抗性のもとでは脳軟膜側副血行発達は抑制されることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Pial collateral development after chronic brain hypoperfusion, arteriogenesis, has attracted much attention because of potential therapeutic target in acute ischemic stroke. In this study, we have investigated the effect of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), chronic hypertension and insulin resistance on pial collateral development in chronic brain hypoperfusion. In mice subjected to unilateral carotid occlusion, treatment with G-CSF enhanced pial collateral development and reduced infarct size after occlusion of middle cerebral artery. However, in both spontaneous hypertensive rats and db/db mice, no development of pial collateral circulation occurred after unilateral carotid occlusion. In conclusion, G-CSF could stimulate arteriogenesis in the pial circulation through recruitment of circulating monocytes, but arteriogenesis in chronic hypoperfusion would be hampered under the condition of endothelial dysfunction such as hypertension and insulin resistance.

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：側副血行 慢性脳低灌流 造血因子 高血圧 糖尿病 脳虚血

### 1. 研究開始当初の背景

毎年我が国では約12万人が脳卒中発症のため亡くなられ、要介護原因疾患の約3割を脳卒中が占め(第1位)、脳卒中对策は医療上の重要な課題である。脳卒中の約7割は脳梗塞が原因であり、2005年に経静脈的血栓溶解療法が保険承認されたが、発症4.5時間以内の使用という時間的制約のために脳梗塞急性期症例の10%未満にしか適用されず、新規な視点に基づいた治療手段の開発が望まれる。脳梗塞の原因は脳血管閉塞であるが、同じ脳主幹動脈(中大脳動脈など)が閉塞しても、片側脳半球全体が梗塞に陥り、生命を脅かす症例から、軽度の神経症状で治まる軽症例まで、その重症度、梗塞範囲は様々である。脳虚血重症度を規定する主な要因は血管閉塞時の残存血流の程度であり、ウイリス輪、脳軟膜動脈吻合での側副血行発達の良否が残存血流を規定する最も重要な因子である。

脳軟膜動脈吻合での側副血行発達を規定する要因は、年齢・高血圧・主幹動脈の血管閉塞に至る経過時間など様々な要因が臨床的な観察から報告されてきたが、適切な動物実験モデルが存在しなかった。研究代表者は2005年にマウス中大脳動脈閉塞モデルにおいて予め一側総頸動脈を閉塞し、同側脳半球を慢性低灌流に曝しておく、2週間以後に脳軟膜動脈吻合が発達し、中大脳動脈を閉塞した際の虚血重症度が軽減され、梗塞体積が縮小する事を報告し、脳軟膜動脈での側副血行発達(Arteriogenesis)を観察可能な実験モデルとして確立した。さらに、ラット中大脳動脈閉塞モデルでも慢性脳低灌流負荷により同様なArteriogenesisが誘導される事、血管内皮機能の低下が報告されているApoE欠損マウス及び高血圧自然発症ラット(SHR)では脳軟膜吻合でのArteriogenesisが阻害されているが、SHRでは降圧療法により回復する事を明らかにした。

また、脳軟膜動脈での側副血行を発達させ

る因子として、下肢や心筋虚血モデルで検討されてきた造血因子の1つ顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)をマウス脳虚血モデルで検討したところ、総頸動脈閉塞によるArteriogenesisが促進される事を明らかにした。一方、下肢・心筋では側副血行発達手段としてGM-CSFが注目され、臨床治験が行われたが、GM-CSF群で心筋梗塞が発症し、安全性の観点から開発が中止されている。側副血行発達には骨髄よりの単核球動員が重要とされているが、GM-CSF以外の造血因子G-CSF、M-CSFは既に白血球減少症に臨床使用され、安全性も確立されている。特にG-CSFは虚血脳保護、神経新生促進効果等も報告されている。

### 2. 研究の目的

本研究では、我々の開発した脳軟膜動脈吻合発達の実験系で各種造血因子の有効性を比較した上で、造血因子の脳血管でのArteriogenesis促進機序と脳血管内皮機能のArteriogenesisに果たす役割を解明し、臨床応用に適する造血因子、投与量、投与方法を確立する事を目的とした。脳血管内皮機能低下モデルとして高血圧自然発症ラットとインスリン抵抗性のモデル動物であるdb/dbマウスを用いることとした。

### 3. 研究の方法

成熟C57BL/6マウス総頸動脈閉塞モデルを用いて各種造血因子GM-CSF、G-CSF、M-CSF、SCFの脳軟膜動脈側副血行発達促進効果の比較検討

- 1) C57BL/6マウス(10週齢)をイソフルレン吸入麻酔下に左総頸動脈を剥離、結紮する。同日より申請者等の既報に従い、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、SCFおよび生理食塩水を各々100 $\mu$ g/kg連日腹腔内投与し、7日目に深ネブタール麻酔下

に採血後、経左心室的に墨汁ガラテックスビーズを注入し脳を取り出し、ホルマリン固定後、脳表面の脳軟膜動脈吻合血管の血管径を計測する。採血した血液は白血球、顆粒球、単核球数を計測する。

- 2) 1)で側副血行発達促進効果の確認された造血因子について、投与量を 1, 10, 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  に分けて検討を行い、投与量と側副血行発達効果の関連を検討する。
- 3) 造血因子の Arteriogenesis 促進効果の主たる要因は骨髄からの単核球細胞動員であることを明らかにする。で最も脳軟膜での Arteriogenesis 促進効果が示された造血因子を用いて、検討を行う。C57BL/6 マウス(8-10 週齢)をイソフルレン吸入麻酔下に左総頸動脈を剥離、結紮する。同日より造血因子または生理食塩水を各々100 $\mu\text{g}/\text{kg}$  連日腹腔内投与し、7日目に深ネンブタール麻酔下に採血後、経左心室的に4% PFA 溶液で灌流固定後、ピプラトームで矢状断切片を作成し、脳軟膜動脈への単核球集積程度を抗 MAC2 抗体、抗 CD34 抗体を用いて検討し、流血中の白血球数、単核球数と脳軟膜動脈への単核球集積程度との関連を検討する。
- 4) 5-FU を用いた顆粒球・単核球枯渇による影響を検討する。3)と同様な実験系で左総頸動脈閉塞当日より 5-フルオロウラシル(5-FU, 150mg/kg)を造血因子とともに腹腔内投与する。7日目における流血中の白血球数、単核球数と脳軟膜動脈への単核球集積程度との関連を検討する。

脳血管内皮機能低下動物における脳軟膜動脈吻合発達促進効果の検討

- 5) 脳血管内皮機能不全モデルとして 高血圧自然発症ラットを用いて、G-CSF の脳軟膜動脈吻合発達効果を検証する。正常血圧ラットまたは高血圧自然発症ラット

の左総頸動脈を剥離、結紮する。同日より G-CSF および生理食塩水を各々100 $\mu\text{g}/\text{kg}$  連日腹腔内投与し、7日目に深ネンブタール麻酔下に採血後、経左心室的に墨汁ガラテックスビーズを注入し脳を取り出し、ホルマリン固定後、脳表面の脳軟膜動脈吻合血管の血管径を計測した。

- 6) 他の脳血管内皮機能不全モデルとしてインスリン抵抗性を有する db/db マウスを用いる。db/db マウスおよび対照動物である db/+マウスの左総頸動脈を剥離、結紮し、7日後に深ネンブタール麻酔下に採血後、経左心室的に墨汁ガラテックスビーズを注入し脳を取り出し、ホルマリン固定後、脳表面の脳軟膜動脈吻合血管の血管径を計測する。急性高血糖モデルとして C57BL/6 マウス(10 週齢)にストレプトゾトシンを腹腔内投与し糖尿病を作成したのちに 左総頸動脈を剥離、結紮し、14 日後に深ネンブタール麻酔下に採血後、経左心室的に墨汁ガラテックスビーズを注入し脳表面の脳軟膜動脈吻合血管の血管径を計測した。

#### 4. 研究成果

- 1) C57BL/6 マウス総頸動脈閉塞による慢性脳低灌流モデルを用いて、各種造血因子の中で顆粒球・単核球系の細胞動員可能な因子 GM-CSF、G-CSF、M-CSF の脳軟膜動脈側副血行発達促進効果を比較検討したところ、G-CSF、GM-CSF はマウス一側総頸動脈閉塞後の側副血行発達促進効果を発揮することが明らかになった。一方 M-CSF 投与にはこのような作用は観察されなかった。
- 2) G-CSF の投与量を 1, 10, 100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$  に分けて検討を行ったところ、10  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 、100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ で脳軟膜動脈吻合血管径の拡大が観察された。
- 3) 脳軟膜動脈周辺の Mac-2 陽性細胞数は

生理食塩水投与群に比し、M-CSF 投与群では差が見られなかったが、G-CSF、GM-CSF 投与群では Mac-2 陽性細胞数は有意に増加していた。

- 4) 5-FU を投与し白血球を枯渇した状態では、G-CSF の脳軟膜動脈吻合発達促進効果は消失していた。
- 5) 正常血圧ラットでは C57BL/6 マウスと同様に 左総頸動脈閉塞後に G-CSF を投与すると、脳軟膜動脈吻合血管径の拡大が観察された。しかし高血圧自然発症ラットでは、G-CSF の側副血行発達促進効果は観察されなかった。
- 6) db/db マウスでは、左総頸動脈閉塞後の脳軟膜動脈吻合血管径の拡大が観察されなかった。対照動物である db/+ マウスでは左総頸動脈閉塞後 脳軟膜側副血行は発達していた。一方、ストレプトゾトシン投与による急性高血糖モデルでは、左総頸動脈閉塞による脳軟膜動脈吻合発達が観察された。

#### 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 7 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;42:770-5. doi: 10.1161/STROKEAHA.110.597799.
2. Kitagawa K. Ischemic tolerance in the brain: endogenous adaptive machinery against ischemic stress. *J Neurosci Res*. 2012;90:1043-54. doi: 10.1002/jnr.23005

3. Kitagawa K, Sasaki T, Terasaki Y, Yagita Y, Mochizuki H. [CREB activation is a key player for ischemic tolerance in the brain]. *Rinsho Shinkeigaku*. 2012;52(11):904-7. Japanese. PMID:23196462
4. Kitagawa K. [Brain protection against cerebral ischemia]. *Rinsho Shinkeigaku*. 2013;53(11):1169-71. Japanese. PMID:24291917
5. Kitagawa K. Selective estrogen receptor modulators and cardiovascular events. *Circ J*. 2013;78:63-4. Epub 2013 Nov 23. PMID:24270732
6. Sugiyama Y, Yagita Y, Yukami T, Watanabe A, Oyama N, Terasaki Y, Omura-Matsuoka E, Sasaki T, Mochizuki H, Kitagawa K. Granulocyte colony-stimulating factor fails to enhance leptomeningeal collateral growth in spontaneously hypertensive rats. *Neurosci Lett*. 2014;564:16-20. doi: 10.1016/j.neulet.2014.01.053.
7. Yagita Y, Kitagawa K, Oyama N, Yukami T, Watanabe A, Sasaki T, Mochizuki H. Functional deterioration of endothelial nitric oxide synthase after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2013;33:1532-9. doi: 10.1038/jcbfm.2013.112.

〔学会発表〕(計 9 件)

1. 北川一夫: 脳軟膜側副血行路発達の機序と臨床への展開 第23回日本脳循環代謝学会総会 平成23年11月5日 東京
2. 杉山幸生、八木田佳樹、大山直樹、由

上登志郎、佐々木勉、望月秀樹、北川一夫。高血圧自然発症ラットにおける脳軟膜動脈吻合の発達障害。第 37 回日本脳卒中学会総会、平成 24 年 4 月 26 日～28 日、東京

3. 北川一夫: “Effect of Atherosclerosis Risk Factors on Arteriogenesis in Pial Collateral Circulation” シンポジウム 3 Molecular Mechanisms of Cerebral Arteriosclerosis and Ischemia。第 44 回日本動脈硬化学会総会・学術集会、平成 24 年 7 月 19 日、福岡
4. 北川一夫: 内皮・炎症マーカー。シンポジウム 血栓形成能の指標: バイオマーカーの有用性。第 38 回日本脳卒中学会総会 平成 25 年 3 月 21 日～23 日、東京
5. 八木田佳樹、北川一夫、大山直記、由上登志郎、佐々木勉、望月秀樹。脳勝血管内皮細胞間接着結合に対する脳虚血の影響。第 38 回日本脳卒中学会総会 平成 25 年 3 月 21 日～23 日 東京
6. 北川一夫: 脳保護療法の現状と問題点 第 54 回日本神経学会学術大会平成 25 年 5 月 29 日-6 月 1 日 東京
7. 北川一夫: 脳軟膜側副血行発達への高血圧の及ぼす影響。シンポジウム 脳血管障害と高血圧: 診療と研究の最前線。第 36 回日本高血圧学会総会 平成 25 年 10 月 24 日～26 日、大阪
8. 由上登志郎、八木田佳樹、佐々木勉、望月秀樹、北川一夫。脳側副血管発達に対する糖尿病の影響。第 25 回日本脳循環代謝学会総会、平成 25 年 11 月 1 日～2 日、札幌
9. 八木田佳樹、北川一夫、望月秀樹: 局所脳虚血病態における血管内皮機能障害と側副血行発達の関与。シンポジウム ペナンブラの molecular biology。第 39 回日本脳卒中学会総会 平成 26 年 3 月 13 日～15 日、大阪

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:

種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.osaka-njm.net/lab0>

#### 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

佐々木 勉 (SASAKI TSUTOMU)  
大阪大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 20534879