

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790980

研究課題名（和文）脳動脈新生の制御による脳梗塞治療法開発の基礎的研究

研究課題名（英文）Enhanced arteriogenesis for prevention of ischemic brain damage

研究代表者

石橋 哲（ISHIBASHI SATORU）

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30533369

研究成果の概要（和文）：

本研究では、脳血流の低下によるずり応力の増加により、脳表の軟膜動脈の血管径が増加し、さらに動脈構成細胞である血管内皮細胞、平滑筋細胞の増殖が活性化することを確認した。このように脳軟膜動脈を発達させた状態では脳梗塞発症後の梗塞体積が減少し、強い治療効果が確認された。栄養因子の投与などにより、さらなる動脈新生の促進をはかると、梗塞体積はさらに低下した。

また、臨床の脳梗塞例に関しても、動脈新生は中大脳動脈や内頸動脈などの強いずり応力の生じる主幹動脈の強い狭窄、あるいは閉塞により出現し、強い脳保護効果を発揮することを証明した。

研究成果の概要（英文）：

Positive outward remodeling of pre-existing or De-novo collateral arteries into functional conductance arteries, arteriogenesis, is a major endogenous rescue mechanism to prevent ischemic damage after stroke. We, here, investigated the mechanism of arteriogenesis or examined effect on ischemia brain damage by means of promoting arteriogenesis with basic fibroblast growth factor 2 (FGF-2) in experimental chronic brain hypoperfused mice model.

Brain hypoperfusion significantly increased the diameter of leptomeningeal arteries, and the number of proliferating endothelial or smooth muscle cells in the arteries.

Hypoperfused or sham animals underwent subsequent ipsilateral middle cerebral artery occlusion, and infarct volume was assessed. The total infarction volume was significantly decreased in hypoperfused mice than sham-operated animals. FGF-2 administration enhanced collateral artery growth and further reduced infarction volume, resulting in long-term functional recovery.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：ライフサイエンス（共通基礎研究）

科研費の分科・細目：神経免疫

キーワード：脳梗塞、動物モデル、動脈新生、慢性低灌流、ずり応力、FGF-2

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞は本邦における臓器別死因第一位の疾患であり、寝たきりの最大の要因となって

いる。現在急性期脳梗塞に対して、閉塞した血管を再開通させる血栓溶解療法が積極的に施行されているものの、適応症例は非常に

限られている。そのため、再開通療法と同時に脳血流の低下を防ぎ、いかに梗塞に陥らせないかという治療戦略が非常に重要であり、実現すれば非常に多くの脳梗塞症例に適応しうる。実際に成体脳であっても脳梗塞後に新たな血管が形成される現象が認められ、大きく分類して **Angiogenesis** (血管新生) 及び **Arteriogenesis** (動脈新生) の二つが知られている。特に血管内皮細胞だけでなく平滑筋、基底膜よりなる口径の大きな新たな機能する動脈の発達を意味する **Arteriogenesis** (動脈新生) は、脳の主幹動脈が閉塞した場合に側副血行路として機能し、脳血流の保持が可能となる。実際に、我々も脳表の動脈新生の発達した症例では脳梗塞の梗塞体積が減少し、機能予後が良好であることを臨床研究にて確認した。その強い脳保護効果から、動脈新生の発達を促す方法の開発が期待されているものの、未だ開発されていない。その理由として、動脈新生はズリ応力 (shear stress) の増加により促進されるが、その詳細なメカニズムが解明されていないことがあげられる。

2. 研究の目的

本研究では動脈新生を促すことによる詳細な治療効果の検討をまず脳梗塞モデル動物で行い、臨床応用を目指す

1. マウス慢性低灌流モデルを使用し、脳血流低下時での動脈新生メカニズムを解析する

脳表軟膜動脈、ウィリス動脈輪などの側副血行路として機能する口径の大きな動脈に焦点を当て、脳虚血後の動脈新生の経時的変化を解析する。また特に増殖能を有する血管内皮細胞を標識することにより、血管内皮細胞の増殖及び分化、さらには平滑筋、基底膜といった機能する動脈に必須な細胞の新生・発達機序を解析する。

以上から、動脈の「新生メカニズム」が解明でき、新規治療に発展すると考えられる。

2. 動脈新生による脳梗塞に対する効果を検討する

脳を取り巻く動脈を新生させる治療法は殆ど開発されていないが、脳梗塞罹患症例の増加を考慮すると早期に実現可能な治療法を開発する必要がある。慢性低灌流や FGF-2 投与による動脈新生促進が、引き続き脳梗塞に対する治療効果を有するかどうかを検討する。

3. 研究の方法

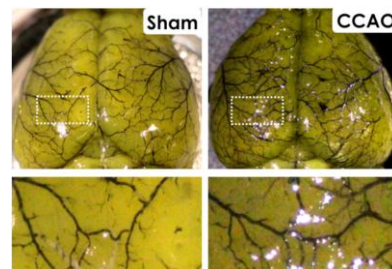
- (1) 慢性低灌流モデルは、C57/B16 マウスの片側総頸動脈を結紮閉塞することにより作成。
- (2) 経時的に脳血流をレーザードップラー

血流計や NanoSPECT/CT (BIOSCAN, D. C., 米国) を用いて測定。

- (3) 脳表の軟膜動脈を latex-墨汁混濁液にて標識し、拡張の有無を定量。
- (4) 組織学的に、血管拡張の有無、BrdU により標識した分裂後細胞の定量。
- (5) 慢性低灌流モデルに対して閉塞側の中大脳動脈を焼却閉塞し、脳梗塞を作成、脳梗塞体積の測定、神経学的機能の評価
- (6) FGF-2 投与により動脈新生がさらに促進さえるか、あるいは引き続き脳梗塞に対する治療効果があるかどうかを検討する

4. 研究成果

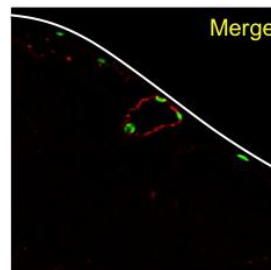
- (1) マウス慢性脳低灌流モデルにおける、脳血流の変化と動脈新生



マウス慢性脳低灌流モデルでは、虚血直後より脳血流が低下し2週間以上の慢性的な脳血流低下を引き起こした。手術2週間後に脳表の動脈を観察すると、上図四角内の血管のように特に NanoSPECT などにより血流の低下が強く見られた部位の軟膜動脈が拡張していた。このことは、組織学的にも確認した。

(2) 動脈新生時の細胞増殖能の検討

軟膜動脈拡張時に、動脈構成細胞である血管内皮細胞や平滑筋細胞が申請されているかを検討した。低灌流刺激のない対照群では、新生細胞はほとんど認められなかったが、慢性低灌流モデルの軟膜動脈には多くの新生内皮細胞及び平滑筋細胞が検出された。特に分裂細胞は慢性低灌流作成7日後に最も多く認められた。

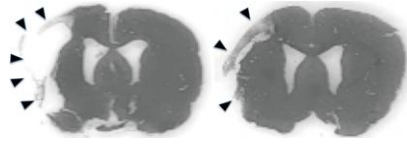


拡張した軟膜動脈には多くの分裂後細胞 (BrdU; 緑) が認められ、一部は血管内皮細胞のマーカー (CD31; 赤) と共局在しており、

新生した血管内皮細胞と考えられる。

(3) 動脈新生の脳梗塞に対する脳保護効果の検討

軟膜動脈を拡張させた段階で、同側の中大脳動脈を閉塞することにより脳梗塞を作成した。軟膜動脈が拡張した慢性脳低灌流群では梗塞体積は明らかに減少していた。



左：対照群、右：慢性低灌流群。慢性低灌流により脳軟膜動脈が拡張すると、脳梗塞発症時の梗塞体積が減少する。

(4) FGF-2 投与による動脈新生促進効果

FGF-2 を慢性低灌流モデルに腹腔内投与することにより、血管内皮細胞、平滑筋細胞の分裂能が亢進し、さらなる動脈新生が認められた。脳梗塞に対する脳保護効果もより強く認められ、FGF-2 非投与慢性脳低灌流群と比較して、FGF-2 投与群では神経機能が改善することが確認された。

(5) 脳梗塞症例における、動脈新生の脳保護効果

脳梗塞症例のデータを解析した。動脈新生は主幹動脈の閉塞や狭窄など、ずり応力が強く発生する状況で発達していた。また、動脈新生が発達している症例では有意に脳梗塞体積が減少し、長期的な神経学的予後が良好であることを確認した。

結論

脳梗塞において、脳動脈新生を促進することで梗塞体積の減少や神経症状の改善が認められ、ずり応力との関連など詳細なメカニズムの解明により、革新的治療法が開発出来ると考えられた。

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 6 件) すべて査読有り

1. Ichijo M, Miki K, Ishibashi S, Tomita T, Kamata T, Fujigasaki H, Mizusawa H. Posterior cerebral artery laterality on MRA predicts long-term functional outcome in middle cerebral artery occlusion. *Stroke*. 2013;44:512-5.

2. Ichijo M, Ishibashi S, Ohkubo T, Nomura

S, Sanjo N, Yokota T, Mizusawa H. Elevated platelet microparticle levels after acute ischemic stroke with concurrent idiopathic thrombocytopenic purpura: a case report. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2013[in press]

3. Iwasawa E, Ishibashi S, Miki K, Yoshino Y, Nemoto S, Mizusawa H. Reversible cognitive impairment with bithalamic lesions caused by a dural arteriovenous fistula. *Neurology* [in press]

4. Yoshioka K, Ishibashi S, Shiraishi A, Yokota T, Mizusawa H. Distal Hyperintense Vessels on FLAIR Images Predict Large-artery Stenosis in Patients with Transient Ischemic Attack. *Neuroradiology*. 2013;55:165-9

5. Kobayashi M, Ishibashi S, Tomimitsu M, Yokota T, Mizusawa H. Proliferating immature Schwann cells contribute to nerve regeneration after ischemic peripheral nerve injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 2012;71:511-519.

6. Yamane J, Ishibashi S, Sakaguchi M, Kuroiwa T, Kanemura Y, Nakamura M, Miyoshi H, Sawamoto K, Toyama Y, Mizusawa H, Okano H. Transplantation of human neural stem/progenitor cells overexpressing galectin-1 improves functional recovery from focal brain ischemia in the mongolian gerbil. *Mol Brain*. 2011;4:35. [first 3 authors equally contributed]

[学会発表] (計 4 件)

1. 石橋 哲、一條真彦、三木一徳、水澤 英洋. 慢性脳低灌流モデルにおける軟膜動脈の S1P1 受容体発現と血管内皮細胞分裂能の検討. 第 54 回日本神経学会学術大会. 東京. 2013. 5. 31.

2. 石橋哲、坂口昌徳、山根淳一、金村米博、中村 雅也、澤本和延、戸山 芳昭、岡野栄之、水澤英洋. 局所脳虚血モデルに対するガレクチン-1 遺伝子導入ヒト神経幹細胞移植効果の検討. 第 53 回日本神経学会学術大会. 東京. 2012. 5. 23.

3. 石橋哲. 脳梗塞後の制御性 T 細胞誘導が neurovascular niche に与える効果の検討. 第 46 回血管研究会. 東京. 2011. 10. 20.

4. 石橋哲、小林正樹、水澤 英洋. マウス

慢性脳低灌流モデルにおける軟膜動脈の血管内皮細胞分裂能の検討. 第 52 回日本神経学会総会. 名古屋. 2011. 5. 19.

〔図書〕(計 1 件)

1. 石橋哲、水澤英洋. 脳梗塞の急性期治療. Physicians' Therapy Manual 2011;1:6.

〔その他〕

ホームページ等

東京医科歯科大学神経内科 website

<http://www.tmd.ac.jp/med/nuro/study.html#5>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石橋 哲 (ISHIBASHI SATORU)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号 : 30533369

(2) 研究分担者

なし