

論文の内容の要旨

論文題目 脳血管構築と脳虚血後の組織傷害の関係
 -レニンアンギオテンシンシステムに注目して-

氏名 前田佳一郎

レニン-アンギオテンシンシステム (RAS) は体内に広く分布し、血圧や電解質の調節に重要な役割を担っている。脳虚血との関連では、中大脳動脈閉塞モデルを使った実験において、アンギオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害剤の投与によって虚血傷害が軽減されることが報告されている。さらに臨床例の遺伝子解析の結果からは ACE やアンギオテンシノーゲン (AGN) の遺伝子異常により RAS の活動度が上がることが脳梗塞のリスクファクターであることが報告されている。このことは RAS の活性が高いことが脳虚血の悪化要因になっている可能性があることを示しているが、そのメカニズムはいまだはっきり解明されていない。しかし ACE 阻害剤は最も多く使われている降圧剤の一つであり、RAS の抑制によって脳虚血を治療しうるかを研究することは意義深いと考える。

脳虚血の実験では、薬剤の効果やある遺伝子の虚血における役割を調べるため、ラットやマウスで中大脳動脈を閉塞し、梗塞面積あるいは体積を評価するのが一般的である。中大脳動脈本幹の閉塞後には、虚血となったその支配領域の脳は主に前大脳動脈と中大脳動脈の間の吻合血管を介して灌流される。よって脳虚血後の組織傷害にその吻合血管の数、径、機能は強く影響すると考えられる。実際にラットを用いた脳虚血実験では、ラットの種による中大脳動脈閉塞後における梗塞面積の差に、吻合血管の径が関与することが示

されている。従って脳虚血の実験結果の解釈には、薬剤や遺伝子の変異が脳の血管構築に影響しそれが虚血後の組織障害に反映されることを考える必要がある。

RAS 中の主要な作用物質であるアンギオテンシン II は血管壁の肥大やトーンズに関連している。従って RAS は吻合血管の径や機能に影響を与え、その結果として脳虚血後の組織障害の程度に関与していることが考えられる。RAS の働きを抑制することによって脳血管構築に変化を与えそれが虚血後の脳組織障害を軽減する方向に働くかを調べるのに、RAS 全体の前駆物質であるアンギオテンシノーゲンのノックアウトマウスを用いることは有効な手法である。しかしマウスの脳の血管構築を観察する方法は報告されていない。そして脳血管構築の変化が脳虚血後の組織障害にどのように反映されるかもわかっていない。

多くのマウスの系の中でも、C57Black/6 マウス (C57Black/6) と SV129 マウス (SV129) は遺伝子操作マウスを作るための親種として最もよく使われ、またこの2つの系間で中大脳動脈閉塞後に梗塞面積が異なることが知られている。その理由として最も考えられるのは、吻合血管の径や機能及び中大脳動脈の支配灌流領域などの脳血管構築が2つの系で異なることである。そこで今回の実験ではまずこの2つの系で着色したラテックスを脳の血管に注入して、脳の血管構築を調べることにした。そして中大脳動脈の支配灌流領域及び吻合血管の数や径が、中大脳動脈閉塞後の虚血障害とどのような関係があるかを評価した。その結果、脳の血管構築と中大脳動脈閉塞後の組織障害とは極めて合理的で密接な関係があることを示し得た。

次に RAS 全体の前駆物質である AGN のノックアウトマウスを用いて、RAS の活動度の低下が脳の血管構築にどのような影響を与えるかを調べた。そして RAS の活性の低下が脳の血管構築に影響し、それが中大脳動脈閉塞後の虚血障害を軽減するかを検証することを本実験の最終的な目的とした。

まずマウスにおける脳表微小血管構築を観察するために、C57Black/6 及び SV129 に塩酸ババベリンを過剰投与して全身の血管を最大拡張した後に、着色した latex を血管に注入して血管を固定した。脳を取り出し脳表を背側真上から写真に撮って拡大し、前大脳動脈と中大脳動脈の枝が交わる部分、つまりは中大脳動脈閉塞後に前大脳動脈からの側副血行路となる吻合血管を同定した。隣接する吻合血管同士を線で結ぶことで前大脳動脈、中大脳動脈の還流支配領域の吻合境界線を作った。吻合境界線の脳半球中心からの距離を測定し、さらに吻合血管の本数と径を測定した。C57Black/6 では前大脳動脈と中大脳動脈の吻合境界線は SV129 に比べて脳の前半部、中央部、後半部いずれの部位でも有意に中心に近く、このことは C57Black/6 で中大脳動脈の灌流領域がより大きいことを示していた。しかしながら吻合血管の数、吻合血管の径ともに

有意な差はなかった。

次に塞栓系を用いた方法で C57Black/6 と SV129 に中大脳動脈閉塞を作成して、脳虚血後の組織傷害を調べた。まず閉塞後 24 時間で脳梗塞の大きさを両マウス間で比較したところ、C57Black/6 では有意に SV129 より梗塞面積は大きかった。さらに大脳前縁から 4mm の部位で梗塞を皮質の部分の梗塞と皮質下の部分に分けて比較すると、皮質の部分においてのみ C57Black/6 で有意に SV129 より梗塞面積は大きかった。具体的に脳表の血管構築と中大脳動脈閉塞後の組織傷害の関係を調べるために、中大脳動脈閉塞 24 時間後に latex を血管に注入して脳表血管を描出してから脳表を 2,3,5-triphenyltetrazolium hydrochloride にて染色を行って、梗塞部位と脳血管構築の関係を検討した。C57Black/6 では吻合境界線、梗塞と正常組織との境界線のどちらも SV129 に比べて大脳の前半部、中央部、後半部いずれの部位でも有意に中心に近かった。ところが吻合血管を介する脳血流によって救われた脳組織の大きさを反映すると考えられる吻合境界線と梗塞正常境界線の距離は、両マウス間で大脳前半部、中央部で差はなかった。

さらに以上示した血管構築の違いが、虚血侵襲を受けているが治療によって救済可能でありそのため脳虚血研究の主要なターゲットとなっているペナンブラ領域の面積に影響するかを調べた。C57Black/6 と SV129 で中大脳動脈閉塞後 1 時間で、大脳前縁から 4mm の部位の脳スライスを作り組織中の ATP 含有、及び蛋白合成能が傷害されている部分の面積を両マウスで測定した。蛋白合成が阻害されているが ATP は保たれている部分をペナンブラ領域と定義した。C57Black/6 は有意に SV129 と比較して ATP 欠乏領域、蛋白合成低下領域の面積は大きかった。ペナンブラ領域の範囲は血管支配領域の差を反映して C57Black/6 で SV129 と比べて外側に変位していたものの、ペナンブラ領域の面積に両方のマウスで差はなかった。

次に RAS の活動度が脳の血管構築と脳虚血後の組織傷害にどのように関与しているかを、アンジオテンシノーゲンノックアウトマウスのワイルドタイプ(WT)とホモタイプ(HT)を比較することによって検討した。まず上記と同様の方法で着色した latex を血管内に注入して脳の血管構築を描出した。前大脳動脈と中大脳動脈の吻合境界線の大脳半球中心からの距離は WT、HT で差がなかった。吻合血管の数でも同様に差がなかった。しかし吻合血管の径では HT が WT より有意に太かった。

続いて虚血後の脳組織傷害を比較した。まず中大脳動脈閉塞後 24 時間で両者の梗塞面積を調べたが、HT 及び WT で有意な差はなかった。さらに中大脳動脈閉塞後 1 時間及び 24 時間で大脳前縁から 4mm の部位の脳スライスを作り組織中の ATP 含有、及び蛋白合成能が傷害されている部分、及びペナンブラ領域の面

積を測定した。閉塞後 1 時間では、組織 ATP の減少している領域は WT で HT に比べて有意に大きかったが、それに反して蛋白合成の障害されている領域には差がなかった。その結果としてペナンプラ領域は HT で有意に WT より大きかった。閉塞 24 時間後では、蛋白合成の阻害されている部分は WT、HT ともに閉塞 1 時間後とほとんど変化なく、両群間に差はなかった。組織 ATP の減少している領域はほぼ蛋白合成の阻害されている領域に重なるまで両群とも拡大しており、両群間に有意な差はなくなっていた。ペナンプラ領域は両群ともほぼ消失しており差はなかった。

生理学的因子として、中大脳動脈閉塞前、及び閉塞後 15 分で平均血圧、動脈血酸素分圧、動脈血二酸化炭素分圧、動脈血 pH を測定した。平均血圧は閉塞前、後とも WT が HT に比べて高かった。動脈血酸素分圧、動脈血二酸化炭素分圧、動脈血 pH は差がなかった。

C57Black/6 と SV129 の脳血管構築を着色したラテックスで描出することによって、脳表のマウスの微小な血管の観察及び評価を可能にした。その結果、中大脳動脈の支配還流領域が C57Black/6 で大きいこと、またこの 2 つのマウスの系では前大脳動脈と中大脳動脈の間の吻合血管の数と径は同様であることを明らかにした。中大脳動脈閉塞後早期の脳代謝障害及び 24 時間後の脳梗塞は C57Black/6 で SV129 より大きかったが、中大脳動脈閉塞後早期のペナンプラ領域の大きさや 24 時間後に吻合血管を介しての血流で救われる脳組織の大きさに差はなかった。この結果から、中大脳動脈閉塞後の脳虚血障害は脳の血管構築と密接な関係があることが示された。

またアンギオテンシノーゲンノックアウトマウスを用いた実験結果で、HT では WT に比較して血圧が低いにも関わらず中大脳動脈閉塞後早期の脳代謝障害は軽度であり、ペナンプラ領域は大きかった。そしてその理由として、HT は WT に比べて前大脳動脈と中大脳動脈の間の吻合血管が太く側副血行が良好であるためであることが示唆された。しかしながら中大脳動脈閉塞 24 時間後では、脳梗塞の大きさや脳代謝障害の程度に HT と WT に差はなかった。以上より、RAS を薬物的に抑制することでペナンプラ領域を拡大し脳虚血発症後の治療の有効時間を延長できる可能性があると考えられた。しかしながら RAS の抑制のみでは虚血部位の脳代謝障害は時間とともに進行しその効果は一時的であるため、脳虚血後の予後を改善するためにはそのほかの治療を組み合わせる必要があると考えられた。