

[別紙 1]

論文内容の要旨

Effect of thrombolysis on the dynamics of infarct evolution and gene expression after middle cerebral artery clot embolism in mice

マウス中大脳動脈塞栓モデルにおける血栓溶解療法後の
脳梗塞進展および遺伝子発現

原 貴行

(はじめに)

急性期脳梗塞の治療として recombinant tissue-type plasminogen activator (rt-PA) 投与による血流再開 (再灌流) が発症後 3 時間であれば有効であることが報告されている。一方で再灌流(reperfusion)そのものがフリーラジカルの産生、炎症反応の誘起等で障害を引き起こすことが基礎実験から確認されており、この再灌流障害 reperfusion injury を抑制することで rt-PA による血栓溶解療法の効果をさらに高めることが予想され、現在までに多くの薬剤が開発されてきた。しかし動物実験で有効性を確認されたそれら薬剤のほとんどが臨床試験では効果なしと判定されている。その原因の一つとして動物の脳梗塞モデルと実際の人間の脳梗塞の違いが挙げられる。

局所脳虚血の実験にラット・マウスで広く用いられているモデルとして血管内にシリコンコートした塞栓子(thread)を挿入し中大脳動脈の起始部を閉塞し、一定期間の後除去して再灌流を引き起こすモデル (intraluminal thread occlusion model) があるが、これは人間の脳梗塞とは発生機序および再灌流の様式においてかなりの隔りがある。そこで今回さらに human stroke に近いモデルをマ

ウスで確立し虚血時および再灌流時での脳循環・代謝状態および代表的な遺伝子発現を評価した。

(研究方法)

雄の C57/Bl6J マウスで体重が 20g から 30g のものを用いた。塞栓物質としては他家血 0.4ml をトロンビン 0.08ml と混合し内径 0.28mm の PE10 チューブに注入し 37°C で 2 時間その後 4°C で 22 時間保存した。その後生理食塩水中で赤血球を洗浄し、顕微鏡下でいわゆる fibrin rich segment を選び 4mm のものを 4 つ用意した。この血栓をあらかじめ装填しておいた PE10 カテーテルをマウスの外頸動脈に導入し内頸動脈にむけて注入し局所脳虚血を作成した。虚血を作成して 1 時間後に血栓を注入したカテーテルから 10mg/kg の rt-PA を 30 分かけ注入し血栓溶解・再灌流を試みた。非治療群には同量の溶解液(Vehicle)を用いた。治療開始前(1時間脳塞栓)、治療開始後1時間、3時間、6時間および24時間後にマウスを液体窒素にて固定し、脳を取り出した後クリオスタットで厚さ 20 μ m の凍結切片を作成し、以下のパラメータをそれぞれ附記した方法で測定した。

脳血流量(Cerebral Blood Flow : CBF) : 14 C-iodoantipyrine (IAP) オートラジオグラフィ法。

脳蛋白合成能(Cerebral Protein Synthesis : CPS) : 3 H-leucine によるオートラジオグラフィ法。

エネルギー代謝 : ATP 特異的 bioluminescence 法。

アポトーシス検出 : terminal transferase biotinylated-UTP nick end labeling (TUNEL) 法。

遺伝子発現 : *c-fos*, *junB*, heat shock protein 70 (*hsp70*) および neuron specific enolase (*NSE*) mRNA に対する in situ hybridization 法

組織学的変化 : 銀染色(Silver impregnation)。

(結果)

1. 血流・代謝パラメータの変化 : 虚血作成後 1 時間には蛋白合成能(CPS)、エネルギー代謝(ATP)とも虚血側の MCA 領域で低下しているが蛋白合成能低下の範囲はエネルギー代謝のそれに対し 10%程度大きく、いわゆる metabolic penumbra が存在していた。この部分は rt-PA による血行再開がない場合(非治療群)は時間経過とともに縮小し、24 時間後にはほぼ消失した。虚血導入後 1 時間で rt-PA を投与した群では血流再開とともに ATP は回復、24 時

間後までに2次的な低下も認められなかった。CPSはATPよりはずっと遅いものの24時間後には部分的ではあるがやはり改善が認められていた。

2. 遺伝子発現

2-1. Immediate early genes (IEGs): *c-fos*, *junB* はいわゆる正常代謝領域(CPS, ATPとも保たれている領域)に主に発現していた。非治療群ではこれら mRNA の発現は遷延しており 24 時間後にも 5 匹中 2 匹で同部位に発現していた。治療群で血流が再開した後も 3 時間後までは発現がつづいていたがそののち消退し 6 時間後にはすべてのマウスで発現が停止していた。

2-2. heat shock protein 70 (hsp70) mRNA: 非治療群では *hsp70* mRNA の発現は metabolic penumbra の領域に厳密に一致して発現し、その消失とともに停止したが、治療群では再灌流に伴う CPS/ATP-mismatch の部分に強く発現し、これは 24 時間後まで継続した。

2-3. Neuron specific enolase (NSE) mRNA: NSE mRNA は虚血後ゆっくりと低下するがその変化(時間経過および領域)は治療群・非治療群とも組織学的な変化と一致していた。

(考察)

Hossmann らによると、蛋白合成能低下の血流閾値は 55ml/mg/min であるのに対し ATP 産生のそれは 20ml/min/mg である。つまり血流量がこの間にある脳組織は蛋白合成は抑制されているがエネルギー代謝は保たれているということになる。今回我々が作成したマウスの局所脳虚血モデルにおいても虚血中心部 (infarct core) は血流が 20ml/min/mg 以下になっており蛋白合成もエネルギー代謝も抑制されていると思われ、その近傍では血流量が少しずつ多くなり、蛋白合成能のみが障害されている領域も存在しそれが metabolic penumbra として捉えられている。しかし血流再開やその他なんらかの治療なしにはこの部分は次第に消失してゆくことが今回の実験では明らかとなった。一方で rt-PA による血栓溶解療法で血流が再開した場合においてはこれらの代謝パラメータも顕著な回復をしめた。最初にエネルギー代謝(ATP 産生)が、それに数時間遅れて蛋白合成能も回復しはじめ、これは 24 時間後まで保たれていた。この代謝の改善のダイナミックスは同一動物における transient thread occlusion model のそれとは大きく違っており、これが今回の研究で得られたもっとも重要な知見である。Transient thread occlusion model の場合には thread を引き抜くことで急速に血流が再開され、それに伴い ATP 産生の回復も thrombolysis より早く起こり一

且は完全に回復したように思われるが、数時間後に2次的な脱落が始まり結局最終的には最初の lesion とほとんど同じとなる (secondary energy failure phenomenon)。また蛋白合成能はほとんど回復を認めないことが過去の研究から報告されている。この secondary energy failure phenomenon が今回の脳塞栓モデルで認められない理由としては虚血後の hypoperfusion が血栓溶解モデルの方で軽度であることが挙げられる。

遺伝子発現に関しては、*c-fos*, *junB* といった immediate early genes の発現、特に虚血巣周囲の正常代謝領域における発現は peri-infarct depolarization を反映していると言われており、虚血後1時間におけるこれら遺伝子の発現はこの段階で peri-infarct depolarization が起きていることを間接的に示している。その後 rt-PA による血栓溶解、血流再開なしではこれらの遺伝子発現が遷延しているのに対し、thrombolysis を行った群では治療後3時間で正常化していることから thrombolysis による血流再開は組織の repolarization を起こし、梗塞の進展を止めているものと思われる。Molecular chaperon として働き、変性した蛋白の発見と修復を担っていると言われる heat shock protein 70 の mRNA はいわゆる metabolic penumbra と言われる領域に発現しており、組織の代謝状態を間接的に知りうるよいマーカーとなりうるが、非治療群では発現領域は最終的に死に至り、rt-PA 投与群では代謝パラメータの回復につながっていることから、この遺伝子の発現そのものは最終的な転帰を予見するものとはなり得ない。

(結語)

以上のように同一動物においても、モデルが異なると脳梗塞進展にも大きな違いが認められており、今後トランスジェニック・マウスを用いて脳梗塞のメカニズムを探ったり、新たな治療薬の開発を行う際にはそれぞれのモデルにおける違いを認識する必要がある。