

[別紙 1]

## 論文の内容の要旨

論文題目     ラットくも膜下出血モデルにおける Heat Shock Protein 72  
                  の誘導と脳血管攣縮における治療的役割

指導教官     桐野高明教授

東京大学大学院医学系研究科

平成10年4月入学

医学博士課程

脳神経医学専攻

氏名   二階堂洋史

〔目的〕遅発性脳血管攣縮は、くも膜下出血 (SAH) 後 3 日目から 9 日目に生じる持続的血管狭窄である。SAH となった患者の 27-38% に虚血症状が出現する病態と一般に言われている。近年、手術や術後の医療管理が進歩したとはいえ、脳血管攣縮によって 26-38% の患者が厳しい後遺症を残したり死に至っている。薬理的、生理学的見地からすると攣縮状態が 1-2 週間も続くとは考えにくく、SAH 後の遅発性脳血管攣縮の病態における分子機構はいまだ解明されていない。今日では、多岐にわたる因子が複雑に関与している説が最も有力である。遅発性脳血管攣縮に対してさまざまな新たな治療法が試みられているが、有効な治療法は確立されていないのが現状である。しかし注目すべきことに、脳血管攣縮は SAH 後 14 日目以降となると自然に解除されていくという特徴がある。脳血管攣縮に対する研究はその発生機序に焦点が置かれており、自然解除の機構に関しての研究はほとんどされていない。そこで我々は、遅発性脳血管攣縮の自然解除の機構を明らかにすることにより、脳血管攣縮治療に対する新しい戦略を試みた。今回我々はラット SAH 後脳血管攣縮モデルを確立し、脳底動脈における mRNA の発現プロファイルを比較検討した。脳血管攣縮関連遺伝子

の探索を行った結果、Heat shock protein 72 (HSP72)が脳底動脈において脳血管攣縮の程度に相関し誘導されていた。本研究では HSP72 における遅発性脳血管攣縮の治療的役割を中心に報告する。

[本文] 今回我々は自家動脈血を 1 回大槽内に注入し、ラット SAH 後脳血管攣縮モデルを確立した。コントロールとして生食の大槽内投与モデルおよび無治療モデルを作成した。脳血管撮影においてラット脳血管攣縮は SAH 後 1 日目から出現し、2 日目に最大の血管狭窄となり、その後次第に狭窄は寛解し 7 日目には脳血管攣縮は改善した。0.3 ml SAH では最も強く脳血管攣縮が生じる 2 日目に脳底動脈が 14%狭窄したが、0.5 ml SAH では 24%狭窄となり、0.3 ml SAH と 0.5 ml SAH を比較すると脳血管攣縮の出現時間や消退時間は同じで、攣縮の程度のみに相違を認めた。今回のラットモデルにおいて、脳血管攣縮の程度は、投与した自家動脈血の容量に依存していると推測された。

Fluorescent Differential Display (FDD)法によりその遺伝子発現プロファイルを比較検討し、脳血管攣縮関連遺伝子について検索し、解析を行った。脳血管攣縮が最も強く生じる 2 日目を中心に 1 日目から 3 日目の脳底動脈における mRNA の発現プロファイルを比較検討した。primer 数を 100 組使用し解析した結果、総数 12023 bands のうち SAH 後脳血管攣縮に特異的に発現が変化した遺伝子は約 9%(1061 bands)認めた。この発現変化した遺伝子 1061 bands のうち up-regulation した遺伝子は 90.4%、 down-regulation した遺伝子は 9.59% 認めた。この遺伝子のシークエンスを行い、ホモロジー検索を行った所、110 の既知遺伝子を見つけた。このうち up-regulation していた遺伝子は 100 genes (90.9%)、down-regulation していた遺伝子は 10 genes (9.09%)であった。これらの遺伝子群のうち我々は脳血管攣縮の時期に一致して up-regulation した HSP72 に注目し解析を行った。

0.5 ml SAH 後、脳底動脈における HSP72 の誘導を RT-PCR にて評価した。Day 2 において HSP72 mRNA が無治療ラットに比較し 8.0 倍の up-regulation を認めた。また、同様に生食大槽内投与に比較し 1.9 倍の up-regulation を認めた。SAH 後 HSP73 の誘導は生食大槽内投与に比較し変化を認めなかった。Real-time RT-PCR では、Day 2 において HSP72 mRNA は生食大槽内投与に比較し 1.8 倍強く誘導されていた。HSP72 のみ認識する特異的な抗体を使用した Western blot では、Day 2 において HSP72 protein が生食大槽内投与に比較し 2.7 倍の up-regulation を認めた。

脳底動脈における HSP72 誘導の分子機構を評価するため、antisense HSP72 oligodeoxynucleotide (ODN) をラット大槽内に投与し、HSP72 誘導を選択的に抑制し脳血管攣縮の変化を評価した。RT-PCR では、antisense HSP72 ODN 大槽内投与によって 0.3 ml SAH 後 Day 2 における HSP72 mRNA の誘導を顕著に抑制し、HSP72mRNA の発現を 57.6%低下した。Real-time RT-PCR では、antisense HSP72 ODN 大槽内投与によって 0.3 ml SAH 後 Day 2 における HSP72 mRNA の誘導を 0.74 倍に抑制した。antisense HSP72 ODN 大槽内投与による遺伝子発現抑制効果は、タンパクレベルの発現も抑制すると考えられる。Western blot で評価を行った所、antisense HSP72 ODN 大槽内投与によって、0.3 ml SAH 後 Day 2 における HSP72 タンパクの発現が 54.1%低下した。脳血管撮影では、antisense HSP72 ODN 大槽内投与により 0.3 ml SAH 後、脳血管攣縮がより増加し、血管の狭窄が強くなっていた。Day 1 から 5 にかけて顕著に攣縮の悪化をきたし、特に Day 2 と 3 において統計学的な有意差を認めた。一方、sense HSP72 ODN 大槽内投与では、SAH 後の脳血管攣縮とほぼ同等なパターンを呈しており変化を認めなかった。Day 3 以降 antisense HSP72 ODN 大槽内投与による SAH 後脳血管攣縮の悪化はしだいに改善し、Day 6 から 7 になると sense HSP72 ODN 大槽内投与後または SAH 後の脳血管攣縮とほぼ同等なパターンとなった。antisense HSP72 ODN の大槽内局所投与により SAH 後、脳底動脈における HSP72 の発現が抑制され、脳血管撮影では脳血管攣縮が悪化した。以上の結果から少なくとも HSP72 には、遅発性脳血管攣縮に対して防御的作用を持つことが示唆された。

胃粘膜などの組織において HSP72 を誘導させる消化性潰瘍治療薬、geranylgeranylacetone (GGA) をラットに 1 回経口投与することにより、脳および脳底動脈に HSP72 が有意に誘導させることができた。SAH 後 HSP72 は脳底動脈に誘導されることを示したが、次に GGA を加え HSP72 誘導をより増強させた場合、遅延性脳血管攣縮はどのように変化するか検討した。SAH 後 GGA を 12 時間ごとに経口投与したところ、RT-PCR では SAH 後 1 日目より HSP72 mRNA の誘導が強く認められ、2 日目では有意に発現が誘導された。Western blot では、SAH 後 2 日目から 3 日目にかけて HSP72 タンパクが有意に誘導されていた。脳血管撮影において、SAH 後 GGA 経口投与により HSP72 誘導を増強させた所、1 日目から脳血管攣縮の程度が寛解し 2 日目の最大攣縮期に血管の狭窄が減弱していた。脳血管撮影では SAH 後 1 日目から 3 日目かけて有意に攣縮の寛解をきたしていた。以上の所見より、SAH 後 GGA 経口投与によりラット脳底動脈に HSP72 を誘導

させることにより、脳血管攣縮は顕著に改善し、その結果 HSP72 は脳血管攣縮に対して拮抗的に作用していると考えられた。GGA による HSP72 の誘導によって脳血管攣縮を防御および寛解させることが出来た。

GGA による HSP72 の誘導のメカニズムは、PKC および HSF1 を介して行われると報告されている。今回の研究でも、GGA の同様の機序により SAH 後 GGA の経口投与によりラット脳や脳底動脈に HSP72 誘導を増強させたと思われる。HSP72 には、内皮細胞障害、アポトーシス、フリーラジカルに対する防御作用、起炎物質産生の抑制作用と同様に、細胞障害によって引き起こされた血管平滑筋細胞の増殖や壊死に対して細胞保護作用を認める。このような細胞障害は遅延性脳血管攣縮で報告されている諸説の病態と同様の現象であり、HSP72 は、SAH 後遅延性脳血管攣縮の病態で見られる細胞障害に対して防御的かつ生体保護的に作用していると推測された。

[結語] HSP72 は脳血管攣縮における抗攣縮分子であることが明らかとなった。HSP72 は脳血管攣縮病態における新たな創薬ターゲットであり、GGA は HSP72 誘導を介して抗攣縮効果を示した。

今後の研究では、GGA の防御的作用が選択的に HSP72 誘導によって引き起こされているか証明して行く必要がある。