

## 学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
渡部 琢治	主査 教授 黒 岩 敏 彦 副査 教授 花 房 俊 昭 副査 教授 宮 崎 瑞 夫 副査 教授 北 浦 泰 副査 教授 窪 田 隆 裕
主論文題名 Postischemic intraventricular administration of FGF-2 expressing adenoviral vectors improves neurologic outcome and reduces infarct volume after transient focal cerebral ischemia in rats (ラット一過性局所脳虚血モデルにおける FGF-2 発現アデノウイルスベクター脳室内投与による神経学的改善と梗塞巣縮小効果に関する検討)	
学位論文内容の要旨	
<p>《緒言》</p> <p>近年、閉塞性脳血管障害に対する治療法は進歩が見られるものの、依然として我が国における死因の第 3 位を占めている。塩基性線維芽細胞増殖因子(FGF-2)は組織再生を促進し、再生医療への幅広い応用が期待されている増殖因子である。中枢神経系においても神経細胞、グリア、血管内皮細胞へ trophic factor として作用し、それに伴う神経再生や神経保護効果が注目されている。しかし、FGF-2 は分子量が 18 kDa と非常に大きく、全身投与した場合には血液脳関門の存在により、虚血領域において効果的に発現することは困難であることが推測される。また、全身投与に伴う白血球増加や低血圧等の全身合併症の報告もある。そこで申請者は、脳局所でより強力に発現させることを目的として、既に開発した複製不能型 FGF-2 発現アデノウイルス(AxCAMAssbFGF)を定位的に脳室内投与し、その神経保護効果について評価した。ラット一過性中大脳動脈閉塞モデルを用い、主に脳梗塞発症後の神経症状の改善度の変化、中大脳動脈領域の梗塞面積の縮小効果という観点より検討した。</p> <p>《対象及び方法》</p> <p>一過性中大脳動脈閉塞モデルは、糸付きシリコン塞栓子を内頸動脈から挿入して中大脳動脈起始部を閉塞し、塞栓子を 2 時間後に抜去する再還流モデルを用いた。塞栓子抜去直後に stereotactic head-holder (DAVID KOPF, model 900)を使用し、定位的に AxCAMAssbFGF を脳室内に投与した。脳梗塞発症後の神経症状の変化を評価するために、発症後の day1、4、7、14、21、28、35 に modified Neurological Severity Scores (NSS)により神経症状を検査した。比較検討のため虚血のみを加えた群(非投与群)、control virus として lacZ 発現型アデノウイルスを投与した群(AxCALacZ 投与群)を設け、これら 3 群間で比較検討した。35 日目に神経症状を評価した後、脳を摘出して 2mm 間隔の冠状断で等分割し、10 μm 厚で H.E.染色標本を作製した。それぞれの梗塞面積を Scion Image (Version Beta 4.0.2, Scion Corporation, Frederick, MD)を使用して測定した後、それらの総和を健側の容量に対する割合で算出した。また、これらは発症 48 時間後の摘出脳においても同様の方法で検討した。次に 3 群それぞれにおいて、発症 48 時間後の脳脊髄液中、および梗塞巣側の脳</p>	

実質中の FGF-2 濃度を ELISA 法を用いて測定し、比較検討した。最後に非投与群と AxCAMAssbFGF 投与群において FGF-2 の免疫組織染色を行い、脳内での発現様式を観察した。

統計処理には one-way ANOVA を使用し、平均値±標準偏差で示した。P 値 0.05 以下を有意とした。

## 《結果》

### 1) 脳梗塞発症後の神経症状の改善度の検討

脳梗塞発症 14、21、28、35 日後において、AxCAMAssbFGF 投与群では AxCALacZ 投与群、非投与群と比較して有意に神経症状が改善した。AxCALacZ 投与群と非投与群においては差は認められなかった。

### 2) 脳梗塞体積への影響の検討

発症 2 日後においては非投与群で  $37.0 \pm 4.3\%$  (n=5)、AxCALacZ 投与群で  $36.9 \pm 3.4\%$  (n=4)、AxCAMAssbFGF 投与群で  $20.6 \pm 6.6\%$  (n=5) と AxCAMAssbFGF 投与群においてのみ有意に脳梗塞の縮小が確認され、非投与群と比較して 44.3% の縮小効果が得られた。発症 35 日後においても非投与群で  $34.4 \pm 2.1\%$  (n=6)、AxCALacZ 投与群で  $31.9 \pm 6.1\%$  (n=4)、AxCAMAssbFGF 投与群で  $19.9 \pm 5.5\%$  (n=8) と AxCAMAssbFGF 投与群においてのみ有意に脳梗塞の縮小効果が確認された。

### 3) 脳脊髄液、脳実質中における FGF-2 定量

発症 2 日後の脳脊髄液中における FGF-2 定量では、AxCAMAssbFGF 投与群で  $17.7 \pm 7.7$  ng/ml が検出されたが (n=4)、他の 2 つの group (n=4 in each group) では殆ど検出されなかった。脳実質中においては、非投与群で  $20.5 \pm 3.6$  pg/mg、AxCALacZ 投与群での  $14.4 \pm 2.1$  pg/mg (n=4 in each group) に対し、AxCAMAssbFGF 投与群で  $374.4 \pm 140.8$  pg/mg (n=4) と有意に高値を示した。

### 4) FGF-2 免疫組織染色

非投与群においてもわずかに FGF-2 陽性細胞を認めたが、AxCAMAssbFGF 投与群においては FGF-2 陽性細胞は脳室壁に沿って強く発現し、そこから脳実質内にかけて gradient pattern を呈しながら発現を認めた。

## 《考察》

これまでに外因性 trophic factor を虚血負荷前に事前に投与し、angiogenesis、神経症状の改善、梗塞巣の縮小等を認めた報告は散見される。しかし FGF-2 を静脈内投与した場合、全身合併症の問題や *in vivo* において半減期が限られているとの報告もある。申請者は、FGF-2 を蛋白としてではなく adenoviral vector を用いた gene transfer により、虚血発症後の投与においても脳局所でより強力な trophic factor として発現することを期待した。虚血モデルに対して、adenoviral vector を用いて FGF-2 を脳室内投与し、その効果を見たのは本研究が最初である。その結果、虚血発症後に AxCAMAssbFGF を投与した場合でも神経症状の改善、梗塞巣の縮小効果が得られることを確認した。また、AxCAMAssbFGF 投与群における FGF-2 定量では、脳実質、脳脊髄液中で FGF-2 の有意な高発現を確認し、FGF-2 免疫組織染色においては、脳室周囲の脳実質だけでなく梗塞巣においてもその発現を認めた。FGF-2 の神経保護効果の機序に関しては、これまでに angiogenesis、neurogenesis、あるいは anti-apoptosis 作用等の観点からいくつかの報告があるが意見の一致を見ない。本研究においても、その効果機序に関しては結論を見ないが、少なくとも脳内における FGF-2 蛋白量の上昇が脳梗塞後の神経症状の改善、梗塞巣の縮小に関与していることは間違いないと考えられる。従来の方法と異なり脳室内投与という操作が加わるものの、一回投与により虚血発症後モデルに於いても非常に満足すべき効果が得られることが確認され、今後の脳梗塞治療を考える上で一助となると考える。

## 審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	渡 部 琢 治
論文審査担当者		主 査 教 授	黒 岩 敏 彦
		副 査 教 授	花 房 俊 昭
		副 査 教 授	宮 崎 瑞 夫
		副 査 教 授	北 浦 泰
		副 査 教 授	窪 田 隆 裕
<p>主論文題名</p> <p>Postischemic intraventricular administration of FGF-2 expressing adenoviral vectors improves neurologic outcome and reduces infarct volume after transient focal cerebral ischemia in rats  (ラット一過性局所脳虚血モデルにおける FGF-2 発現アデノウイルスベクター脳室内投与による神経学的改善と梗塞巣縮小効果に関する検討)</p>			
論文審査結果の要旨			
<p>近年、脳梗塞に対する実験的遺伝子治療が報告されているが、多くは虚血発症前に神経栄養因子を経静脈的に持続投与するか、虚血巣に直接移植投与する方法がとられてきた。その理由として、脳には血液脳関門という解剖学的特徴があり、虚血部位において投与薬剤の効果を効率的に発現させることが容易ではないことが挙げられる。申請者は、塩基性線維芽細胞増殖因子(FGF-2)の持つ細胞レベルでの様々な trophic factor としての機能に着眼し、複製不能型 FGF-2 発現アデノウイルスベクター(AxCAMAssbFGF)を用いて、脳虚血急性期においてその効果をより効率的に発現することを目指した。また、全身投与に伴う他臓器への副作用や血液脳関門の問題を克服するため、投与方法に関しても従来の方法とは異なる脳室内投与方法を行った。申請者はこのような独自の手法を用い、ラット一過性中大脳動脈閉塞モデルにおいて AxCAMAssbFGF の神経保護効果を評価した。その結果、脳実質中の有意な FGF-2 濃度上昇を確認し、免疫染色によりその発現パターンを確認することができた。これにより、虚血発症後の投与という臨床に則した投与時期においても神経症状の改善と梗塞巣の縮小効果が得られ、優れた神経保護効果を確認することができた。神経栄養因子をウイルスベクターを使用して脳室内投与するという初めての方法ではあるが、特に大きな合併症も認めなかった。よって脳梗塞に対する FGF-2 発現アデノウイルスベクター脳室内投与は有望な治療戦略の一つと成り得ると考えられ、臨床応用に向けた更なる研究が重要であると思われた。</p> <p>以上により、本論文は本学大学院学則第 9 条に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p> <p>(主論文公表誌)  <i>Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism</i> In press</p>			