

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
奥田泰章	主査 教授 黒岩敏彦
	副査 教授 米田博
	副査 教授 林秀行
	副査 教授 佐野浩一
	副査 教授 北浦泰
主論文題名 Postischemic Intraventricular Administration of FGF-2-Expressing Adenoviral Vectors Improves Neurological Outcome and Reduces Infarct Volume after Permanent Focal Cerebral Ischemia in Rats (ラット中大脳動脈永久閉塞モデルにおける FGF-2 を発現するアデノウイルスベクターの虚血後脳室内投与による神経症状の回復と脳梗塞巣の縮小)	
学位論文内容の要旨	
<p>《緒言》</p> <p>脳卒中は我が国の死因の第三位であり、遺伝子治療による死亡率や罹病率の改善が期待されている。FGF-2は18kDaの蛋白質であり、神経細胞、神経膠細胞や脳室上皮細胞に強力な栄養効果を有し <i>in vitro</i>, <i>in vivo</i>とも脳保護作用や、神経新生作用などを持っていることが証明されている。動物脳虚血モデルにおける FGF-2 蛋白の研究により、脳梗塞巣の縮小や神経症状の改善が脳室内や経静脈的な投与方法で報告されている。しかし FGF-2 遺伝子には細胞からの分泌を促すシグナル配列が存在しないため、遺伝子導入を行った細胞からの効果的な量の FGF-2 の分泌が期待できない。これらを踏まえて FGF-2 の cDNA に interleukin(IL)-2 の分泌型のシグナル配列 (ssIL-2) を加えることにより、遺伝子導入した細胞からの周辺の組織への FGF-2 の分泌量を著明に増加させることができた。これまでの研究で replication defective recombinant adenovirus vector による遺伝子導入にて FGF-2 の脳室内投与を行うことにより、ラットの中大脳動脈閉塞再灌流モデルにおいて脳梗塞巣の体積を減少させ、神経症状が改善することを報告した。しかしながら、臨床でみられる脳血管の閉塞は永久閉塞がほとんどである。今回の実験ではラットの中大脳動脈永久閉塞モデルにおける脳梗塞巣の縮小や神経症状の改善が同様に起こるかを調べた。</p> <p>《対象及び方法》</p> <p>1) アデノウイルスベクターの精製と保存</p> <p>Interleukin(IL)-2 の分泌型のシグナル配列を人工的に結合させたヒト FGF-2 を発現する複製不能型アデノウイルスベクター AxCAMAssFGF-2 を使用した。このベクターは COS/TPC 法にて作製した。コントロールのベクターとして FGF-2 と同様の発現形式を持つ <i>Escherichia coli LacZ</i> の cDNA を発現する AxCALacZ を使用した。すべてのウイルスを 293 細胞で増殖させ、CsCl 密度勾配遠心によって精製し、10%グリセロール添加 phosphate buffered saline (PBS) で透析を行い、使用するまで -80℃で貯蔵した。</p> <p>2) Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)</p> <p>培養液の ELISA は FGF-2 ELISA kit (Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)</p>	

で行った。AxCAMAssFGF-2、AxCAJSFGF-2とAxCALacZ(20 pfu/cell)を感染させたヒト網膜色素上皮細胞(HRPE)をPBSで三度洗浄し、trypsin/EDTAで採取した。細胞は96 well plates(3×10⁴ cells/well)にて200μlのDulbecco's modified Eagle's mediumと2% fetal bovine serumで培養した。培養液は1、2、3、5日後に採取し、Cell Counting kit(和光純薬工業株式会社、大阪)で細胞の数を測定した。採取24時間前に培養液は取り替えた。450nmの吸光度でmicroplate reader上で測定した。

3) 実験プロトコル

2つのプロトコルに分け、それぞれを2つのグループにランダムに分別した。プロトコル1では、AxCAMAssFGF-2を脳室内投与し、中大脳動脈永久閉塞前と後1、4、7、14、21、28、35日目に神経学的評価を行った。このプロトコルで、グループ1は投与を行わなかったラットの中大脳動脈永久閉塞の群(n=4)で、グループ2はラットの中大脳動脈永久閉塞の2時間後にAxCAMAssFGF-2の脳室内投与を行った群(n=4)である。プロトコル2では急性期の脳梗塞巣の体積を測定した。脳梗塞巣に対するAxCAMAssFGF-2の効果を調べるため、摘出脳で中大脳動脈閉塞後2日目に脳梗塞巣の体積を評価した。グループ1は無投与の中大脳動脈永久閉塞の群(n=4)で、グループ2は中大脳動脈永久閉塞の2時間後にAxCAMAssFGF-2の脳室内投与を行った群(n=4)である。

4) 中大脳動脈永久閉塞モデル

雄のWistarラット(体重270-310g)を1.0-2.0%ハロセンと70%笑気/30%酸素にて麻酔をかけた。体温は直腸プローブ(芝浦エレクトロニクス株式会社、日本)で37±0.5℃を保った。手術開始から麻酔終了まで上記の条件を保った。中大脳動脈永久閉塞モデルをintraluminal suture methodにて作成した。頸部正中切開にて右総頸動脈、外頸動脈、内頸動脈を露出し、外頸動脈を切断した。加工した4-0 nylon糸(18.5-19.5mm)を外頸動脈から内頸動脈に挿入し中大脳動脈の起始部を閉塞させた。糸は挿入したまま皮膚を縫合した。

5) *In vivo* 遺伝子導入

中大脳動脈閉塞の2時間後ラットに前述同様の麻酔をかけ、stereotactic head-holder(model900,DAVID KOPF, Tujunga, CA, USA)に固定した。頭蓋骨の背側面に正中切開を加えbregmaの2mm右外側に電動ドリルを使用し脳挫傷を避けながら1.5mm径のBurr holeを設けた。Hamilton syringeに31Gの針をつけ右側脳室(3.5mmの深さ)に挿入した。その後50μlのAxCAMAssFGF-2(1×10⁸ pfu)を15分間で注入した。注入終了後も5分間針を挿入したままにし、その後針を抜去し、傷は縫合した。注入したラットは感染部位の偏りをなくするために腹臥位で20分間放置した。

6) 神経学的評価

ラットの神経学的評価はNeurological Severity Score(NSS)にて評価した。評価は中大脳動脈閉塞前と中大脳動脈閉塞後1、4、7、14、21、28、35日目に行った。評価者には実験グループの情報は伏せ、神経学的評価は0-18までスコア化した(正常は0、最大が18)。

7) 脳梗塞巣の体積の測定

中大脳動脈閉塞後の脳梗塞巣の体積を2,3,5-triphenyltetrazolium chloride(TTC)染色を行い測定した。中大脳動脈閉塞の2日後に、ラットを100mg/kgのペントバルビタールで麻酔し、脳を取り出した、すぐに2mm間隔で7つのスライス(前頭極から中脳までS-1からS-7)に切離した。それらのスライスを37℃の2%のTTC溶液に脳梗塞巣が現れるまで約30分間浸した。TTCで染めた脳のスライスのデジタルイメージをScion Image(Version Beta 4.0.2, Scion Corporation, Frederick, MD, U.S.A.)で測定した。これも測定者には実験グループの情報を伏せた。コンピュータ上で正常脳の境界と脳梗塞部位の境界を囲んだ。脳梗塞の体積(mm³)は囲んだ面積にそのスライスの厚さを掛けて求めた。脳梗塞巣の体積は脳梗塞の体積を対側正常半球体積で割った百分率で求めた。

8) 統計分析

NSSはone-way analysis of variance(ANOVA)とBonferroni's post hoc analysisを使用し、脳梗塞巣の体積にStudent's t-testを使用して統計解析を行った。p<0.05を有意とした。

《結果》

1) Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

AxCAMAssFGF-2、AxCAJSFGF-2に感染させた細胞の培養液の FGF-2 蛋白を ELISA で測定した。分泌型のシグナル配列を加えた AxCAMAssFGF-2 を感染させた場合は、AxCAJSFGF-2 で感染させた場合の約 10 倍の量の FGF-2 を分泌していた。感染させなかった場合や AxCALacZ を感染させたコントロールの細胞は殆ど FGF-2 の分泌は見られなかった。

2) 神経症状

AxCAMAssFGF-2 脳室内投与中大脳動脈閉塞群のラットは非投与群のラットと比較した場合 14、21、28、35 日目に NSS で有意な改善が認められた ($p<0.05$)。

3) 脳梗塞の体積

AxCAMAssFGF-2 脳室内投与中大脳動脈閉塞群の脳梗塞巣の体積は $29.0 \pm 3.2\%$ ($n=4$) であった。非投与中大脳動脈閉塞の脳梗塞巣の体積は $38.2 \pm 1.9\%$ ($n=4$) であった。両者間で有意な差を認めた ($p<0.05$)。

《考察》

FGF-2 の神経保護作用についてはいまだ不明である。一つの可能性として、antiapoptotic protein である Bcl-2 の upregulation による antiapoptotic 効果を FGF-2 が有することが考えられる。また、以前我々はアデノウイルスベクターによる FGF-2 の遺伝子導入を行うことにより、用量依存的に脳血流量が増加することを報告した。第一の可能性としてこれらの効果により脳梗塞巣の体積が減少することが考えられる。第二に FGF-2 のシナプス形成促進作用により機能が回復すると考えられる。

今回の実験で、FGF-2 分泌型のシグナル配列を持つアデノウイルスベクターと持たないベクター (AxCAMAssFGF-2 と AxCAJSFGF-2) を比較した。AxCAMAssFGF-2 は、AxCAJSFGF-2 と比較して感染により分泌する FGF-2 の量に約 10 倍の差がでた。FGF-2 は容量依存的に作用するため、AxCAMAssFGF-2 を採用した。

Ford らは中大脳動脈閉塞再灌流モデルに関連する経路には炎症、アポトーシスや細胞周期と関係し、一方で中大脳動脈永久閉塞モデルでは、神経伝達物質レセプターやイオンチャンネル、成長因子や信号物質と関係することから、ラットの中大脳動脈閉塞再灌流モデルと永久閉塞モデルは異なったモデルであると報告している。我々の今回の結果では、アデノウイルスによる FGF-2 の遺伝子導入は永久閉塞モデルでも再灌流モデルと同様の脳梗塞巣の体積の減少と神経症状の改善の促進を認めた。今回の結果からアデノウイルスベクターによって FGF-2 の遺伝子導入を行うことは閉塞性脳血管障害の治療に有用であることが示された。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	乙 第 号	氏 名	奥 田 泰 章
論文審査担当者		主 査 教 授	黒 岩 敏 彦
		副 査 教 授	米 田 博
		副 査 教 授	林 秀 行
		副 査 教 授	佐 野 浩 一
		副 査 教 授	北 浦 泰
主論文題名			
<p>Postischemic Intraventricular Administration of FGF-2-Expressing Adenoviral Vectors Improves Neurological Outcome and Reduces Infarct Volume after Permanent Focal Cerebral Ischemia in Rats</p> <p>(ラット中大脳動脈永久閉塞モデルにおける FGF-2 を発現するアデノウイルスベクターの虚血後脳室内投与による神経症状の回復と脳梗塞巣の縮小)</p>			
論文審査結果の要旨			
<p>FGF-2 は 18kDa の蛋白質であり、神経細胞、神経膠細胞や脳室上衣細胞に強力な栄養効果を有し、<i>in vitro</i>、<i>in vivo</i>とも脳保護作用や、神経新生作用を持っている。FGF-2 の遺伝子を導入した複製不能型アデノウイルスベクターを脳室内へ投与することにより、ラットの中大脳動脈閉塞再灌流モデルにおいて脳梗塞巣の縮小と、神経症状の改善が報告されている。そこで申請者はラットの中大脳動脈永久閉塞モデルにおける脳梗塞巣の縮小や神経症状の改善を検討した。</p> <p>培養細胞に FGF-2 分泌型アデノウイルスベクターである AxCAMAssFGF-2 を感染させた場合、FGF-2 非分泌型アデノウイルスベクターである AxCAJSFGF-2 で感染させた場合の約 10 倍の FGF-2 が分泌されることを確認した。Wistar ラット(体重 270-310g)で中大脳動脈永久閉塞モデルを作製し、その2時間後に AxCAMAssFGF-2(1×10⁸ pfu)の脳室内投与を行った。中大脳動脈閉塞前と後 1、4、7、14、21、28、35 日目に神経学的評価を行ったところ、脳室内投与群は非投与群に比較して 14、21、28、35 日目で有意な神経学的改善効果を認めた。中大脳動脈閉塞後2日目に TTC にて染色し脳梗塞巣の体積を測定した結果、脳室内投与群は非投与群に比較して有意に脳梗塞巣の縮小を認めた。</p> <p>今回申請者は分泌型の FGF-2 の遺伝子を導入したアデノウイルスベクターの脳室内投与により永久閉塞モデルで脳梗塞巣の縮小と神経症状改善の促進を認めた。臨床では脳血管の永久閉塞例が多い。今回の結果は、アデノウイルスベクターによる分泌型 FGF-2 の遺伝子導入が永久閉塞性脳血管障害の治療に有用である可能性を示した。</p> <p>以上により、本論文は本学学位規程第 3 条第2項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>			
(主論文公表誌)			
Bulletin of the Osaka Medical College 53(2): 133-141, 2007			