

## 学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
山下太郎	主査 教授 花房 俊昭 副査 教授 米田 博 副査 教授 田窪 孝行 副査 教授 芝山 雄老
主論文題名  Asialoerythropoietin attenuates neuronal cell death in the hippocampal CA1 region after transient forebrain ischemia in a gerbil model  (アシアロエリスロポイエチンによるスナネズミ一過性前脳虚血モデルに対する神経保護効果)	
学位論文内容の要旨	
≪緒言≫  エリスロポイエチン(EPO)は成人では腎臓で産生され、骨髄における赤血球の増殖、分化に関わるサイトカインである。近年、中枢神経系における神経保護作用が報告されている。2002年にドイツの Max-Planck-Institute を中心とするグループにより“EPO-STROKE-STUDY”が行われ、急性期脳梗塞の患者に対し、遺伝子組み換えヒトエリスロポイエチン(rhEPO)を投与し治療効果があることが報告された。しかし、脳血液関門を通過して効果を得るためには大量の全身的に投与される rhEPO が必要であり、その赤血球増多作用や血小板機能亢進作用により血栓性合併症を来す危険性が臨床応用の懸念材料となっている。脱シアル酸エリスロポイエチン (asialoEPO) は酵素反応により脱シアル化された rhEPO の誘導体である。生体内での安定化を担うシアル酸を離脱させることで、ガラクトース基が露出し、肝臓のガラクトース結合蛋白により速やかに代謝され、短半減期という特徴を示す。神経保護作用を示すには短時間の EPO の暴露で可能であり、骨髄への作	

用を呈することなく神経保護作用のみを得ることができると考えられる。今回、asialoEPO を用いたスナネズミ一過性前脳虚血モデルに対する治療実験を行った。

《対象および方法》

1) スナネズミ前脳虚血モデルへの薬剤投与

24匹の体重60-70gのMongolian gerbilをrhEPO投与群、asialoEPO投与群、PBS投与群の3群に分類した。一過性前脳虚血モデルは脳動脈瘤用クリップを用いて両側総頸動脈を3分間遮断し、その後再開通させた。遮断中に脳血流が低下していることを確認するため、近赤外線脳血流ドプラーによりモニタリングした。薬剤投与は前脳虚血の3時間前、直後、24時間後(各10U/g body weight (b.w.))の3回行った。

2) 神経学的評価および組織学的評価

神経学的評価: 前脳虚血後6、7日目に明暗箱を用いた受動的回避テストを行った。学習機能検査としてスナネズミを明箱の中に入れ暗箱へ入った時に電気ショックを与え再び明箱に戻すことを10分間繰り返し、電気ショックを受けた回数を数えた。その24時間後に記憶保持検査としてスナネズミを明箱に入れ、暗箱に入るまでの時間を最長300秒まで測定した。

組織学的評価: 7日目の神経評価終了後、スナネズミを安楽死させ、脳を摘出し海馬CA1領域の神経細胞の障害についてNissl染色およびTerminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP end labeling (TUNEL)染色にて評価を行った。

### 3) 造血系への影響についての評価

薬剤投与前と投与後 14 日目に同一個体の末梢血中のヘモグロビン濃度を測定した。また、薬剤投与 3 日目に採血および骨髄を採取し、末梢血中の網状赤血球の割合と骨髄中の赤芽球の割合を測定した。

#### 《結果》

- 1) 神経学的評価において明暗箱による神経学的評価では電気ショックを受ける回数が PBS 投与群は  $7.5 \pm 0.91$  回であったのに対し、asialoEPO 投与群は  $4.9 \pm 0.40$  回、rhEPO 投与群は  $5.5 \pm 0.68$  回であり有意に少なかった。また、24 時間後の記憶保持検査では PBS 投与群が暗箱へ入るまでに  $37.0 \pm 19.20$  秒であったのに対し、asialoEPO 投与群は  $263.6 \pm 27.18$  秒、rhEPO 投与群では  $230.6 \pm 25.63$  秒であり有意に延長していた。
- 2) 組織学的所見において、Nissl 染色では海馬 CA1 領域の viable cell が asialoEPO 投与群は  $144.99 \pm 34.87$  cells/mm、rhEPO 投与群は  $103.57 \pm 27.90$  cells/mm であり、PBS 投与群 ( $19.00 \pm 3.79$  cells/mm) よりも有意に改善を認めた。また、TUNEL 染色においても asialoEPO 投与群は  $29.28 \pm 14.91$  cells/mm、rhEPO 投与群は  $33.40 \pm 8.13$  cells/mm であり、PBS 投与群 ( $76.67 \pm 8.14$  cells/mm) よりも有意にアポトーシスの抑制を認めた。
- 3) 赤血球造血系への影響について、ヘモグロビン濃度は asialoEPO 投与群と PBS 投与群は投与前後で変化はなく、rhEPO 投与群のみ上昇していた。骨髄中の赤芽球および末梢血中の網状赤血球も同様に、rhEPO 投与群のみ上昇していた。

## 《考 察》

スナネズミ一過性前脳虚血モデルに対する asialoEPO の大量投与により、rhEPO と同等に神経学的、組織学的に改善を認めた。また、造血系への影響では asialoEPO は PBS 投与群と同様に骨髄への作用を認めなかった。rhEPO の脳血液関門を通過する機序については明らかにされていないが、rhEPO の全身投与により髄液中の EPO 濃度が神経保護レベルまで速やかに上昇することが報告されている。造血作用と異なり、神経保護作用は短時間の EPO の暴露により得ることができる。この神経保護作用は強い抗アポトーシス作用によると考えられており、そのシグナル伝達が解明されてきている。その他の機序として、脳虚血によるグルタミン酸毒性の抑制や抗炎症作用なども報告されている。今回の実験では虚血負荷前投与により神経保護効果を見ることができた。今後、さらなる検討を行い、脳梗塞の新たな治療薬としての臨床応用が期待される。

## 審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲第	号	氏名	山下太郎
論文審査担当者			主査教授 花房 俊昭	
			副査教授 米田 博	
			副査教授 田窪 孝行	
			副査教授 芝山 雄老	
主論文題名				
Asialoerythropoietin attenuates neuronal cell death in the hippocampal CA1 region after transient forebrain ischemia in a gerbil model				
(アシアロエリスロポイエチンによるスナネズミ一過性前脳虚血モデルに対する神経保護効果)				
論文審査結果の要旨				
<p>エリスロポイエチン(EPO)の神経保護作用が近年報告されており、2002年の臨床試験において急性期脳梗塞の患者に遺伝子組み換えヒトエリスロポイエチン(rhEPO)を投与し治療効果のあることが報告された。しかし、脳血液関門を通過して効果を得るためには大量の全身的に投与される rhEPO が必要であり、赤血球増殖作用や血小板機能亢進作用により血栓性合併症を来す危険性がある。脱シアル酸エリスロポイエチン (asialoEPO) は短半減期という特徴により骨髄への作用を呈することなく神経保護作用を示す可能性がある。そこで申請者は、スナネズミ一過性脳虚血モデルに asialoEPO を大量に投与し、その神経保護効果と骨髄への影響について検証している。</p>				

rhEPO 投与群、asialoEPO 投与群、PBS 投与群の 3 群に対し神経学的所見、組織学的所見について検証した。その結果、rhEPO 投与群、asialoEPO 投与群は PBS 投与群よりも明暗箱における学習・記憶保持機能において有意に改善を認めた。組織学的にも海馬 CA1 領域の神経細胞保護効果を認めた。さらに骨髄への作用として、rhEPO 投与群では赤芽球、網状赤血球、ヘモグロビンの増加が見られたのに対し、asialoEPO 投与群では PBS 投与群と同様に増加を認めなかった。以上より、asialoEPO は rhEPO と同等の神経保護効果を有し、骨髄への影響をもたないことが示された。本研究は、asialoEPO の新たな脳梗塞治療薬としての可能性を示したもので、その意義は高いと考えられる。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 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。

(主論文公表誌)

Neurological Research, 2010 May 4. [Epub ahead of print]