

氏 名 (本籍) 鈴 木 仁 志

学 位 の 種 類 博 士 (薬 学)

学 位 記 番 号 薬 第 4 3 0 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 1 2 年 1 1 月 2 2 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当

学 位 論 文 題 目 脳 虚 血 に よ る P-セ レ ク チ ン 発 現 と 組 織 傷 害 に 関 す る 研 究

論 文 審 査 委 員 (主 査)
教 授 水 柿 道 直 教 授 大 内 和 雄
教 授 永 沼 章

論文内容要旨

脳血管障害は1951年に結核に代わり国民死因の第1位となり、30年間首位を占め続けたが、近年の食生活の改善や医療の進歩に伴い、現在では第2位となっている。しかし、この中で死亡率の高い出血性脳血管障害は減少傾向にあるが、虚血性脳血管障害の発症者数は寧ろ漸増傾向にある。脳梗塞の2大危険因子は加齢と高血圧であり、高齢化に伴う脳梗塞の増加は避けられない現状にある。従って、現在虚血性脳血管障害の予防や治療は、その後遺症や脳血管性痴呆症も含め重要な問題となっている。近年、脳血管障害発症後、数時間という超急性期に血栓を除去し再灌流することにより、虚血傷害を軽減しようという治療法（血栓溶解術、血管内脳外科手術）が行われている。しかし再灌流が得られたことによりむしろ炎症が惹起され、虚血/再灌流障害（ischemia/reperfusion injury）の生じる可能性が指摘されている。最近、この虚血再灌流による組織傷害において好中球が重要な役割を演じていることが、心臓、肺等の末梢臓器を用いた実験で明らかになるつつある。微小循環系の細胞間相互作用に参与する細胞接着分子には、セレクチンファミリー、インテグリンファミリー、イムノグロブリンスーパーファミリー等が挙げられ、これらの細胞接着分子は、炎症反応における好中球の細胞内浸潤において重要な役割を演じている。その中でもP-セレクチンは、好中球との相互作用により接着の第一段階であるローリングを惹起し、炎症反応への関与が示唆されている。P-セレクチンの発現については一過性心筋虚血後のP-セレクチン発現変化に関する報告や、脳虚血においては、ヒヒを用いたP-セレクチンの発現についての報告等がなされている。しかし、純系の実験動物が確立され、解剖、生理等の基礎的データの揃っているラット脳虚血モデルについてP-セレクチンに関する研究報告は、まだ十分に行われていない。また、脳虚血に対するP-セレクチンの中和抗体投与により好中球の組織内浸潤を抑えることができれば、虚血性脳血管障害に対する新しい治療法となる可能性が考えられる。そこでP-セレクチンの機能に着目し、ラット中大脳動脈閉塞（MCAO）モデルにおける脳虚血後のP-セレクチン発現変化及び組織傷害への関与、並びにP-セレクチンモノクローナル抗体による治療の可能性について検討した。

ラット一過性MCAOモデルにおけるP-セレクチンの発現を、免疫組織化学的に解析した。P-セレクチンはシャムコントロール群において認められず、虚血再灌流後2時間目より大脳皮質、線条体のMCA領域（MCAが走行している大脳半球の領域で、MCAを閉塞することにより虚血領域となる。）内における血管内皮細胞に発現が観察され、その発現は虚血傷害レベルの比較的軽度な虚血辺縁部においても認められた。また発現血管は、主にMCA領域内の細静脈において認められ、他の血管にはほとんど検出されなかった。これは他の動物種においても同様の発現領域、部位が確認されており、種差を越えて発現する可能性が示唆される。しかし、本研究による結果では、*in vitro*の報告と比較し発現の持続が認められた。P-セレクチンの発現は、培養血管内皮細胞の低酸素負荷後の再酸素化による刺激によっても誘導が示されており、虚血再灌流刺激の重要性が示唆されている。また、脳虚血後の血小板と好中球による凝集反応や、サイトカイン、フリーラジカルの発現が脳虚血傷害へ関与することが示唆されており、*in vivo*におけるP-

セレクチンの持続発現において、これらの因子が影響を与えた可能性が考えられる。

HSP72は、ストレス条件下で発生した異常蛋白の再生や分解、そして低下した蛋白合成の回復に関与することが報告されており、ストレス反応性のマーカーとしての有用性が示唆されている。本研究でのHSP72の発現は、シャムコントロール群において認められず、虚血再灌流後8時間目よりMCA領域内の神経細胞に発現が認められた。また、その発現は脳皮質では1日目に、線条体では3日目に最も強く、発現時間において虚血領域による差が認められた。線条体細胞は脳皮質細胞と比較し、神経ストレスによる傷害時に蛋白合成の修復が遅れると言われており、本研究の結果は、この知見を裏付けるものとなった。

以上の結果より、P-セレクチンは脳虚血再灌流後の血管内皮細胞に発現し、炎症反応への関与の可能性が示唆された。また、その発現はHSP72よりも早く、しかも虚血領域に差がなく認められ、脳虚血傷害の急性期における傷害性マーカーとしての有用性が示唆された。

ラット一過性MCAOモデルにより発現したP-セレクチンが、ヒトの脳梗塞により近い状態である永久MCAOモデルでは、どのような発現変化を示すかを調べるため、ラットの永久及び一過性MCAOモデルにおいて比較検討を行った。また、P-セレクチンの発現変化に伴い、好中球の組織内への浸潤についても合わせて検討した。

永久及び一過性MCAOモデルによるP-セレクチンの発現変化の比較では、MCAO後及び1時間MCAO再灌流後、共にMCA領域内に2時間目で発現が認められ8時間目で最大となった。従って、P-セレクチンはラット脳虚血中においても発現することが明らかになった。しかし、永久MCAOモデルにおける8時間までの発現は、一過性MCAOモデルよりも強く、また発現の持続は永久MCAOモデルで1日目まで、一過性MCAOモデルでは3日目まで認められた。これは、永久MCAOモデルにおいてはサイトカイン刺激が、また一過性MCAOモデルにおける発現の持続には、虚血再灌流刺激等がP-セレクチンの発現に影響を与えた可能性が考えられる。

最近の報告では、LFA-1 (CD11a, CD18) が脳虚血再灌流後の組織傷害へ関与している可能性が示唆されている。本研究によるCD11a, CD18を発現している好中球の組織内浸潤は、永久及び一過性MCAOモデル共に8時間目よりMCA領域内の組織に確認された。局所脳虚血モデルは、側副血行を介しての血流が残存し不完全な虚血状態にあると考えられている。従って、永久MCAOモデルにおいて、好中球浸潤により炎症反応が惹起される可能性が示唆された。また、永久MCAOモデルと比較し、一過性MCAOモデルでは好中球浸潤の持続が認められ、P-セレクチンの発現と相関性が認められた。これらのことから、永久及び一過性MCAO後のP-セレクチンの発現は、好中球の組織内浸潤に深く関与していることが明らかになった。

また、P-セレクチンの発現は、すでに報告されているE-セレクチン及びICAM-1の発現時間よりも早期に観察され、組織内浸潤への足掛かりとなる重要な役割を担っていると考えられた。これら細胞接着分子の発現及び好中球の浸潤における経時的変化に関する知見を考え併せると、セレクチンファミリーやイム

ノグロブリンファミリーが協調的に作用し、脳虚血における好中球の組織内浸潤を進展させることが推測された。

ラット永久MCAOモデルへの抗ラットP-セレクチンモノクローナル抗体 (ARP2-4) の投与は、rCBFを有意に改善した。これは血小板と好中球の凝集反応等の減少により、血流が改善された可能性が考えられる。また、脳浮腫及び梗塞サイズにおいても有意な減少が認められ、永久MCAOモデルにおいてARP2-4投与による脳虚血傷害の抑制が示された。P-セレクチンの発現と好中球浸潤には相関性が示されたことから、これらの軽減にはARP2-4がP-セレクチンの働きを制御し、好中球浸潤を抑制した可能性が推測される。また、血小板と好中球の凝集反応による活性酸素の産生は、P-セレクチンやsLex等のモノクローナル抗体により阻害されることが明らかになっており、更にP-セレクチンと単球の接着に対するPAFの関与は、MCP-1やTNF- α の産生を増加させることが報告されている。従ってARP2-4は、P-セレクチンが誘導に関与している炎症惹起物質の産生にも抑制的に作用し、脳虚血傷害を軽減した可能性が推察される。これらの結果より、P-セレクチンの発現が脳虚血傷害の進展に重要な役割を果たすことが明らかになった。

免疫組織化学的解析による好中球の浸潤は、ARP2-4投与群において有意な減少が示され、特に虚血辺縁部において著しかった。これはARP2-4が虚血中心部と比較し、主にその周辺部における不完全虚血巣や側副血行路においてP-セレクチンの働きを制御し、好中球浸潤を抑制したものと考えることができる。

またHSP72の発現は、vehicle投与群のMCA領域内の神経細胞において認められたが、ARP2-4投与により、虚血辺縁部での著しい減少が認められた。この発現減少は、好中球浸潤の著しい減少部位とほぼ一致していることから、好中球による組織傷害の軽減を反映している可能性が推察される。

TUNEL染色において、vehicle投与群で大脳皮質、線条体のMCA領域内にTUNEL陽性細胞が認められ、脳虚血においても細胞死にアポトーシスの関与が示された。しかし、これらTUNEL陽性細胞の発現は、ARP2-4処理群において有意な減少を示した。アポトーシスの発現には、虚血傷害レベルに対する相関性が示されていることから、傷害レベルの軽減に伴い減少したものと推測される。このようなTUNEL陽性細胞の傷害レベルに対する細胞応答は、脳虚血におけるアポトーシスを視点とした実験的治療のマーカーとしての可能性が示唆される。

永久MCAOモデルに対するARP2-4の投与は、好中球の浸潤抑制、HSP72の誘導発現の減少、そしてTUNEL法によるアポトーシスの発現細胞の減少が認められ、脳保護効果が示された。これは、ARP2-4投与による好中球の浸潤抑制と、それに伴う組織内での炎症反応の減少及び血流の改善等が影響しているものと考えられる。

これらのデータは、虚血性脳血管障害において、P-セレクチン中和抗体投与による治療応用への可能性を示唆するものである。しかし、その体内動態や副反応、そして脳梗塞急性期におけるtherapeutic time windowを考慮した投与の時期、量及び方法等についても、更に検討を重ねてゆく必要があると考える。

上記の結果より、脳虚血におけるP-セレクチンの発現は好中球の組織内浸潤において重要な役割を果た

し、脳虚血傷害の進展に深く関与していることが明らかになった。従って、P-セレクチンの働きを抑制することは、虚血性脳血管障害に対する新たな治療法となる可能性が示唆された。

審査結果の要旨

本研究は、脳虚血傷害におけるP-セレクチン発現を、ラットの一過性及び永久中大脳動脈閉塞（MCAO）モデルを用いた免疫化学的・免疫組織化学的検討により精査し、さらに永久MCAOモデルへの抗ラットP-セレクチンモノクローナル中和抗体投与による効果を検討したものであり、以下の成果を得ている。

ラット一過性MCAOモデルにおけるP-セレクチンの発現は、脳虚血再灌流後に虚血側MCA領域内における細静脈の血管内皮細胞に認められ、組織炎症反応への関与の可能性が示された。また、このP-セレクチンの発現は、ストレス反応性マーカーと考えられるHSP72よりも早く、虚血領域による差がないことから、脳虚血傷害時の急性期における傷害性マーカーとしての有用性が示唆された。

次に、ラット永久MCAOモデルにおけるP-セレクチンの発現は、一過性MCAOモデルにおけるP-セレクチン発現よりも強いことが判明した。また、好中球の組織内浸潤も認められたことから、永久虚血においても好中球浸潤により組織炎症反応が惹起される可能性が示唆された。このP-セレクチンの発現と好中球の組織内浸潤には相関性が示され、P-セレクチンの発現は好中球の組織内浸潤に深く関与していることが明らかになった。

ラット永久MCAOモデルに対する抗ラットP-セレクチンモノクローナル中和抗体の投与により、局所脳血流量を改善し脳浮腫及び梗塞サイズを有意に減少させたことから、P-セレクチンの発現が脳虚血傷害の進展に重要な役割を果たすことが明らかになった。この結果は、P-セレクチンの働きを抑制し、その結果、好中球の組織内浸潤が抑制されることにより、脳虚血傷害が軽減する可能性を示した。

さらに、ラット永久MCAOモデルの虚血側MCA領域内において、TUNEL陽性細胞が認められることにより、脳虚血傷害におけるアポトーシスの関与を示した。また、抗ラットP-セレクチンモノクローナル中和抗体投与によりTUNEL陽性細胞の発現は減少し、その発現量は傷害レベルと相関性が示されたことより、TUNEL陽性細胞の発現は、脳虚血における実験的治療のマーカーになる可能性が示唆された。

以上、本研究は、脳虚血におけるP-セレクチン発現の、脳虚血傷害への関与を新規に示したものであり、P-セレクチンの働きを抑制することによる、虚血性脳血管障害に対する新規治療法の可能性をも示唆するものである。これらの知見は薬学上有用なものと判断する。

よって、本論文は博士（薬学）の学位論文として合格と認める。