




学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・(論)	第 号	氏 名	阿南 光洋
審 査 委 員 会 委 員	主査氏名	三 股 浩 光	
	副査氏名	松 浦 真 子	
	副査氏名	岩 坂 日 本 男	
<p>論文題目： Induced angiogenesis under cerebral ischemia by cyclooxygenase 2 and hypoxia-inducible factor naked DNA in a rat indirect-bypass model (ラット間接血行再建モデルにおける cyclooxygenase2 と低酸素関連因子を用いた血管新生の検討)</p> <p>論文掲載誌名：Neuroscience Letters, 409:118-123, 2006</p> <p>論文要旨：          本研究は原因不明の慢性虚血疾患であるもやもや病に対して、側頭筋を脳表面に接触させる間接的血行再建術(encephalo-myo-synangiosis, EMS)の治療効果向上を目指し、血管新生の促進法について研究を行った。          両側頸動脈結紮によるラット脳低還流モデルに対して EMS を行い、同時に plasmid HIF-1<math>\alpha</math> 及び HIF-2<math>\alpha</math>、COX-2 DNA を脳表に散布した。2 週間後に灌流固定を行い、組織学的評価を行った。対照群として LacZ plasmid を用い、側頭筋と脳表間に満遍なく遺伝子導入がなされていることを確認した。免疫染色用の標本として、側頭筋が密着し安定して組織切片が作成できる範囲で、各検体より 500 <math>\mu</math>m 間隔で 3 <math>\mu</math>m 厚のスライスを作成した。HIF-2<math>\alpha</math> 及び COX-2 両治療群において、対照群と比較して VEGF の発現が亢進していることを確認した。血管の評価には Factor VIII 染色を用い、安定して組織切片が作成できる範囲で 200 <math>\mu</math>m 間隔 3 <math>\mu</math>m 厚のスライスを作成し、1 検体あたり約 25 枚の標本を作成した。その結果、HIF-1<math>\alpha</math> 及び HIF-2<math>\alpha</math>、COX-2 治療群において、血管数がそれぞれ対照群と比較して有意差を持って多いことを確認した。          今回の研究では、慢性脳循環低下状況において EMS を施行する際に、脳表に HIF-1<math>\alpha</math>、及び HIF-2<math>\alpha</math>、COX-2 遺伝子を散布しておくことは、新生血管を増やすための有効な手段の一つとなり得ることを示した。</p> <p>以上、本研究は、HIF-1<math>\alpha</math> や HIF-2<math>\alpha</math>、COX-2 遺伝子を脳表に散布することによって血管新生を促進させて、間接的血行再建術の治療効果を向上させ得ることを示しており、審査委員の合議により、本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

## 学 位 論 文 要 旨

氏名 阿南 光洋

## 論 文 題 目

.....Induced angiogenesis under cerebral ischemia by  
cyclooxygenase 2 and hypoxia-inducible factor naked DNA in  
a rat indirect-bypass model.....

## 要 旨

.....慢性脳虚血性疾患として、もやもや病（ウイリス脳動脈輪閉塞症）が知られている。これは両側内  
頸動脈終末部が狭窄し、側副路として未熟で微細な血管（もやもや血管）が基底核部に増生する原因不  
明の疾患である。脳血管の狭窄進行に伴い、脳細胞の需要に応じた血流を供給出来なくなり終には脳梗  
塞に陥るか、未熟なもやもや血管の破綻により脳出血を来す。主には罹患者の多い本邦で様々な基  
礎・臨床研究が進められているが、両側内頸動脈狭窄を阻止する根本的な加療法は現在皆無であり、外  
科的加療として直接・間接血行再建術が、脳梗塞予防策として行われている。間接血行再建術は、血行  
の豊富な頭蓋内外の組織を脳表面に直接圧着させることで、新生血管が脳表に向かって「自然」増生す  
るという現象を利用したものである。直径 1mm 以下で donor/recipient が脆弱な小児例においては、血  
管吻合を要する直接血行再建術が手技的に困難な場合があり、その場合は間接血行再建術が唯一の脳梗  
塞予防的加療となる。今回我々は、間接血行再建術の治療向上を目指して、以下の研究を行った。

.....Hypoxia-inducible factor(HIF)は低酸素下に誘導される内在性転写因子であり、HIF-1 $\alpha$ 、HIF-2 $\alpha$

などの subunit が存在する。その標的は vascular endothelial growth factor(VEGF)を始めとして、Nitric oxide (NO)、erythropoietin(EPO)、glucose transporters(Glut)1、Glut3、など 100 を超えて知られており、HIF は低酸素応答の master switch で angiogenic に作用する。HIF-1 $\alpha$  は生体においてはあらゆる臓器に存在し、非低酸素下では von Hippel-Lindau tumor suppressor protein(VHL)と結合し ubiquitin complex を形成する事で効果発現が抑えられ、26S proteasome により分解される。低酸素下では HIF-1 $\beta$  と二量体を形成し、hypoxia responsive element(HRE)と結合する事で各蛋白を誘導する。HIF-2 $\alpha$  は、その 48%のアミノ酸配列が HIF-1 $\alpha$ と相同であるが、肺・腎・脳血管・心筋などに発現が多く見られ、HIF-1 $\alpha$  以上に angiogenesis や tumorigenesis に強く関与しているとされている。何れも、悪性神経膠腫や未分化肺癌などの新生血管誘導因子としての研究に端を発し、最近では心筋虚血や慢性閉塞性動脈硬化症などに対する治療応用が期待されている。

また、cyclooxygenase (COX) はアラキドン酸の代謝にかかわる酵素の一種であり、COX-1、COX-2 の二つのアイソフォームがあり、アラキドン酸を PG2 に代謝するなどし、最終的には炎症や癌における angiogenesis に作用する。

今回の研究では、両側頸動脈結紮によるラット脳低還流モデルを用いた。その低還流モデルに対して、donor として側頭筋を用いた間接血行再建術 (encephalo-myosynangiosis: EMS) を行い、同時に plasmid HIF-1 $\alpha$ 、HIF-2 $\alpha$ 、COX-2 DNA を脳表に散布した。2 週間後に還流固定を行い、組織学的評価を行った。Control 群として LacZ plasmid を用い、側頭筋と脳表間には満遍なく遺伝子導入が為されている事を確認した (Fig.1)。免疫染色用の標本として、側頭筋が密着し安定して組織切片が作成できる範囲で、各検体にて 500 $\mu$ m 間隔で 3 $\mu$ m 厚のスライスを作成した。HIF-2 $\alpha$ 、COX-2 両 treatment 群において、control 群と比較して VEGF の発現が促進されている事を確認した (Fig.2.、3.)。血管の評価には Factor VIII 染色を採用、安定して組織切片が作成できる範囲で 200 $\mu$ m 間隔 3 $\mu$ m 厚のスライスを作成し、1 検体あたり約 25 枚の標本を作成した。その結果、HIF-1 $\alpha$ 、HIF-2 $\alpha$ 、COX-2 treatment 群において、血管数がそれぞれ control 群と比較して有意差を持って多い (Kruskal Wallis H-test, Mann-Whitney U-test with Bonferroni correction) 事を確認した (Fig 4)。

今回の研究では、慢性脳循環低下状況において EMS を施行する際に、脳表に HIF-1 $\alpha$ 、HIF-2 $\alpha$ 、COX-2 gene を散布しておくことは、新生血管を増やすための有効な手段の一つとなり得ることを示し

たが、血管誘導に伴い実際に脳血流が上昇しているか否かについては検討出来ていない。その為、追加研究として局所脳虚血モデルを用いて、脳梗塞の予防効果がみられる事を確認した (Anan M et al. Neurol Res. 2009 Nov;31(9):917-22.)。

今後、本手法を更に臨床応用として発展させる為には、組織学的考察を深め、安全性を追求し、遺伝子導入の方法論を検討することが、課題として挙げられる。

