

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 石川 正典
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第617号
学位授与の日付 平成27年3月23日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名 ラット一過性局所脳虚血モデルにおける血管新生阻害因子 VEGF165b の発現と血管新生抑制作用の検討

論文審査委員 主査 教授 五十嵐 博中
副査 教授 西澤 正豊
副査 教授 柿田 明美

博士論文の要旨

【背景】脳梗塞に対する根本治療として組織プラスミノゲンアクチベーターを用いた血栓溶解療法が行われているが、その恩恵に浴する患者は少ない。従って、脳梗塞後の回復期において、機能回復を促進させる治療法の確立が望まれている。しかし、そのような治療は未だ臨床応用はなされていない。脳虚血後の機能回復を促進する重要な戦略の一つに血管新生の促進がある。血管新生と神経再生は相互に影響し、脳虚血後の機能回復を促進させる。血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor; VEGF) は、血管新生を強力に促進する血管リモデリング因子であり、脳梗塞超急性期において血液脳関門を破壊させ、さらに血栓溶解療法後の脳出血合併症に関与する一方、回復期においては機能回復に作用するという2面性を有している。VEGFのスプライシングバリエーションである VEGF165b は、VEGF と VEGF 受容体の結合を競合的に阻害し、内因性の VEGF 阻害因子として作用する。VEGF165b の作用を抑制することにより、血管新生が促進され、脳虚血後の回復を促すことが期待される。しかし、脳虚血後の VEGF165b の発現や局在の変化、血管新生への影響については不明である。

【目的】 VEGF165b が脳虚血後の血管新生を阻害する可能性を検討すること。このため一過性局所脳虚血後の VEGF165b の発現および局在の変化と、VEGF165b が血管新生に及ぼす影響について検討すること。

【方法】雄 Sprague-Dawley ラットを用い、血管内塞栓系による一過性局所脳虚血モデルを作成し、虚血後1日、3日、7日、14日、および対照 (非虚血群) の大脳皮質を脳試料として採取した。VEGF165b の経時的変化と局在を、抗 VEGF165b 抗体を用いたウェスタンブロットと免疫組織化学、蛍光2重染色により評価した。血管内皮細胞の増殖を検出するため Ki-67 (細胞増殖マーカー)、および endothelial barrier antigen (EBA; 血管内皮マーカー) の蛍光二重染色を行った。さらに VEGF-VEGF 受容体シグナリングを介した血管新生のマーカーである endocan に対する抗体を用いたウェスタンブロットと免疫組織化学を行い、VEGF165b と血管内皮細胞増殖、VEGF-VEGF 受容体シグナリングを介した血管新生の関係を検討した。

【結果】ウェスタンブロットで評価した VEGF165b 発現は、虚血後3日目をピークとして増加した。免疫染色により VEGF165b 発現の局在を評価すると、VEGF165b は虚血中心部の血管内皮細胞に発現した。一方、VEGF は虚血辺縁部に発現し、両者は共局在しなかった。Ki-67 で評価した血管内皮細胞の増殖は、非虚血

群では認めないものの、虚血後3日目をピークとして虚血中心部において増加した。虚血辺縁部においても同様の傾向であるものの、有意なものではなかった。ウェスタンブロットで評価した endocan の発現は、虚血後3日目ではなく虚血後7日目以降に増加した。免疫染色により endocan の発現を評価すると、虚血後3日目の虚血中心部の血管には認めず、虚血後7日目をピークとして虚血周辺部の血管のみに発現した。

【考察】 VEGF165b の長期間に及ぶ発現変化が初めて明らかとなり、脳虚血後の亜急性期に発現が増加し、虚血中心部の血管内皮細胞に発現することが示された。脳虚血後亜急性期には虚血中心部においても血管内皮細胞は増殖するものの、endocan 発現は目立たないことから、VEGF165b の発現により、VEGF-VEGF 受容体シグナリングを介した血管新生が阻害されているものと考えられた。末梢動脈病モデルマウスにおいては、抗 VEGF165b 中和抗体投与により血管新生が促進されると報告されていることから、同様に、脳梗塞回復期における抗 VEGF165b 中和抗体の投与が、虚血中心部においても VEGF-VEGF 受容体シグナリングを介した血管新生を促進させることが期待される。

【結論】 VEGF165b が脳虚血後において発現し、血管新生を抑制している可能性が示された。VEGF165b は脳梗塞回復期における血管新生を促進する新規治療標的分子として有望である。

審査結果の要旨

血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor; VEGF) は、血管新生を強力に促進する血管リモデリング因子であり、脳梗塞超急性期において血液脳関門を破壊させ、さらに血栓溶解療法後の脳出血合併症に関与する一方、回復期においては機能回復に作用するという2面性を有している。VEGF のスプライシングバリエーションである VEGF165b は、VEGF と VEGF 受容体の結合を競合的に阻害し、内因性の VEGF 阻害因子として作用する。VEGF165b の作用を抑制することにより、血管新生が促進され、脳虚血後の回復を促すことが期待される。しかし、脳虚血後の VEGF165b の発現や局在の変化、血管新生への影響については不明である。

そこで、申請者らは脳虚血後の VEGF165b の経時変化と血管新生に及ぼす影響について VEGF、Ki-67 (細胞増殖マーカー) 等と共に発現の検討を行った。VEGF165b 発現は、虚血後3日目をピークとして増加した。免疫染色により VEGF165b 発現の局在を評価すると、VEGF165b は虚血中心部の血管内皮細胞に発現した。一方、VEGF は虚血辺縁部に発現し、両者は共局在しなかった。Ki-67 で評価した血管内皮細胞の増殖は、非虚血群では認めないものの、虚血後3日目をピークとして虚血中心部において増加した。

これらの結果より、VEGF165b の長期間に及ぶ発現変化が初めて明らかとなり、脳虚血後の亜急性期に発現が増加し、虚血中心部の血管内皮細胞に発現することが示され、VEGF-VEGF 受容体シグナリングを介した血管新生が阻害されているものと考えられた。以上より VEGF165b は脳梗塞回復期における血管新生を促進する新規治療標的分子として有望であると考えられ、これを検証した点において、学位論文として価値を認める。