

ラット出血性梗塞モデルにおけるエダラボンの neurovascular unit 保護効果

山下 徹^{a*}, 神谷達司^a, 出口健太郎^a, 稲葉俊東^b, 張 漢哲^a, 商 敬偉^a, 宮崎一徳^a, 大塚愛二^c, 片山泰朗^b, 阿部康二^a

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 ^a脳神経内科学 ^c人体構成学, ^b日本医科大学 第二内科

キーワード：出血性梗塞 (hemorrhagic transformation), tPA (tissue plasminogen activator), MMP-9 (matrix metalloproteinase-9), フリーラジカル (free radical), エダラボン (edaravone)

Dissociation and protection of the neurovascular unit after thrombolysis and reperfusion in ischemic rat brain

Toru Yamashita^{a*}, Tatsushi Kamiya^a, Kentaro Deguchi^a, Toshiki Inaba^b, Hanzhe Zhang^a, Jingwei Shang^a, Kazunori Miyazaki^a, Aiji Ohtsuka^c, Yasuo Katayama^b, Koji Abe^a

Departments of ^aNeurology, ^cHuman Morphology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, ^bDivision of Neurology, Second Department of Internal Medicine, Nippon Medical School

はじめに

2005年10月より日本でも脳梗塞急性期における tissue plasminogen activator (tPA) 静注による血栓溶解療法が行われるようになり、一定の効果が報告されてきている。この血栓溶解療法は、脳梗塞発症後時間が経過してから行うと高率に重篤な合併症である出血性脳梗塞を引き起こすため、脳梗塞発症後3時間以内に投与するなどその適応は厳しく制限されている。そのため脳梗塞が発症した患者の中で、この治療を実際に受けることが出来る患者は約5%に過ぎないのが現状である。近年のECASSⅢの報告では、tPA 静注

血栓溶解療法の therapeutic time window を従来の3時間から4.5時間まで延長できる可能性が示唆された¹⁾。しかしながら治療開始時間が遅れば遅れるほど出血性梗塞出現のリスクが高くなることは変わりなく、出血性梗塞への進展を阻止する治療法の重要性は非常に高まってきている。そこで今回我々は tPA 投与による脳血流再還流後どのようなメカニズムで血管が破綻するのかを詳細に検討し、またフリーラジカスカベンジャーであるエダラボンが血管の破綻を抑制、出血性脳梗塞出現を抑制しうるかを検討した。

材料と方法

まず再現性の高い出血性脳梗塞動物モデルを確立した。我々は自然発症高血圧ラットの13週齢オスに2週間の塩分負荷をかけた上で、シリコンコートした4-0 ナイロン挿入により4.5時間の中大脳動脈閉塞を行った。Vehicle 群 (n=6), tPA 単独投与群 (n=16), エ

平成22年6月受理

*〒700-8558 岡山市北区鹿田町2-5-1

電話：086-235-7365 FAX：086-235-7368

E-mail：tooy@dl.dion.ne.jp

プロフィール



山下 徹

昭和51年7月14日生

平成13年3月 岡山大学医学部卒業

平成19年3月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科修了

平成13年5月 岡山大学医学部附属病院神経内科 医員

平成14年5月 国立岡山医療センター内科勤務

平成15年5月 慶應義塾大学医学部生理学岡野栄之研究室に3年間内地留学

平成18年4月 岡山大学医学部・歯学部附属病院神経内科 医員

平成21年7月 Columbia大学Department of Pathology & Cell Biology Postdoctoral scientist 現在に至る

ダラボン+tPA 投与群 (n=11) の3群を作成した。tPA 投与群では塞栓子を引き抜く直前に tPA (10mg/kg) 静注を行うことで出血性脳梗塞が再現性よく確認できた。エダラボン投与群では、4.5時間中大脳動脈閉塞中に4回エダラボン (3.0mg/kg) 静注を行った(図1)。

結 果

今回の実験では、4.5時間虚血という非常に強い虚血負荷をかけたのにも関わらず、Vehicle 群の24時間後生存率は100%であった。これが tPA 単独投与群では66%まで低下し、エダラボン+tPA 投与群では100%に改善した。Bederson らの方法に基づき運動機能の評価も行ったが、エダラボン+tPA 投与群は tPA 単独投与群と比較して明らかに運動機能の改善を認めた。脳表面を観察すると、tPA 単独投与群では明らかな脳内出血を認め、鉄染色を用いて出血量を定量したところはエダラボン投与群で有意に出血量が減少していることが確認できた。以上のことからエダラボンは tPA 投与後の出血性脳梗塞を抑制する効果があると考えられた。

次に血管周囲に産生されるフリーラジカルの量を推定するために、脂質過酸化物である 4-hydroxyl-2-nonenal (4-HNE) と N-(hexanonyl) lysine (HEL) を組織学的免疫染色で半定量的評価をしたところ、tPA 投与により血管周囲の 4-HNE 発現量は大幅に増加し、

エダラボン併用投与はその発現を抑制していることが確認された。またフリーラジカル以外に血管の破綻に関与している攻撃因子がないかを検索するために、虚血手術前、虚血3時間後、虚血24時間後にラットより経静脈的採血を行い、Multiple ELISA 法を用いて血清中の様々な炎症サイトカインやケモカイン、matrix metalloproteinases (MMPs) を検討した。その結果本実験では MMP-9 が tPA 単独投与群で有意に誘導されていることが明らかになった。そこで血管周囲の MMP-9 の発現を免疫染色で評価したところ、tPA 単独投与群で MMP-9 は血管周囲で強く発現し、エダラボン投与によりその発現が抑制されることが確認された。他研究室からも SOD2-KO マウスの実験結果からフリーラジカルは MMP-9 を誘導することが報告されており²⁾、本実験系においてもエダラボンがフリーラジカルを除去することで MMP-9 の誘導を抑制することができたのではないかと想定された。

では実際に防御側である血管構造はどのように破壊され出血がおきているのだろうか。このことを調べるために血管を構成する主要要素である血管内皮細胞(このマーカーとしてトマトレクチン)、tight junction protein (occludin)、基底膜 (collagen IV) をそれぞれ免疫染色で検討した。実験を行った当初我々は血流に直接接している血管内皮細胞が最も傷害をうけているだろうと予想していた。しかしながら血管内皮細胞のマーカーであるトマトレクチン染色では3群間に有意な差は認めなかった。一方で、基底膜のマーカーである collagane IV 染色では、tPA 単独投与群で明らかな発現量の低下を認めた。またエダラボン併用投与によりその発現量の低下は抑制されていることも確認できた。基底膜は血管内皮細胞とアストロサイトを結びつけ、vascular unit を保持することに重要な役割を果たしていると考えられている。そこで collagane IV と、アストロサイトのマーカーである GFAP を二重染色して血管の形態変化を評価したところ、tPA 単独投与群において明らかにアストロサイトのエンドフットが基底膜から解離していることが明らかになった。エダラボン併用投与群ではアストロサイトに形態変化は見られるものの、解離にまでは至らないものがほとんどであった。さらに普通電顕を用いて詳細な構造変化の検討を行った。健常部位では血管内皮細胞、基底膜、アストロサイトエンドフットの3重構造が緊密に接している(図2A)。tPA 単独投与群では血管内皮細胞は

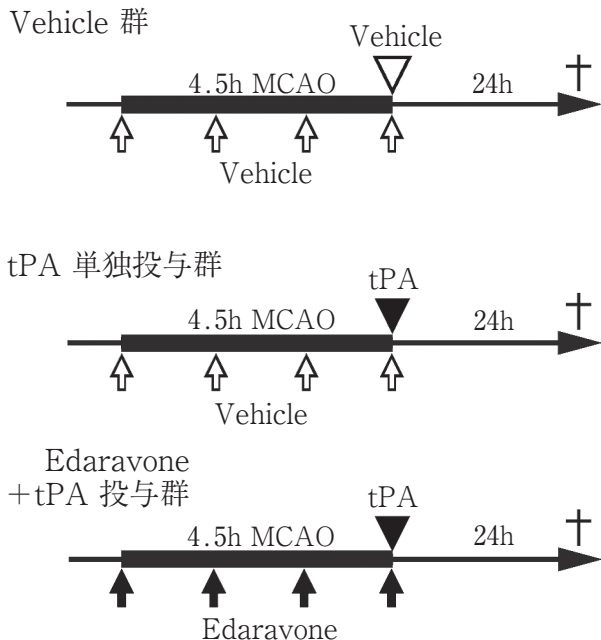


図1 実験プロトコール
MCAO : middle cerebral artery occlusion.

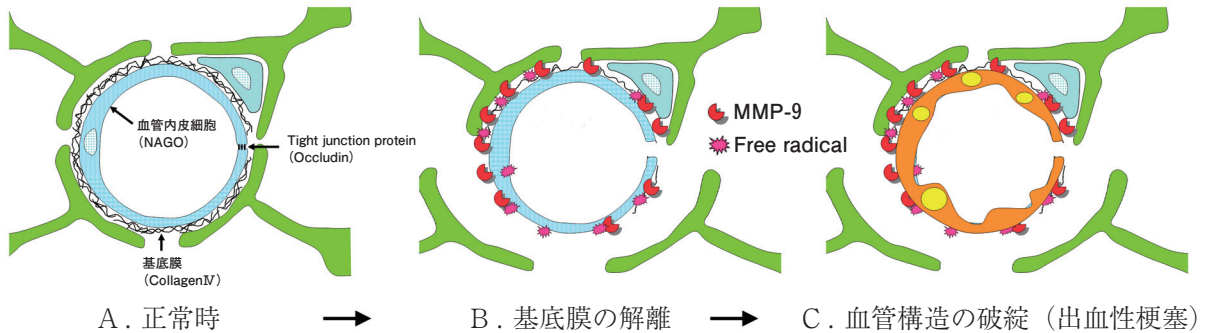


図2 tPA投与後の血流再還流障害によって脳血管に引き起こされるvascular unit崩壊の概念図
過剰に産生されたフリーラジカルならびにMMP-9によって血管内皮を裏打ちする基底膜が分解され、基底膜からアストロサイトエンドフットは解離し、血管構造の崩壊へ進展していくと考えられる。

まだ保たれているものの、基底膜は明らかに菲薄化し、アストロサイトエンドフットも基底膜側から解離していることが観察された。エダラボン併用群ではアストロサイトの浮腫は目立つものの、解離は目立たないという結果であった。

考 察

血管壁に対する主要な攻撃因子としては少なくともフリーラジカルとその下流で働さるMMP-9が重要であると考えられた。また防御側の血管壁としては特に基底膜が、tPA投与による虚血再灌流傷害に対して脆弱であると考えられた。基底膜の主要構成成分であるcollagen IVはMMP-9で分解される基質でもあり³⁾、MMP-9が出血性脳梗塞発生に重要な役割を果たしていることを示唆する結果と考えられた。またエダラボンは本実験において、血管周囲の脂質過酸化やMMP-9の発現を抑制し、基底膜の破壊を軽減し、vascular unitの解離を抑制することが確認された(図2)。この作用が最終的な出血性脳梗塞への伸展を抑制し、生存率や運動機能の改善に寄与したのではないかと推定された。

フリーラジカルスカベンジャーの一つであるNXY-059は大規模臨床試験において一旦はtPA血栓溶解療法後の出血性脳梗塞を減らすことが報告され注目を集めたが⁴⁾、次に行われた試験ではその結果は否定され、開発は中断されてしまった⁵⁾。ただNXY-059は水溶性であり(octanol/water partition coefficients; cLog P=2.09)、ラット脳梗塞モデルを用いた検討でも血液脳関門を容易には通過しないことが報告されている⁶⁾。一方、エダラボンは水溶性と脂溶性の中間という特異な性質を有しており(cLog P=1.33)、血液脳関門も容易に通過する⁷⁾。今回の実験結果からvascular unitを

保護するためには血管内皮を裏打ちする基底膜を保護することが重要と考え、基底膜に容易に到達するであろうエダラボンは、より強いvascular unit保護作用を発揮する可能性がある。今後臨床試験を行いヒトにおいても出血性梗塞出現を抑制できるか明らかにする必要がある。

文 献

- 1) Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Davalos A, Guidetti D, Larrue V, Lees KR, Medeghri Z, Machnig T, Schneider D, von Kummer R, et al. : Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med* (2008) 359, 1317-1329.
- 2) Maier CM, Hsieh L, Crandall T, Narasimhan P, Chan PH : Evaluating therapeutic targets for reperfusion related brain hemorrhage. *Ann Neurol* (2006) 59, 929-938.
- 3) Yang Y, Estrada EY, Thompson JF, Liu W, Rosenberg GA : Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab* (2007) 27, 697-709.
- 4) Lees KR, Zivin JA, Ashwood T, Davalos A, Davis SM, Diener HC, Grotta J, Lyden P, Shuaib A, Hardemark HG, Wasiewski WW : NXY-059 for acute ischemic stroke. *N Engl J Med* (2006) 354, 588-600.
- 5) Shuaib A, Lees KR, Lyden P, Grotta J, Davalos A, Davis SM, Diener HC, Ashwood T, Wasiewski WW, Emeribe U : NXY-059 for the treatment of acute ischemic stroke. *N Engl J Med* (2007) 357, 562-571.
- 6) Kuroda S, Tsuchidate R, Smith ML, Maples KR, Siesjo BK : Neuroprotective effects of a novel nitron, NXY-059, after transient focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* (1999) 19, 778-787.
- 7) Yamamoto Y, Kuwahara T, Watanabe K, Watanabe K : Antioxidant activity of 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one. *Redox Rep* (1996) 2, 333-338.