

内 容 要 旨 目 次

主 論 文

Combined gene therapy with vascular endothelial growth factor plus apelin in a chronic cerebral hypoperfusion model in rats

(ラット慢性脳虚血モデルにおける VEGF と apelin 遺伝子の併用療法は有効である)

平松匡文, 菱川朋人, 徳永浩司, 木戸屋浩康, 西廣真吾, 春間 純, 清水智久,
高杉祐二, 新治有径, 杉生憲志, 高倉伸幸, 伊達 勲

Journal of Neurosurgery (掲載予定)

平成 26 年 3 月 第 43 回日本脳卒中の外科学会に発表

主 論 文

Combined gene therapy with vascular endothelial growth factor plus apelin in a chronic cerebral hypoperfusion model in rats

(ラット慢性脳虚血モデルにおける VEGF と apelin 遺伝子の併用療法は有効である)

【緒言】

もやもや病（ウイルス動脈輪閉塞症）は日本人をはじめとするアジア人に多発する原因不明の進行性脳血管閉塞症であり、両側内頸動脈終末部に慢性進行性の狭窄ないしは閉塞を生じ、側副血行路として脳底部に異常血管網（もやもや血管）が形成される。慢性的に脳血流が低下していくため側副血行により代償され、急激に広範囲な脳梗塞に陥ることは少ないが、脳虚血、脳出血、てんかん、頭痛などの原因となり得る。脳虚血症状を呈するもやもや病に対しては、血行再建術が有効とされており、浅側頭動脈・中大脳動脈吻合術を代表とする直接血行再建術と、頭皮の血管・筋肉や、腱膜、硬膜などを脳表に敷き込むことによる間接血行再建術の2種類が用いられている。ただ、成人例や小児例の一部などに間接血行再建術の効果が低い症例が存在するため、間接血行再建術により生じる血管新生の効果を高める手段として、血管新生を促進する遺伝子投与の有効性が示唆されている。これを示すために、両側総頸動脈を閉塞させたラットを用いて慢性脳虚血モデルとし、さらに間接血行再建術（側頭筋を脳表に敷き込む手術：encephalo-myosynangiosis [EMS])を加えることで、擬似的にもやもや病に対する間接血行再建術モデルを作製した。以前に当教室より、その敷き込んだ側頭筋に vascular endothelial growth factor (VEGF) 遺伝子を組み込んだ plasmid を vector として筋注することで、側頭筋内および脳表の血管新生が促進されることを示した。

一方、近年研究が進んできている生理活性ペプチドである apelin は、血管内皮細胞の増殖及び遊走作用を示すことから、近年血管新生との関連に注目が集まっている。本研究では、慢性脳虚血モデルラットに間接血行再建術を行った際の、VEGF 遺伝子と apelin 遺伝子の併用療法の、脳表における血管新生に対する効果を検討した。

【材料と方法】

使用動物

250-350g の雌性 Wister ラットを実験に用いた。

慢性脳虚血モデルラット作製

ハロタン・笑気・酸素の混合による吸入麻酔を行い、前頸部を縦に正中切開し、両側総頸動脈 (common carotid artery: CCA) を露出し、CCA 閉塞 (CCAO) を行う群では両側 CCA を 3-0 絹糸で結紮した。シャム群では CCA の露出までを行い、結紮はしなかった。

もやもや病手術モデルラット作製とプラスミドの導入

CCAO を行った 1 週間後に間接血行再建術 (EMS) を行った。ペントバルビタール (45mg/kg) の腹腔内注射を行い、定位固定装置を用いて頭部を固定し、頭頂部を縦に正中切開し、側頭筋を側頭骨から剥離した。側頭頭頂骨を歯科用ドリルで開頭し、脳表を損傷しないように硬膜を切開して脳表を露出した。脳表に側頭筋を接着させ、導入試薬を用いてプラスミドを側頭筋に注入した。プラスミドの種類によって、LacZ 遺伝子 (LacZ 群)、VEGF 遺伝子 (VEGF 群)、apelin 遺伝子 (apelin 群)、VEGF 遺伝子と apelin 遺伝子の併用 (VEGF+apelin 群) の 4 群に分けた。

免疫蛍光染色

CCAO もしくは sham 手術を行っただけのラットは手術の 1 週間後に屠殺し、脳表の血管内皮細胞上の apelin 蛋白および apelin 受容体である APJ 蛋白の染色を、免疫蛍光染色で評価した。Apelin 蛋白と血管内皮の二重染色のために、一次抗体として rabbit polyclonal anti-von Willebrand factor 抗体と mouse monoclonal anti-apelin 抗体を用い、二次抗体として FITC anti rabbit IgG 抗体と Cy3 anti-mouse IgG 抗体を用いた。APJ と血

管内皮の二重染色のために、一次抗体として mouse monoclonal anti-endothelial cell 抗体 (RECA-1)と rabbit polyclonal anti-APJ 抗体を用い、二次抗体として Cy3 anti-mouse IgG 抗体と Alexa Fluor anti-rabbit IgG 抗体を用いた。

血管数測定

CCAO に加えて EMS を行ったラットは EMS の 2 週間後に屠殺し、脳表を含めた視野内の血管数と血管面積、および径が $10\ \mu\text{m}$ 以上の太い血管の血管数を計測した。血管内皮を染色するために、一次抗体として RECA-1 抗体を用い、二次抗体として Cy3 anti-mouse IgG 抗体を用いた。

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

CCAO に加えて EMS を行ったラットを EMS の 1 週間後に屠殺し、2mm の生検パンチで摘出した脳表及び側頭筋をホモジナイズした。VEGF 蛋白の測定は VEGF ELISA kit を、apelin 蛋白の測定は apelin-12 ELISA kit を用いて、プロトコールに則り測定した。

統計学的処理

血管数を評価するための他群間の比較には single ANOVA を用い、有意差がある場合は post hoc Tukey-Kramer test を用いて群間比較を行った。統計学的有意差は $p < 0.05$ とした。

【結果】

慢性脳虚血モデルの脳表において、血管内皮にapelin蛋白とAPJ蛋白が発現している

CCAOを行った1週間後の脳表において、血管内皮に一致してapelin蛋白とAPJ蛋白が発現していることを免疫蛍光染色により示した。

VEGF及びapelinの導入により総血管数および太い径の血管数が増加する

EMS14日後の脳表において、LacZ群と比較してVEGF群およびVEGF+apelin群で有意に血管数が増加していた。また、脳表における視野あたりの血管面積の割合は、LacZ群と比較してVEGF+apelin群で有意に増加していた。

10 μ m以上の太い血管数を計測したところ、VEGF+apelin群では他の3群と比較して太い血管数が増加していた。

VEGF及びapelinの導入により筋肉中の蛋白は増加するが脳表の蛋白は増加しない

ELISAにより、EMS1週間後のVEGFおよびapelin蛋白の定量評価を行ったところ、脳表ではいずれの群も両蛋白が検出されなかった。側頭筋内のVEGF蛋白は4群全てで検出されたが有意差は認めなかった。側頭筋内のapelin蛋白はapelin群とVEGF+apelin群で検出され、有意差は認めなかった。

【考察】

我々は、慢性脳虚血モデルに対して間接血行再建術を行った場合に、VEGF 群とVEGF+apelin 群の血管数が LacZ 群と比較して増加しており、さらに太い径の血管数が VEGF+apelin 群で他群と比較して増加することを示した。慢性脳虚血モデルに対して間接血行再建術を行うことで血管数が増加する可能性があるが、血管新生因子を加えることでさらなる血管新生を促すことができることが複数の論文で報告されている。我々は成熟した血管新生を得るためには、太い径の血管が増加することが重要であると考えた。木戸屋らは apelin/APJ システムが胎生期に血管径の調節に関わってい

ることを示し、さらに虚血肢モデルにおける VEGF と apelin の併用療法により、血管数の増加に加えて、大径血管の増加や血管透過性の低下等の血管成熟を促進させたと報告している。我々は VEGF と apelin を併用することでもやもや病の間接血行再建術の効果を高めることができるのではないかと考えた。

今回の検討で、EMS 後の側頭筋では VEGF や apelin 蛋白が検出されたが、脳表では検出されなかった。VEGF と apelin の筋注により、側頭筋内だけでなく、側頭筋と脳表の接点でも血管新生が生じることにより、脳表に血管新生が促されるのではないかと考えられた。過去には豚に対する EMS モデルにおいて、同様のメカニズムが報告されている。

今回の研究にはいくつかの限界が存在する。観察期間が 1-2 週間と短かったこと、行動学的評価や血管透過性等の血管機能、脳血流の評価を行っていないことである。この手法を臨床応用するためには、上記の内容をさらに研究していく必要があると考えられた。

【結論】

本研究において、慢性脳虚血モデルに対して間接血行再建術に VEGF 遺伝子と apelin 遺伝子を併用することで、血管新生を増強させる効果が認められ、もやもや病の手術効果を高めるための有効な選択肢の一つになり得ると考えられた。