

Title	Novel Therapeutic Strategy to Treat Brain Ischemia Overexpression of Hepatocyte Growth Factor Gene Reduced Ischemic Injury Without Cerebral Edema in Rat Model
Author(s)	島村, 宗尚
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45479
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"＞ 大阪大学の博士論文について ＜/a＞ をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	しまむら 島村 崇 尚
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 19356 号
学位授与年月日	平成 17 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科未来医療開発専攻
学位論文名	Novel Therapeutic Strategy to Treat Brain Ischemia Overexpression of Hepatocyte Growth Factor Gene Reduced Ischemic Injury Without Cerebral Edema in Rat Model (肝細胞増殖因子遺伝子過剰発現によるラット脳梗塞モデルに対する効果の検討)
論文審査委員	(主査) 教授 金田 安史 (副査) 教授 堀 正二 教授 宮崎 純一

論文内容の要旨

[目的]

肝細胞増殖因子 (HGF: hepatocyte growth factor) は培養肝細胞に対する増殖促進活性を指標に発見され、単離された蛋白であるが、これまで肝細胞のみならず様々な組織、細胞で増殖促進作用、抗アポトーシス作用、血管新生作用などの生理作用を有することが報告されている。中枢神経においても HGF は神経突起の伸長作用、神経細胞の保護効果、神経幹細胞から神経への分化促進作用が報告されており、近年、ラットの脳梗塞モデルにおいてリコンビナント HGF が梗塞の進展を抑制することが報告された。しかし、既報告の方法では脳内に多量のリコンビナント HGF を投与する必要があり、臨床応用は困難であると考えられる。そこで我々は、HVJ-envelope ベクターを用いて HGF 遺伝子を 1 回の髄液内投与で脳内に導入し、持続的に HGF を脳内に発現させることにより、脳梗塞の進展を抑制することができるか検討を行った。

[方法ならびに成績]

1) HVJ-envelope ベクターを用いた脳への HGF 遺伝子導入

Wistar rat (雄、270-300 g) を用いた。我々は HVJ-envelope ベクターを用いて大槽内に遺伝子を投与した場合、脳表面に存在する髄膜細胞に遺伝子が導入できることを見だしていたため、本実験では HVJ-envelope ベクターを使用した。HVJ-envelope ベクターに human HGF (hHGF) 遺伝子 (pVAXI/hHGF、CMV プロモーター) を封入し、PBS 100 μ l に溶解し、健常ラット大槽内に投与後 5 日目で髄液内における hHGF の発現を ELISA にて確認した。次に、HGF のレセプターである c-Met の解析を免疫染色にて行った。

結果、hHGF 遺伝子投与群では、髄液内の hHGF 濃度が上昇しており (control vector 群 0 ng/ml、HGF 群 0.31 \pm 0.10 ng/ml、 $p < 0.01$)、c-Met の発現の上昇が大脳皮質で認められた (control vector 群 3 \pm 4%、HGF 群 38 \pm 3%、 $p < 0.01$)。

2) 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) を用いた脳梗塞サイズの評価、神経機能評価

健常ラットに hHGF 遺伝子とコントロールベクターを導入した 2 群を作成し、5 日後にナイロン糸で右中大脳動脈

を閉塞した。24 時間後犠牲死させ、脳梗塞に陥った領域を TTC で判別し、脳梗塞面積を測定したところ、HGF 遺伝子投与群で小さかった (control vector 群 $72 \pm 5.9\%$ 、HGF 群 $48 \pm 3\%$ 、 $p < 0.05$)。

3) 梗塞巣縮小のメカニズムについて検討

TUNEL 染色では borderzone での TUNEL 陽性細胞が、HGF 遺伝子投与群で少なかった (control vector 群 105.8 ± 10.7 cells/mm²、HGF 群 20.0 ± 3.5 cells/mm²、 $p < 0.01$)。また、犠牲死直前に FITC 標識アルブミンを静脈内投与し血管構築を検討したところ、HGF 遺伝子投与群では梗塞巣に近接する領域での血管密度の増加が認められた (control vector 群 $86.3 \pm 7.5 \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$ 、HGF 群 $143.4 \pm 9.1 \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$ 、 $p < 0.01$)。

4) 脳浮腫についての検討

血管新生作用を持つ増殖因子である血管内皮増殖因子 (VEGF: vascular endothelial growth factor) では、浮腫の増悪が報告されていることを考慮し、脳浮腫の程度を検討した。脳梗塞 24 時間後に正常側半球と梗塞巣半球に脳を分割して重量を測定し、24 時間乾燥させた後、再度重量を測定し、水分含有量を算出した。結果、梗塞側半球における水分含有量は、HGF 遺伝子投与群で少なかった (control vector 群 $77.9 \pm 1.0\%$ 、HGF 群 $75.9 \pm 1.0\%$ 、 $p < 0.05$)。また、血液脳関門の破壊の程度の指標であるエバンスブルーを用いた検討では、HGF 遺伝子投与群においてエバンスブルーで染色される範囲が小さかった (control vector 群 $57 \pm 5\%$ 、HGF 群: $24 \pm 6\%$ 、 $p < 0.01$)。以上より、明らかな脳浮腫の増悪は認められなかった。

[総括]

以上より、HVJ-envelope ベクターを用いて hHGF 遺伝子を大槽から 1 回投与することにより、脳浮腫を増悪させることなく、脳梗塞の進展を抑制することが可能であった。機序としては、HGF の抗アポトーシス作用による神経細胞保護作用、血管新生作用が関与していると考えられた。

論文審査の結果の要旨

肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor: HGF) は、近年、脳血管新生作用や神経細胞保護効果などの作用を有しており、脳梗塞後においては神経機能の改善に関与している可能性が報告されている。本論文は、そのような観点から、HGF 遺伝子を HVJ-envelope ベクターに封入してラットの脳脊髄液内に投与することにより、中枢神経にて HGF を過剰発現させ、脳梗塞の進展を抑制することができるかどうか検討を行ったものである。

HGF 遺伝子を投与した群においては、明らかに脳梗塞の拡大が抑制できており、また、脳浮腫の増悪は認めなかった。機序としては、脳梗塞領域と正常領域の境界域における TUNEL 陽性細胞が HGF 投与群では少なく、また、微小血管造影では血管の増生が認められたことより、HGF による抗アポトーシス作用、血流改善による神経細胞の保護が考えられた。この結果は、HGF 遺伝子を用いた遺伝子治療が脳梗塞に対する新規の治療法になりうることを示唆しており、学位の授与に値するものと考えられる。