

論文の内容の要旨

論文題目 塩化カルシウムによるマウス脳底動脈損傷モデルの作成・解析

およびくも膜移植による治療可能性の検討

氏名 苗村 和明

【背景】

Dolichoectasia は脳血管が異常に延長・蛇行・拡張する疾患であり、臨床的には脳卒中や脳幹・脳神経圧迫などを引き起こすことが知られている。しかしながら、脳血管にこのような形態変化が生じる原因に関しては未だ解明されていない点が多い為、結果的に dolichoectasia の定義は画一化されておらず、定義者によって異なっているような状況である。この故に、延長や拡張、蛇行の程度の評価は非常に主観的であり、dolichoectasia には正式な診断基準が存在しない。結果、dolichoectasia に関する研究は研究毎に研究デザインや患者背景、画像モダリティや診断方法等が異なっていることが多く、これらを取りまとめてレビューする作業すら困難であり、おおまかな有病率さえ未だ判明していない。このような状況にある dolichoectasia であるが、その正確な死亡率こそ不明であるものの、4年死亡率 40%、3年死亡率 40%、2.5年死亡率 63%といった報告が認められる。また、追跡中に約半数の症例で進行性の経過を認め、進行性の経過を辿る症例ほど症候性になり易かったとする報告もあり、一旦進行性になった dolichoectasia の予後は極めて不良である。しかしながら、dolichoectasia の特徴である延長・蛇行・拡張に対する特異的な予防法・治療法は未だ存在せず、今後開発される目途も全く立っていない。また、その代わりに種々の外科的手術や血管内治療が試みられてはいるが、いずれの方法も不確実かつ高度の危険を伴うものであり、現時点で科学的根拠を有する方法は存在しない。

本疾患がこのような状況に置かれている原因として、適切な動物モデルが存在せず、基礎的な研究が全く進まないことが挙げられる。Dolichoectasia の病態生理を解明し、その診断・治療へと繋げて行く為には、その足掛かりとなる動物モデルの作成・確立が必須と考えられる。そこで我々は、dolichoectasia との共通点が多いことではしばしば言及されるヒト腹部大動脈瘤をヒントに、その病態生理や治療ターゲットの解明に多大なる貢献をして来た塩化カルシウムによる齧歯類腹部大動脈瘤モデルを参考とし、塩化カルシウムによるマウス脳底動脈損傷モデルを作成・解析した。結果、マウス脳底動脈に拡張性変化を引き起こすことに成功した為、本モデルの作成手順について詳述すると共に、その病態解析につき詳細を報告する。また、くも膜移植による治療可能性についても言及する。

【方法】

本研究に先立ち、浸漬固定と灌流固定とで観察時の血管径や血管形態に与える影響が異なる可能性が示唆された。しかし、これまでそのような報告は無かった為、実際にマウス脳底動脈径や形態に与える影響の違いを両者で比較すべく、パラフィン切片を作成した上で Elastica van Gieson (EVG) 染色にて評価した。

齧歯類全脳虚血モデルの頭蓋頸椎移行部露出手技に、新たに開発した頭蓋頸椎移行部の頭蓋骨を広範に削除する方法を組み合わせることで、広範なマウス脳底動脈露出手技を確立した。こうして露出したマウス脳底動脈に、0.9 % NaCl (Group 1) ないし 0.5 M CaCl₂ (Group 2) に浸漬したキムワイプを用いて 15 分間の薬剤パッチを行なった。更に、広範な Matrix Metalloproteinases (MMPs) 阻害薬として知られるドキシサイクリンを手術 3 日前より内服開始し、sacrifice まで内服継続した群 (Group 3) も準備した。各群の sacrifice のタイミングは術後 4 日 (4d)、7d、14d、28d、42d とし、浸漬固定後にパラフィン切片を作成、EVG 染色および各種免疫組織化学にて評価した。

次いで、本モデルでは術後早期に病態形成に関する重要なイベントが起こっている可能性が示唆された為、4d よりも早い術後 6 時間 (6h)、72h のタイミングでマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を試みた。また、この結果を基に、主に血管壁成分、浸潤細胞、そして MMPs に関して、1h、2h、6h、24h、72h のタイミングで免疫組織化学を行い、その染色性や局在等を検証した。特に MMP9 に関しては、in situ zymography にてそのゼラチナーゼ活性および局在の確認を試みた。

更に、本モデルで起こっている細胞死に関して、アポトーシスとネクローシスに加え、ネクロプトーシスについても検討した。

本モデルではくも膜がその病態に大きな影響を与えている可能性が示唆された為、C57BL/6-Tg (CAG-EGFP) マウスのくも膜を WT の本モデルに移植し、14d、28d でその挙動を確認した。更に、WT のくも膜を WT に移植した群 (Group 4) を用意し、14d、28d、42d のタイミングで血管径や血管形態の評価を行なった。

最後に、本モデルにエラストラーゼを併用すると共に、左総頸動脈結紮・閉塞を追加することで、より dolichoectasia に近いモデルへと改良することを試みた。これを Group 5 とした。

【結果】

灌流固定群では、浸漬固定群に比べて、i) 血管径が拡大する、ii) 中膜平滑筋層が菲薄化する、iii) 内弾性板が伸長する、といった特徴が認められ、固定方法によって観察時の組織学的特徴に差異が生じることが初めて明らかとなった。

本モデルの術後生存率は Group 1 で 97.0 % (32/33)、Group 2 & 3 で 96.2 % (255/265) であり、十分に許容可能な数字であった。

Group 1 では経過中に脳底動脈径に目立った変化を認めなかったのに対し、Group 2 では塩化カルシウムパッチを行なった部位における脳底動脈径拡張が認められた。更に、中膜平滑筋層菲薄

化も実際の dolichoectasia で認められる重要な組織学的特徴の1つであるが、Group 1 では経過を通じてそのような変化を認めないのに対し、Group 2 では中膜平滑筋層が菲薄化する傾向を認め、特に早期ほど顕著であった。また、Group 3 では、Group 2 で認められた脳底動脈径拡張や中膜平滑筋層菲薄化がキャンセルされた。

より早期の検討において、血管壁成分に関しては、パッチ側における中膜平滑筋層菲薄化は2hの時点で既に認められ、形態変化も顕著であった。これに対し、内皮細胞には目立った変化を認めなかった。浸潤細胞に関しては、2h-24hの超早期は好中球の遊走・集簇が顕著であるが、これに遅れる形でマイクログリアが脳幹より遊走し、72h頃にはパッチ側へと多数浸潤して来ている像が認められた。MMPs に関して、今回は MMP9 およびその内因性阻害因子である Tissue Inhibitor of Metalloproteinases (TIMP) 1 に注目した。MMP9 は比較的早期よりパッチ側の中膜平滑筋層外層～外側で発現しているが、24h頃には脳底動脈背側でも発現しており、後者はマイクログリアと共染していた。また、TIMP1 は24hではパッチ側で MMP9 と良く共染しているが、他のタイミングでは発現が目立たなかった。In situ zymography では、24hで脳底動脈背側および腹側でゼラチナーゼ活性が認められたが、手技の問題もあり、それ以外のタイミングでははっきりしなかった。

本モデルではアポトーシスが優位であった。また、RIP3 の高発現も認められ、TUNEL も RIP3 もそのいずれもが主にパッチ側の中膜平滑筋層外側～外層で認められた。

くも膜移植により、移植くも膜が脳底動脈を取り囲んでいる所見が認められた。そして、くも膜移植によって脳底動脈径拡張および中膜平滑筋層菲薄化が有意に抑制された。しかし、移植くも膜が中膜平滑筋細胞と共染する像は認められず、直接分化は明らかでなかった。

改良モデルでは、血管径拡張や形態変化（特に延長・蛇行）がより顕著になると共に、dolichoectasia の鍵となる病理学的特徴の1つである内弾性板の断裂・断片化も認められた。

【考察】

固定方法によって観察時の血管径・形態が変化することから、今後の血管研究では、この事実を念頭に置いて固定方法を選択することが肝要である。

本モデルでは、マウス脳底動脈に拡張および中膜平滑筋層菲薄化を引き起こすことが出来た。しかし、内弾性板断裂・断片化は認めず、この点に留意した本モデルの改良が今後の重要な課題と考える。また、腹部大動脈瘤やその動物モデルでは各種 MMPs が病態形成に重要であると言われているが、本モデルでもドキシサイクリンにより病態形成が抑制された為、やはり同様に MMPs が重要な役割を担っていると考えられた。

より早期の検討により、本モデルにおける塩化カルシウムによる損傷は術直後より顕著だが、血管壁外側がメインで内膜まではあまり影響が及ばないものと考えられた。また、炎症細胞浸潤は腹部大動脈瘤やその動物モデルの病態形成において重要であることが報告されているが、本モデル

でも重要な役割を果たしている可能性が高い。更に、MMP9 の分泌には中膜平滑筋細胞やマイクログリアが関わっていると考えられ、同様の報告がマウス腹部大動脈瘤モデルでも散見されることから、これらから分泌された MMP9 が病態形成に関与している可能性が強く示唆された。

本モデルにおける中膜平滑筋細胞の細胞死はアポトーシスが主体であり、一部ネクロプトーシスを起こしていることも合わせ、その大部分がプログラムされた細胞死であると考えられた。腹部大動脈瘤モデルでも、中膜平滑筋細胞の細胞死はアポトーシスが主体であるという報告が認められる。

くも膜は本モデルの病態形成に対して抑制的・修復的に働く可能性が示唆された。そして、この効果はくも膜細胞が直接中膜平滑筋細胞に分化して血管壁を修復するわけではなく、パラクリンイフェクト等による間接的なものである可能性が高いと考えられた。なお、このくも膜移植に関しては定量性（細胞数、厚み等）や移植タイミング等々、数多くの問題点や課題が山積みの状況ではあるが、くも膜移植が今後の治療のヒントとなる可能性を示せた点において非常に意義があるものと考えられる。

改良モデルでは内弾性板の断裂・断片化を引き起こすことに成功した。今後は本モデルをより良いものへと改良していくと共に、本モデルと実際の *dolichoectasia* との対比を行うことでその類似点や相違点を明らかとし、*dolichoectasia* の病態解明へと繋げていくことが必要と考える。また、これと並行して、現在のくも膜移植の問題点を解決し、くも膜移植によって実際に起こっている事実を明らかにすることで、細胞移植や薬剤開発といった *dolichoectasia* の治療法開発に繋がることが期待される。