

(21)

氏名(生年月日)	アイ 藍	ハラ 原	ヤス 康	オ 雄
本 籍				
学位の種類	博士(医学)			
学位授与の番号	乙第2088号			
学位授与の日付	平成13年9月21日			
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当(博士の学位論文提出者)			
学位論文題目	Quantitative analysis of gene expressions related to inflammation in canine spastic artery after subarachnoid hemorrhage (くも膜下出血に続発する脳血管攣縮血管での炎症関連遺伝子発現の動態に関する研究)			
論文審査委員	(主査) 教授 堀 智勝			
	(副査) 教授 吉原 俊雄, 澤口 彰子			

論 文 内 容 の 要 旨

〔目的〕

今日まで、炎症と脳血管攣縮との関連を示唆する報告は数多くあり、その内容は大きく4つに分類することができる。①攣縮血管の組織学的な炎症性変化、②くも膜下出血後の髄液中炎症関連物質の上昇、③炎症抑制物質による脳血管攣縮の緩解、④タルクやビーズなどの炎症をひき起こす物質での、くも膜下出血後の脳血管攣縮に類似した病態の発症である。しかし、炎症反応に関連した蛋白や遺伝子の発現を、攣縮血管壁で測定し、攣縮との関連を検討した報告はまだない。今回の研究目的は炎症反応に関連した14種類の遺伝子発現の変化を定量的に測定し、くも膜下出血後の攣縮血管壁において遺伝子レベルでの発現の変化をみることにある。

〔対象および方法〕

まず、対象となる炎症関連物質を大きく3つに分類した。①サイトカイン/ケモカイン、②細胞接着因子、③成長因子/細胞外マトリックスであり、これらの炎症関連物質の中で次に示す14物質を抽出し、イヌの自家血2回注入モデルを用いて、血管壁での炎症に関連した物質の遺伝子発現の変化を経時的に定量した。サイトカイン/ケモカインでは、IL1, 6, 8, 10をはじめ、TNF- α を抽出した。細胞接着因子では、fibronectinをはじめとして、ICAM, VCAM, E-selectinを、成長因子/細胞外マトリックスではFGF, TGF- β , Collagen type I, III, IVの遺伝子発現の変化も合わせて測定した。

まず自家血2回注入法でイヌくも膜下出血モデルの作製をした。自家血2回注入法として雑種成犬に経皮的に大槽に動脈血を注入する。初回注入2日後(48時間後)同様に動脈血を注入する。初回注入後2日(D2G), 7日(D7G), 14日(D14G)後血管撮影で血管径の変化を測定の後、脳底動脈を摘出、-90°Cで保存する。それぞれn=5とし、計n=25を作製した。

次に、摘出した脳底動脈からtotal RNA(一頭につき約10~20 μ g)を抽出した後、各モデル由来のtotal RNA 50ngを鋳型に、逆転写反応による相補的DNAの作製、さらに同じ反応チューブで引き続きPCR反応(RT-PCR)を施行した。

〔結果〕

脳底動脈の血管径は、脳血管撮影でくも膜下出血モデルにおいてD7をピークに著明な縮小を認めた。14種類の炎症関連物質の発現レベルの変化は、Taq-Man RT-PCRで同時期に測定したD0の値を1として比較算出した。関連遺伝子の発現変化の特色として、IL-1, IL-8, TNF- α , および、ICAM-1, collagen type-Iの5遺伝子は、有意(p<0.05)なmRNAの発現レベルの変動を示した(repeated ANOVA)。他の遺伝子に関しては有意な変化は認められなかったが、D0よりもそれぞれ発現レベルの上昇を認めることができた。

〔考察〕

今回我々の実験結果により明らかになった事実は、くも膜下出血後の攣縮血管壁内において、その攣縮時期に対応して炎症関連物質が同時期にしかも、系統的

にその発現量が上昇していることである。

炎症のメディエータとして重要なインターロイキンは、今回有意な発現量の上昇を認めたが、これらは、血管収縮に関与するとされる MAP kinase の activator であり、平滑筋細胞の収縮機構を介して脳血管収縮に関与している可能性がある。ICAM-1 はこれまでも、蛋白レベルにおいて内皮での上昇が報告されているが、同時に ICAM-1 の antibody が血管収縮を軽減させたとの報告がある。

我々は、血管壁での遺伝子レベルでの ICAM-1 の発現量の上昇をみたが、その発現部位は明らかではない。炎症に関与する細胞が ICAM-1 の発現の上昇に伴っ

て血管収縮に関係している可能性もある。

また、collagen のアンチセンスを用いて収縮を軽減させたとの報告があるように、collagen の上昇は、血管壁での組織学的な変化に関与していると考えられて、我々の実験結果もこれを示唆するものであった。

〔結論〕

収縮脳血管壁において炎症関連遺伝子は、そのほとんどが D7 に、細胞外マトリックスは D14 に発現レベルの peak が認められた。この発現推移から、炎症反応が脳血管収縮と関連している可能性があること示唆された。

論 文 審 査 の 要 旨

くも膜下出血後の脳血管収縮に炎症関連遺伝子の発現が関与しているかどうかを検討する目的で、犬の大槽内に自家血を day 0; 2 に注入するくも膜下出血モデルを作製した。このモデルの脳底動脈を摘出し RNA を抽出し、RT-PCR 法を用いて IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α などのサイトカイン、ケモカイン、E-secretin, fibronectin, ICAM-1, VCAM-1 などの接着分子、TGF- β , bFGF, collagen I, collagen III, collagen IV などの成長因子や細胞外マトリックスなどの増減を経時的に分析した。くも膜下出血後 7 日目 (day 7) に最も脳底動脈の径はコントロールに比べて細くなっており、脳底動脈の、IL-1 α , IL-6, IL-8, ICAM-1, collagen I が day 0, 2, 7, 14 に有意に増減しており、特に IL-1 α , IL-6, IL-8, ICAM-1 の mRNA のレベルは day 7 で最も高かった。また collagen type 1 は day 14 に最高値を示した。これらの結果は脳血管の持続的収縮にこれらの炎症関連物質が関与していることを示唆しており、明らかに学術の水準を高めた研究であると評価された。

参考論文でも一貫して分子生物学的手法を用いてくも膜下出血後の脳血管収縮を研究しており、研究者としての資質・学力は充分にあるものと確認された。

主論文公表誌

Quantitative analysis of gene expressions related to inflammation in canine spastic artery after subarachnoid hemorrhage (くも膜下出血に続発する脳血管収縮血管での炎症関連遺伝子発現の動態に関する研究)

Stroke Vol 32 212-217 頁 (2001 年 1 月発行) 藍原康雄, 糟谷英俊, 恩田英明, 堀 智勝, 武田純

副論文公表誌

1) イヌくも膜下出血モデルの収縮脳血管壁における炎症関連遺伝子 mRNA の発現量の変化について

て。脳血管収縮 15: 230-233 (2000) 藍原康雄, 糟谷英俊, 恩田英明, 堀 智勝

2) Molecular cloning of a novel brain-type Na-dependent inorganic phosphate cotransporter. (Na 依存性無機リン脳イオンコトランスポートのクローニング) J Neurochem 74: 2622-2625 (2000) 藍原康雄, 恩田英明, 糟谷英俊, 堀 智勝, 武田純, その他 8 名

3) ニカルジピン徐放剤の有用性と安全性—イヌ 2 回出血モデルを用いて—。脳神経外科 28(12): 1071-1075 (2000) 笹原 篤, 糟谷英俊, 川島明次, 藍原康雄, 井澤正博, 堀 智勝