

学位論文題名

虚血性脳血管障害の診断および治療を目指した病態解析

学位論文内容の要旨

虚血性脳血管障害は、脳卒中を発症すると致死率が高いだけではなく救命できた場合でも重度の神経後遺症が生活の質を大きく低下させる疾患である。虚血性脳血管障害における診断、治療を目指した病態評価を目的として、ポジトロン断層撮影(PET)の臨床データ解析およびモデル動物による遺伝子・蛋白発現に関する研究を行った。

1. 診断を目指した PET の臨床データ解析に関する研究

【背景と目的】PET で得られる脳血流(CBF)の情報は脳血管障害の治療方針決定に重要である。PET による CBF 測定は、単一組織コンパートメント・モデル(STCM)上で水の脳血流分配係数(以下、分配係数)を一定値と仮定して行われるが、虚血脳において分配係数が真に一定であるかは未だ示されていない。実際と異なる分配係数の使用は CBF 誤推定につながるため、より正確な診断法の確立を目指して虚血脳の分配係数測定を試みた。また分配係数を一定値としたときの CBF 誤差を検討した。

【対象と方法】22 人の片側性の虚血性脳血管障害患者に対して ^{15}O 標識ガス PET を用いた CBF 検査を行った。 C^{15}O_2 を 1.5GBq/分 の速度で 90 秒間経鼻投与しながら 6 分間の PET 撮影と 16 点動脈採血を同時に行った。STCM と非線形最小二乗法から速度定数 K_1 と k_2 を独立に推定し、梗塞部、虚血部(非梗塞部)での分配係数($=K_1/k_2$)の変化を評価する検討 A と、分配係数を健常者 7 人から得た値で固定した上で CBF を推定し分配係数可変で推定した CBF との誤差を評価する検討 B を行った。

【結果】検討 A では、分配係数(ml/g)は梗塞部 0.55 ± 0.07 、虚血部 0.67 ± 0.06 、対側皮質 0.68 ± 0.05 と梗塞部のみが有意($P < 0.001$)に低値であった。検討 B では、分配係数可変で求めた CBF(ml/100g/min)は、梗塞部 21.3 ± 7.0 、虚血部 33.2 ± 8.0 、対側皮質 39.5 ± 8.1 であったが、分配係数を健常者から得られた 0.70ml/g に固定すると CBF は梗塞部 18.7 ± 7.5 、虚血部 33.0 ± 9.2 、対側皮質 39.5 ± 9.7 となり、分配係数固定により梗塞部では 12%の過小評価($P < 0.001$)となったが虚血部と対側皮質では有意差がなかった。2つの CBF は強く相関した($r = 0.95$, $P < 0.001$)。

【考察】分配係数は平衡状態に達したときの脳組織と血液の H_2^{15}O 濃度比であり、梗塞部では細胞成分が減少するために分配係数が低下していたと推察される。従って分配係数を固定した場合に梗塞部の CBF を過小評価すると考えられたが、検討 B の結果はこの理論に合致した。しかし梗塞部の CBF は著明低値であるためその誤差も小さく、全体の相関に影響を与えることはなかった。

2. 治療を目指した遺伝子・蛋白発現に関する研究

【背景と目的】脳卒中後遺症を持つ患者に広く行われているリハビリテーションが神経機能を回復させるメカニズムには不明な点が多い。より効果の高いリハビリ医療を目指して、

リハビリの動物モデルとして確立している充実環境飼育と分子生物学的手法を用いて回復メカニズムを解明しようと試みた。過去に 4 週間の充実環境飼育での brain derived neurotrophic factor (BDNF) 遺伝子・蛋白の発現低下が報告されている。より深い病態理解のため 2 週間の充実環境飼育での BDNF 測定を行った。

【対象と方法】60 分間の中大脳動脈閉塞術にて脳梗塞を作成した SD ラットをランダムに充実環境 (E 群) もしくは標準環境 (S 群) で飼育した。E 群は多数の遊具を配置した大きなケージで群飼育し、S 群は遊具を配置しない小さなケージで単独飼育した。各環境下で 2 週間飼育した後に脳組織を摘出し、リアルタイム RT-PCR にて BDNF mRNA を、ウェスタン・ブロッティング (WB) にて proBDNF 蛋白、mature BDNF 蛋白を、免疫染色によって MAP-2、Synaptophysin、mature BDNF 蛋白をそれぞれ測定し、2 群間で比較検討した。神経機能評価として neurological severity scores (NSS) を 2 群に分ける直前 (day0) と 2 週間後 (day14) に記録した。

【結果】NSS_{day0} は 8.00 ± 1.02 vs 7.55 ± 0.74 (E 群 vs S 群、以下同じ) と有意差がなかったが、NSS_{day14} は 4.92 ± 1.32 vs 5.73 ± 1.03 ($P < 0.05$) と E 群で良好な神経機能回復を認めた。一方、MAP-2 染色で求めた梗塞面積対側比 (%) は 56.82 ± 7.31 vs 55.44 ± 11.50 (NS) と E 群に梗塞面積減少はなかった。BDNF mRNA は梗塞周辺皮質で 0.75 ± 0.21 vs 1.00 ± 0.35 (NS)、対側皮質で 1.45 ± 0.63 vs 1.54 ± 0.72 (NS) であった。WB による proBDNF は、梗塞周辺皮質で 0.95 ± 0.35 vs 1.00 ± 0.42 (NS)、対側皮質で 0.78 ± 0.29 vs 1.00 ± 0.42 (NS)、mature BDNF は梗塞周辺皮質で 0.59 ± 0.55 vs 1.00 ± 0.84 (NS)、対側皮質で 0.97 ± 0.23 vs 1.00 ± 0.43 (NS) であった。mature BDNF 染色面積 (%) は梗塞周辺皮質で 2.54 ± 1.06 vs 3.02 ± 1.00 (NS)、対側皮質で 3.59 ± 0.83 vs 3.65 ± 0.86 (NS) であった。Synaptophysin 染色面積 (%) は梗塞周辺皮質で 2.57 ± 0.28 vs 2.07 ± 0.23 ($P < 0.001$) と E 群で有意に大きかった。

【考察】E 群の神経機能は有意に改善しシナプス密度の増加も認められたが、梗塞面積の減少は認められなかった。神経機能回復にも関わらず、神経栄養因子である BDNF が mRNA レベル・mature BDNF 蛋白レベルで増加しなかったことは、過去の報告に一致する。また、アポトーシス誘導因子 proBDNF の減少が神経機能にプラスに働く可能性を考えて proBDNF を測定したが、有意差は認められず proBDNF が関与しているとは言えなかった。

【結論】第 1 の研究では、臨床上最も重要な情報である虚血部の血流を正確に測定できるという意味で分配係数を固定する方法の正当性を示した。今回の研究成果により、分配係数固定によって導かれた過去の多くの臨床エビデンスがサポートされ、そして今後行われる PET での CBF 測定の正確性が保証される。第 2 の研究では、充実環境による神経機能回復が BDNF 増加あるいは proBDNF 低下によるものではないことを示した。神経機能回復の核心になっている遺伝子・蛋白を同定することはできなかったが、今後は他の神経栄養因子や炎症関連因子の検討、遺伝子・蛋白の網羅的解析が有用な情報を与えられられる。

学位論文審査の要旨

主査	教授	森本裕二
副査	教授	武蔵学
副査	准教授	飛驒一利
副査	教授	玉木長良
副査	教授	佐々木秀直

学位論文題名

虚血性脳血管障害の診断および治療を目指した病態解析

論文の前半では、診断を目指した PET の臨床データ解析に関する研究を行い、脳血流測定法で用いる水の脳血流分配係数を病的脳組織において測定し、梗塞部では低下するが、虚血部と対側皮質には有意差がなく、分配係数を固定化して算出した脳血流は分配係数可変の場合と良好に相関することを示した。分配係数固定によって導かれた過去の多くの臨床エビデンスがサポートされ、今後行われる PET での CBF 測定の正確性が保証されることを述べた。論文の後半では、治療を目指した遺伝子・蛋白発現に関する研究を行い、脳虚血モデルラットを充実環境で飼育し、BDNF 遺伝子・蛋白の測定を行った。2 週間の充実環境飼育によって神経機能が改善しシナプス新生が促進されたが、BDNF 遺伝子・蛋白の有意な変化は認められなかった。メカニズムを特定するには至らなかったが、BDNF の関与の程度について重要な情報が得ることができたと報告した。

武蔵教授から、充実環境での運動量および質についての質問があり、広いケージ内を往来し running wheel などの遊具を用いて運動するので、運動量が多く、運動の質にも差があると考えられるが、今回の検討では運動量の定量的評価は行わなかったことを回答した。また、BDNF の time course とサンプリング点についての質問があり、BDNF が虚血刺激の 24 時間後から数日後をピークとして上昇することがわかっており、2-4 週間後はピークを過ぎていること、また早期には充実環境による神経機能改善がまだ現れていないので今回は神経機能改善が見られる 2 週間という時期を選択したが、早期にも遺伝子・蛋白の変化が生じている可能性があり今後の課題にしたいと回答した。

飛驒准教授から、分配係数自体の診断的価値を問われ、分配係数の変化は FLAIR 画像で脳梗塞となっている部位に限局するため、MRI 以上の価値はないと回答した。OEF 等のパラメータとの相関について質問され、今後の検討課題にすると回答した。神経膠腫や多発性硬化症などの病態での分配係数について質問があり、脳血管疾患以外では経験がないが今後機会があれば測定してみたいと回答した。BDNF 測定値に有意差がでなかったことについて、皮質よりも海馬のほうが BDNF の機能が解明されているので海馬についても見る必要があるという指摘があり、今回は運動機能と相関させることが目的であったため皮質を優先したと回答した。

佐々木教授から、APQ4 仮説は APQ4 を画像化しなければ仮説を実証できないという指摘

があり、APQ4 を考慮しないモデルを用いて算出された結果から APQ4 のことを推測するのは問題があることを認め、今後は APQ4 を加味したモデル（コンパートメントの個数を増やすなど）を検討していきたいと回答した。また、脳虚血後の機能回復メカニズムを解明する上で特定の分子にターゲットをのぼった研究手法の妥当性について質問があり、今回は十分な結果が出ていないので報告できないが遺伝子群としての網羅的解析が進行中であることを説明した。また、ウィリス動脈輪の発達していないスナネズミを使うと虚血性変化が強く現れるので異なる結果が出る可能性について指摘された。

森本教授から、今回の CBF 測定値が理論値よりも低い理由を問われ、多施設研究で北大の CBF は他施設と同水準であったことを説明した。PET による脳血流測定が今後占める臨床的位置を問われ、本検査が登場して 30 年になるが依然として普及が進まず、サイクロトロンと PET カメラが隣接した大規模な設備が必要であるため、本検査が今後普及する PET を基準として簡便な脳血流測定法の開発が進むだろうと回答した。シナプトフィジン発現に影響する他遺伝子の変動について質問があり、先行研究の網羅的解析では神経栄養因子で変動したのは BDNF のみであることから、現時点の知見では他に有力な候補は見つかっていないと回答した。

玉木教授から、基礎実験に今後追加する検討項目を問われ、組織を採取するタイムポイントを増やすことと、網羅的解析で遺伝子群として群間比較をすることが必要であることを回答した。PET 定量値が過小評価となる原因を問われ、平滑化フィルターと ROI の使用が部分容積効果を介して過小評価を引き起こしている可能性があるとは回答した。

本論文の前半は Nuclear Medicine Communications 誌にて高く評価され、後半は Neuroscience Letters 誌にて査読中であるが、虚血性脳血管障害の診断・治療に寄与することが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。