



Effect of VEGF Receptor Antagonist (VGA1155) on Brain Edema in the Rat Cold Injury Model

Koyama, Junji

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2007-03-25

(Date of Publication)

2012-04-24

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4040

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004040>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 1 4 6 】

氏 名・(本 籍) 小山 淳二 (兵 庫 県)
博士の専攻分野の名称 博士 (医学)
学 位 記 番 号 博い第1844号
学位授与の 要 件 学位規則第5条第1項該当
学位授与の 日 付 平成19年3月25日

【 学位論文題目 】

Effect of VEGF receptor antagonist (VGA1155) on brain edema
in the rat cold injury model.

(VEGFレセプター拮抗剤 (VGA1155) のラット脳凍結損傷モデル
における脳浮腫に対する治療効果)

審 査 委 員

主 査 教 授 丹 生 健 一
教 授 清 野 進
教 授 具 英 成

はじめに

脳浮腫は細胞膜の浸透圧調節機能の障害により、脳細胞実質内に浮腫液が貯留する細胞毒性脳浮腫と、血液脳関門の障害により、血管壁の透過性が高まり、血清成分が細胞間に貯留する血管性脳浮腫に大別される。血管性脳浮腫は脳虚血、外傷性脳損傷、脳腫瘍、脳膿瘍などの原疾患に関与し、原疾患に伴う脳損傷を増悪させる事が知られている。一方、VEGF (Vascular endothelial growth factor) は血管新生因子であると共に血管透過性亢進因子であり、さまざまな脳損傷に伴う血管性脳浮腫の増悪に関与していると考えられている。VEGF の阻害は新たな脳浮腫治療のターゲットとなる可能性があると考えられ、VEGF レセプター結合阻害剤 (VGA1155) の脳浮腫に対する治療効果をラット脳凍結損傷モデルを用いて検討した。

方法、結果

凍結損傷モデルは Fischer 344 雄性ラット 8~11 週(165~200g)を使用し、ネンプタールにて麻酔後、Bregma より 5mm 右外側、2mm 後方に液体窒素で冷却した銅製プローベ (直径 4mm) を経頭蓋的に 30 秒間接触させを作成した。まず、凍結損傷部周囲の大脳皮質における経時的 VEGF 蛋白発現を、以下の手法で確認した。凍結損傷 30 分後、12, 24, 48 時間後に断頭・摘出した脳をホモジェナイズし、大脳皮質における VEGF 蛋白発現量を VEGF ELISA kit(R&D systems)を用いて測定した。VEGF 蛋白発現は凍結損傷 30

分後、48 時間後で有意な上昇を認めた (Fig 1)。

次に、実験動物をシャム手術群、凍結損傷 Vehicle 群、凍結損傷 VGA1155 投与群に振り分け、VGA1155 の脳水分含率に与える影響を、投与量と投与時間について検討した。左右大脳皮質の脳水分含率は凍結損傷 24 時間後に断頭、脳を摘出し乾燥重量計測法により測定した。VGA1155 投与が凍結損傷前後の血圧、血液ガス、電解質投与量に影響を与えなかった事を確認した (Table. 1)。VGA1155 の投与量についての検討では VGA1155 投与群を 5, 25, 50mg/kg (全て凍結損傷 30 分後に腹腔内投与) に振り分けた。Vehicle 群に対して VGA1155 25, 50mg/kg 投与群で脳水分含有率は有意に低下した (Fig. 2a: ** $p < 0.01$)。投与時間についての検討では VGA1155 投与群を凍結損傷 30 分前、30 分後、4 時間後 (全て 25mg/kg 腹腔内投与) に振り分けた。Vehicle 群に対して VGA1155 凍結損傷 30 分前、30 分後投与群で脳水分含有率の上昇は有意に抑制された (Fig. 2b: 30 分前、* $p < 0.05$; 30 分後、** $p < 0.01$)。

凍結損傷 24 時間後までの血液脳関門透過性をエバンスブルー静注後生理食塩水にて灌流した後に、左右大脳皮質を摘出し、血管外に漏出したエバンスブルーを蛍光吸光度計にて測定した。血液脳関門透過性も Vehicle 群と比較して VGA1155 30 分後投与群 (25mg/kg, 50mg/kg) で有意に抑制された (Fig. 3a,3b: 25mg/kg, ** $p < 0.01$; 30 分後、* $p < 0.05$)。

凍結損傷 1 週間後の脳損傷病変の体積測定をパラフィン包埋後、薄切した

組織切片をニッスル染色して行った。VGA1155 投与群 (25mg/kg) では、Vehicle 群と比較して脳損傷病変体積は減少する傾向は示したが、統計学的に有意な減少ではなかった (Fig. 3c, 3d)。

考察

VEGF は血管新生因子であると同時に強力な血管透過性亢進因子である事がよく知られている。脳腫瘍、外傷、脳虚血といった様々な脳障害に伴う脳浮腫の形成に VEGF が関与していることが示唆されており、その作用を抑制する事が脳浮腫に対する新たな治療になりうると考えられた。これまでに fusion protein mFlt(1-3)-IgG による VEGF 作用の阻害により虚血再灌流に伴う脳浮腫が抑えられる事や、ラット two-vein occlusion model において VEGF 拮抗剤が血管透過性を減少させ、静脈性梗塞の範囲を減少させる事が示されている。

本研究で使用した VGA1155 は VEGF とその主な受容体である Flt-1 と KDR/Flk-1 との結合を阻害し、抗血管新生作用や、血管透過性抑制作用を有する。VEGF 受容体を長時間阻害する事は、VEGF の持つ血管新生作用による脳損傷の回復を阻害してしまう可能性があるが、本研究において用いたようなごく早期での投与のみであれば、VGA1155 の有する抗血管新生作用が損傷を増悪させる可能性は低いと考えられた。また、VGA1155 は他のリガンドと受容体の結合を阻害する事なく、高い特異性をもって VEGF とその受

容体である Flt-1 と KDR/Flk-1 との結合を阻害するとされている。本研究においても VGA1155 の投与は生理学的パラメーターに影響を与えず、ラット脳凍結損傷モデルにおいて、重篤な副作用無く抗浮腫作用を示す事が可能であった。

VGA1155 の投与は凍結損傷後早期の脳血液関門の透過性亢進を抑制し、脳浮腫を軽減させる結果となったが、1 週間後の脳損傷病変の範囲は減少しなかった。これは脳凍結損傷モデルでの病変の大部分が可逆的な病変であり、不可逆的損傷に陥る範囲が小さいとと考えられた。本研究では、凍結損傷 30 分後で損傷周囲大脳皮質において VEGF の発現が上昇している事が確認され、4 時間後の VGA1155 投与では脳水分含有率を低下させる事が出来なかった。この実験結果からは、VEGF 受容体を拮抗させて脳浮腫を抑制するには、損傷後早期に VEGF 受容体を拮抗させる必要がある事が示唆された。本研究では VGA1155 投与による長期的影響は今後の課題であるが、VEGF 受容体の拮抗・阻害は脳浮腫に対する新たな治療手段となりうると考えられた。

結論

VEGF レセプター拮抗剤 (VGA1155) は凍結損傷後の脳浮腫に対して血管透過性を抑制し、抗浮腫作用を有すると考えられた。

Figure 1

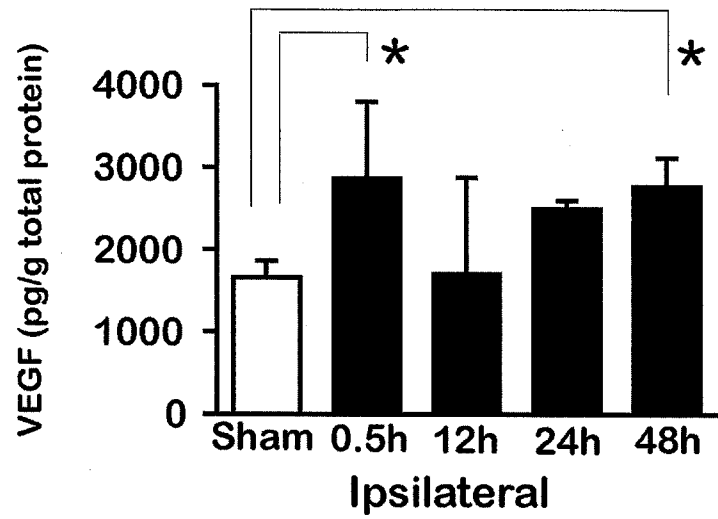


Figure 2

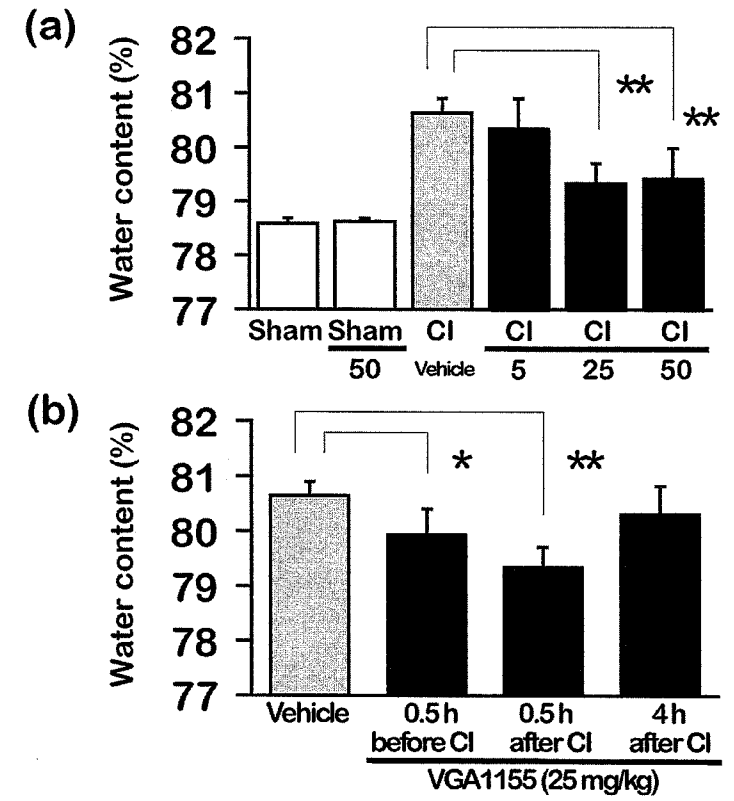


Figure 3

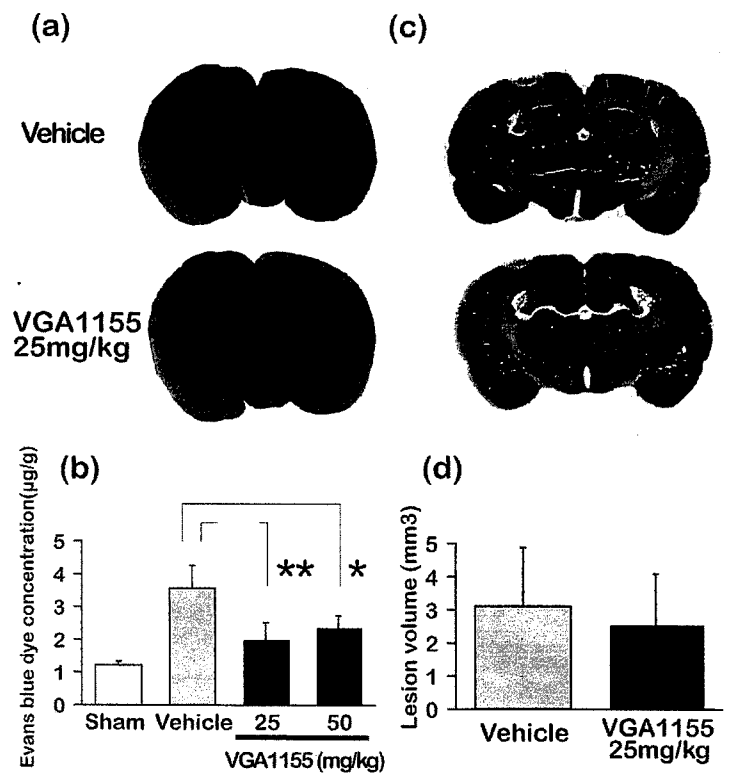


Table 1. Physiological Parameters^a

	Blood pressure (mm Hg)	PCO ₂ (mm Hg)	PO ₂ (mm Hg)	pH	Glu (mg/dl)	Na ⁺ (mEq/l)	K ⁺ (mEq/l)	Osmolality (mOsm/l)	Weight loss (g)
Sham operated									
Preop	101.2±8.7	40.6±3.9	77.0±7.8	7.44±0.01	162.5±23.8	139.0±1.4	3.8±0.4	301.8±2.5	
Postop	100.6±10.3	40.4±2.5	80.0±4.7	7.43±0.03	157.3±37.0	140.8±2.6	3.6±0.3	304.4±4.1	
24h	97.4±7.7	40.6±1.4	81±5.4	7.43±0.01	141.3±6.9	140.0±0.8	3.2±0.3	300.4±1.1	6.3±3.4
VGA1155-treated (50mg/kg)									
In normal rat									
Preop	98.5±3.3	40.8±5.7	70.3±5.9	7.42±0.04	168.8±13.3	140.8±1.5	3.9±0.6	305.0±1.3	
Postop	98.8±15.4	37.8±3.7	75.3±7.0	7.45±0.02	142.5±19.1	136.8±6.8	3.8±1.1	300.7±6.0	8.0±6.2
Vehicle									
Preop	100.7±4.4	40.5±5.5	75.3±5.9	7.44±0.03	148±11.9	141.3±1.0	3.7±0.3	302.6±1.5	
Postop	99.5±2.8	39.4±1.7	84.3±6.3	7.44±0.03	148.5±12.3	140.5±3.7	3.4±0.6	303.6±3.8	
24h	92.2±6.5	37.7±1.8	71.0±6.3	7.46±0.02	148.3±18.3	137.8±9.0	4.0±1.5	296.0±14.5	12.3±2.2 ^c
VGA1155-treated (50mg/kg)^b									
at 0.5 h after cold injury									
Preop	102.4±8.1	39.5±6.8	69.5±3.7	7.41±0.02	148.8±15.4	141.8±3.5	3.6±0.3	307.9±5.1	
Postop	103.2±10.8	43.3±5.0	76.0±1.8	7.41±0.02	151.8±10.6	142.3±1.3	3.3±0.2	306.1±2.9	
24h	95.7±5.7	42.8±3.6	70.0±5.1	7.42±0.05	123.0±11.5	142.3±4.1	3.2±0.4	302.7±4.5	12.4±2.5 ^c

^a Values are expressed as means ± S.D. (n = 4, in each group). There were no significant differences in arterial blood gases, blood glucose concentration, osmolality or electrolytes of the blood plasma among the groups.

^b VGA1155 was administered at 0.5 hour after the cold injury.

^c P < 0.01 versus sham-operated group.

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 1846号	氏 名	小山 淳二
論文題目 Title of Dissertation	Effect of VEGF receptor antagonist (VGA1155) on brain edema in the rat cold injury model. VEGFレセプター拮抗剤 (VGA1155) のラット脳凍結損傷モデルにおける脳浮腫に対する治療効果		
審査委員 Examiner	主 査 丹生 謙一 Chief Examiner 副 査 清野 達 Vice-examiner 副 査 具 莫成 Vice-examiner		
審査終了日	平成 19年 3月 14日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

はじめに

頭部外傷、脳血管障害、脳腫瘍など各種の中枢神経系疾患において、脳浮腫は本来の病態を悪化させる大きな要因であるが、その治療法は古典的なものが主流を占めている。一方、VEGF (Vascular endothelial growth factor) は血管新生因子であると共に血管透過性亢進因子であり、さまざまな脳損傷に伴う血管性脳浮腫の増悪に関与しているとされている。VEGFの阻害は脳浮腫治療のターゲットとなる可能性があると考えられ、VEGFレセプター結合阻害剤 (VGA1155) の脳浮腫に対する治療効果を、ラット脳凍結損傷モデルを用いて検討した。

方法・結果

凍結損傷モデルはFischer 344 雄性ラット (165～200g) を使用し、ネンブターールにて麻酔後、液体窒素で冷却した銅製プローベ (直径 4mm) を右頭頂骨より経頭蓋的に30秒間接触させ作成した。まず、凍結損傷部周囲の大脳皮質における経時的VEGF蛋白発現をVEGF ELISA kit (R&D systems) を用いて測定。VEGF蛋白発現は凍結損傷30分後、48時間後で有意な上昇を認めた。次に、実験動物をシャム手術群、凍結損傷 Vehicle 群、凍結損傷 VGA1155 投与群に振り分け、VGA1155の脳水分含率に与える影響を、投与量と投与時間について検討した。左右大脳皮質の脳水分含率は凍結損傷24時間後に断頭、脳を摘出し乾燥重量計測法により測定した。VGA1155投与は生理学的パラメーターに影響を与えなかった。VGA1155の投与量についての検討では Vehicle 群に対して VGA1155 25, 50mg/kg 投与群で脳水分含有率は有意に低下した。投与時間についての検討では Vehicle 群に対して VGA1155 凍結損傷30分前、30分後投与群で脳水分含有率の上昇は有意に抑制された。凍結損傷24時間後までの血液脳関門透過性を凍結損傷後エバンスブルーを静脈内投与し、大脳皮質に漏出したエバンスブルーを蛍光吸光度計にて測定した。血液脳関門透過性も Vehicle 群と比較して VGA1155 30分後投与群 (25mg/kg, 50mg/kg) で有意に抑制された。凍結損傷1週間後の脳損傷病変の体積測定をニッスル染色した組織切片を用いて行った。VGA1155投与群 (25mg/kg) では、Vehicle 群と比較して脳損傷病変体積は減少する傾向は示したが、統計学的に有意な減少ではなかった。

考 察

本研究で使用した VEGF1155 は他のリガンドと受容体の結合を阻害する事なく、高い特異性をもって VEGF とその受容体である Flt-1 と KDR/Flk-1 との結合を阻害するとされている。実際、VEGF1155 の投与は生理学的パラメーターに影響を与えず、ラット脳凍結損傷モデルにおいて、重篤な副作用無く抗浮腫作用を示す事が可能であった。VEGF1155 は VEGF とその主な受容体である Flt-1 と KDR/Flk-1 との結合を阻害し、抗血管新生作用や、血管透過性抑制作用を有するが、本研究において用いたようなごく早期での投与のみであれば、VEGF1155 の有する抗血管新生作用が損傷を増悪させる可能性は低いと考えられた。

VEGF1155 の投与は凍結損傷後早期の脳血液関門の透過性亢進を抑制し、脳浮腫を軽減させる結果となったが、脳凍結損傷モデルでの病変の大部分が可逆的な病変である為か、1 週間後の脳損傷病変の範囲は減少しなかった。脳凍結損傷後の血管透過性亢進に関与する VEGF 発現は比較的遅い時期のものという報告もあるが、今回の ELISA を用いた実験では凍結損傷後早期にも損傷部周囲に VEGF の発現を認め、VEGF1155 投与は損傷後早期においてより抗浮腫効果が強かった。

結 論

本研究は VEGF の脳浮腫への関与について検討したものであるが、VEGF レセプター拮抗剤 (VEGF1155) が凍結損傷後の脳浮腫に対して血管透過性を抑制し、抗浮腫作用を有するという重要な知見を見出し、価値ある集積であると考えられる。よって、本研究者は医学 (博士) の学位の資格を有すると認める。