

氏名(本籍)	伊藤嘉朗(埼玉県)			
学位の種類	博士(医学)			
学位記番号	博甲第6608号			
学位授与年月日	平成25年3月25日			
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当			
審査研究科	人間総合科学研究科			
学位論文題目	<b>Angiogenesis therapy for brain ischemia by fibroblast growth factor-2 slow-releasing drug delivery system</b> (FGF-2徐放ドラッグデリバリーシステムによる脳血管新生療法)			
主査	筑波大学教授	医学博士	玉岡晃	
副査	筑波大学准教授	博士(理学)	依馬正次	
副査	筑波大学准教授	博士(医学)	長谷川雄一	
副査	筑波大学助教	博士(理学)	山下年晴	

## 論文の内容の要旨

### (目的)

FGF-2は血管内皮細胞の遊走や増殖や血管の成熟にまで関与しており、間葉系細胞や神経外胚葉系細胞も刺激している。さらには内因性の血管新生因子を誘導することで直接的および間接的に血管新生に関与するとされている。このような作用から、FGF-2は脳梗塞の新規治療薬として期待され、動物実験においてもその有効性が認められたが、生体内での生物学的活性がきわめて短いことから実臨床では使用されていない。

当研究室ではFGF-2徐放ドラッグデリバリーシステムとしてFGF-2アパタイトコーティングを作製した。これはFGF-2が含まれた過飽和リン酸カルシウム溶液に生体材料を浸すことで、生体材料の表面にリン酸カルシウムが沈着してアパタイト層を形成する際にFGF-2も生体材料に沈着される作用を利用したものである。これを生体内に挿入すると、FGF-2が徐放されるシステムである。脳梗塞モデルに対して、このFGF-2アパタイトコーティングを使用して、生体内で活性を発現して、脳血管新生によって脳梗塞治療効果を有するかを検証した。

### (対象と方法)

Vitro実験から血管新生に最適な濃度になりうるFGF-2アパタイトコーティング、低濃度(4%)FGF-2をコーティングしたFGF-lowと高濃度(10%)FGF-2をコーティングしたFGF-high、を作製した。脳梗塞モデルは同側頸動脈・中大脳動脈閉塞(Brint)モデルを使用した。開頭部位に作製した生体材料を挿入した。対象はFGF-2をコーティングしないBHB群、FGF-2をコーティングせず脳梗塞部位に滴下したFGF-drop群、FGF-lowを使用したFGF-low群、FGF-highを使用したFGF-high群に分けた。脳梗塞作製後14日目に脳を摘出した。検討項目は脳血流比、神経症状、脳梗塞体積、血管密度、蛍光免疫化学組織、内因性血管新生因子の遺伝子発現量を検討した。

### (結果)

UV2細胞を用いた実験からFGF-2濃度が10ng/mLで最も血管新生効果を有していると推測された。FGF-low、FGF-highともに16日間にわたってFGF-2が徐放していることを確認した。

神経学的評価と脳血流は FGF-low 群と FGF-high 群は BHB 群と FGF-drop 群と比べて有意に改善していた。脳梗塞の体積は、FGF-low 群と FGF-high 群は BHB 群と FGF-drop 群と比べて有意に縮小していた。HE 染色で観察すると、脳梗塞は脳皮質、島、被殻、外包に形成されていたが、FGF-low 群と FGF-high 群では被殻外側と外包の脳梗塞が抑制されていた。脳梗塞周囲には血管新生がみられたが、FGF-low 群と FGF-high 群では単位面積当たりの血管密度は有意に高く、血管径が太く、血管平滑筋の肥厚した比較的成熟した血管が多く認められた。FGF-2 アパタイトコーティングから徐放された FGF-2 が、生体内で実際に活性を有していることを確認するために、FGF-2 から誘導される内因性の (Vascular endothelial growth factor) VEGF と (Cyclooxygenase-2) COX-2 の発現を検証した。蛍光免疫染色では FGF-low 群と FGF-high 群において、脳梗塞周囲で血管内皮細胞を中心として VEGF の発現がみられ、さらに FGF-high 群における脳梗塞周囲の VEGF と COX-2 の遺伝子発現量は他群と比較して高い傾向があった。

#### (考察)

FGF-2 アパタイトコーティング群 (FGF-low 群と FGF-high 群) は有意に脳梗塞体積が抑制されており、神経症状も有意に改善していた。特に脳梗塞が抑制された領域は外包と被殻外側で、中大脳動脈と前大脳動脈および中大脳動脈皮質枝と穿通枝からの血流の境界領域にあたる。同領域には成熟した新生血管が多く認められていた。さらに FGF-2 アパタイトコーティングが生体内で活性を有していることを確認した。このことから FGF-2 アパタイトコーティングから徐放された FGF-2 が生体内で効果を発現して、脳梗塞周囲の低還流領域に血管新生が生じ、脳血流を改善させて低還流領域の脳梗塞を抑制したものと考えられる。

FGF-low 群と FGF-high 群は、臨床症状や組織学的評価では差は見られなかったが、脳梗塞体積では p 値に差がみられたり、内因性血管新生因子の遺伝子発現が FGF-high 群で多く認められた。これらの結果は、FGF-low 群は 14 日目には沈着していた FGF-2 がほぼ徐放されて、有効濃度域以下になっていたためと思われる。そうしたことから FGF-high 群のほうが、治療効果が高いものと思われる。

FGF-2 徐放ドラッグデリバリーシステムとしては、他にハイドロゲルを用いたものや遺伝子操作を行ったものがある。いずれも安全性の問題や発現のコントロールが難しいことから臨床応用に至っていない。今回の FGF-2 アパタイトコーティングの作製には、すべて医療材料として認可済みの材料や薬品を使用しているので、安全性は高く生物毒性は極めて少ないものと思われる。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、脳梗塞モデルに対して、FGF-2 アパタイトコーティングを用いることで FGF-2 による血管新生作用による脳梗塞抑制効果を示した。FGF-2 の作用機序、病変への到達経路など、今後解明すべき課題は残っているものの、FGF-2 アパタイトコーティングは安全性も高く、今後脳梗塞の新規治療法として期待でき、臨床的にも価値のある知見であると考えられた。

平成 25 年 1 月 7 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。