研究報告

ラット脳挫傷モデルにおける VEGF の発現とその役割

田戸 雅宏¹⁾ 重森 裕¹⁾ 福島 匡道¹⁾ 大島 秀規^{1,2)}
 森 達郎¹⁾ 前田 剛¹⁾ 川又 達朗¹⁾ 相澤 信²⁾
 片山 容一¹⁾

¹⁾日本大学医学部脳神経外科学系神経外科学分野

²⁾日本大学医学部機能形態学系生体構造医学分野

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Expression in Contused Brain Tissue:

The Role of Angiogenesis after Traumatic Brain Injury in Rats

Masahiro TADO¹⁾, Yutaka SHIGEMORI¹⁾, Masamichi FUKUSHIMA¹⁾,
 Hideki OSHIMA^{1,2)}, Tatsuro MORI¹⁾, Takeshi MAEDA¹⁾, Tatsuro KAWAMATA¹⁾,
 Shin AIZAWA²⁾ and Yoichi KATAYAMA¹⁾

¹⁾Department of Neurological Surgery, Nihon University School of Medicine

²⁾Department of Functional Morphology, Nihon University School of Medicine

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) is a protein associated with angiogenesis and a potent vascular permeability factor. This study was undertaken to assess the neurological and histological roles of VEGF after TBI (Traumatic Brain Injury) in a rat model of cerebral contusion. We examined the time course of VEGF expression, BBB (Blood Brain Barrier) disruption, and brain edema after traumatic brain injury. The necrosis volume and motor performance were measured to determine tissue repair and functional recovery after the brain injury. The contusion necrosis volume was aggravated at 21 days after the injury ($115.0 \pm 14.3 \text{ mm}^3$ vs. $137.3 \pm 21.1 \text{ mm}^3$, $p < 0.05$) and motor performance, which was evaluated at 1, 3, 7, 14, 21 days after the injury by Rota rod test, recovered less in the bevacizumab (VEGF antibody) treated group ($78.4 \pm 9.8\%$ vs. $103.6 \pm 7.7\%$, $p < 0.05$). We conclude that VEGF may have therapeutic potential for tissue repair and functional recovery after the injury, via angiogenesis.

Key words: cerebral contusion, VEGF: Vascular endothelial growth factor, angiogenesis, vascular permeability, bevacizumab

脳挫傷, 血管内皮増殖因子, 血管新生, 血管透過性, ベバシズマブ

(J. Nihon Univ. Med. Ass., 2010; 69 (5): 298–303)

はじめに

頭部に強い外力が加わり、脳組織そのものが挫滅した状態が脳挫傷である。脳挫傷後に認められる脳浮腫は受傷直後、わずかに mass effect を伴う脳浮腫であっても、受傷後早期 (6 時間以内) に急激に増悪し、非常に強い mass effect を呈する。挫傷性浮腫は、脳卒中・脳腫瘍等の他の脳疾患による脳浮腫にはみられない際立った臨床的特徴を有する¹⁾。挫傷性浮腫を顕著に表す臨床経過が talk & deteriorate であり、会話可能であった患者が数時間で昏睡状態に陥り、時に脳ヘルニアをきたし死に至る²⁾。この挫傷性浮腫の病態は明らかになってはいないが、血管透過性亢進による血管原性浮腫が関与していると考えられている³⁾。

VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor: 血管内皮増殖因子) は強力な血管新生と血管透過性亢進作用を持つ生理活性因子であり⁴⁾、消化器癌の浸潤・発育、糖尿病性網膜症の進展・予後等に深く関わっている^{5,6)}。近年、

中枢神経領域でも VEGF は注目されており、脳虚血・脳腫瘍の分野で報告が散見される^{7,8)}。

本研究では脳挫傷における VEGF の発現が血管新生を導き神経組織保護・修復を促す予後改善因子として働くのか、あるいは血管透過性を亢進させ、脳浮腫形成を増悪させる予後不良因子として働くのかを明らかにする目的で、ラット脳挫傷モデルを用い組織学的・神経学的な検討をおこなった。

I. 対象ならびに方法

7 週～9 週齢 (体重 200 g～300 g) の雄 S-D (Sprague-Dawley) ラットを用いた。動物の取り扱いおよび実験は、Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research (National Research Council, National Academy Press, Washington, DC, 2003) と「日本大学医学部動物実験指針」を遵守し、「日本大学医学部実験動物取扱要領」に準じておこなった。

Fig. 1 CCI-6.0 device
tip diameter: 5 mm, impact velocity: 6 m/s,
penetration depth: 3 mm

脳挫傷モデルの作成

ハロセン麻酔下に定位的に頭部を stereotaxic apparatus に固定し, heating pad を用い直腸温を 37.5°C に保った。頭蓋骨を露出させ, 左頭頂部に bregma より尾側 2.5 mm, 左外側 3 mm を中心に直径 6 mm の骨窓を設け Controlled Cortical Impact (CCI) device (Virginia Commonwealth University medical center, USA) で脳挫傷を作成した (Fig. 1)⁹⁾。打撃速度は 6 cm/sec, 打撃深度は 3 mm に設定した。sham 群は骨窓の作成のみとした。

VEGF 蛋白の発現量

VEGF の発現量は ELISA kit を用い定量した。ペントバルビタール (50 mg/kg) による腹腔内麻酔下にラットを断首し, 脳挫傷周囲の大脳皮質を 50 mg 採取した。検体をホモジネートした後, 遠心分離し上清液を蛍光吸光度計で測定した。脳挫傷作成 3, 6, 12, 24 時間後, 及び 3, 5, 7 日後に VEGF の定量を行った (N=5)。

VEGF・Flk-1・vWf の免疫組織化学染色

Cryostat を用い 14 μ m 厚の凍結冠状断切片を使用し, 以下の手順で免疫組織化学染色をした¹⁰⁾。親水化した切片を, 1%ホルマリンを含む PBS (Phosphate-Buffered Saline) で固定した。十分な洗浄の後に, 0.3% H₂O₂ を含むエタノールで内因性ペルオキシダーゼの除去を 20 分間行った。一次抗体には抗 VEGF ラビットポリクロナール抗体 (Santa Cruz-152, Sweden, dilution 1:50), 抗 Flk-1 ラビットポリクロナール抗体 (Santa Cruz-315, Sweden, dilution 1:50), 抗 vWf マウスモノクロナール抗体 (Serotec Antibodies, UK, dilution 1:20) を用いた。各々一次抗体を 0.01M TB (Triethanolamine-Buffer pH: 8.5・Na⁺ free) で希釈し, 4°C・24 時間かけて一次抗体の感作を行った。各々の一次抗体に対応して, 1%抗ラビットまたはマウス IgG, 3%ヤギまたはウマ血清, 0.01M TB (pH: 8.5・Na⁺

free) を用い, 室温で 3 時間かけ二次抗体の感作を行った。発色は Elite Kit (Vectastain, Vector Laboratories, Burlingame, Canada) を用いた。発色剤は 3, 3' diaminobenzidine を用い塩化ニッケルで増感した。

血管透過性亢進・血液脳関門の破綻

血液脳関門破綻の程度は, 血管透過性亢進により漏出した EB (Evans Blue) を蛍光吸光度計で計測した。Uyama ら¹¹⁾ の方法をもとに検体摘出 1 時間前に, 2% EB 溶液を尾静脈より注入し (4 ml/kg) 灌流させた。ラットをペントバルビタール (50 mg/kg) による腹腔内麻酔後に開胸し, 経心室的に PBS で灌流した後に脳実質を摘出し検体とした。50% trichloroacetic acid を加えホモジネートし遠心分離を行った。上清液を抽出し 100% エタノールを加え, 蛍光 plate reader で EB の定量を行った。各々の time point を脳挫傷作成 3, 6, 12, 24, 48, 72 時間後とした (N=6)。

脳挫傷後の脳浮腫形成

脳挫傷後の脳浮腫形成の程度は乾燥重量法を用い水分含有率・Water content で評価した。ラットをペントバルビタール (50 mg/kg) による腹腔内麻酔後, 断首し脳実質を摘出し左右の大脳半球に分割し重量を計測した。各々の検体を Drying Oven を用い 24 時間, 110°C で乾燥させ重量を計測, 下記の方法で水分含有率を算出した。

$$\text{Water content} = (\text{wet weight} - \text{dry weight}) / \text{wet weight} \times 100$$

各々の time point を脳挫傷作成 3, 6, 12, 24, 48, 72 時間後とした (N=5)。

組織学的検討と挫傷性壊死体積の評価

ラットをペントバルビタール (50 mg/kg) による腹腔内麻酔後, 断首し脳実質を摘出した。bregma より 2.5 mm 尾側を中心に前後に 1 mm 厚ずつの凍結冠状断切片を作成, 各切片から 14 μ m の切片を切り出し, 1 日乾燥させ H-E 染色を行った。後述する bevacizumab (抗 VEGF モノクロナール抗体) の体内平均滞留時間は 17.1 $\pm$ 4.7 day と報告されているため¹²⁾, 脳挫傷作成 21 日後に bevacizumab 投与群と非投与群の挫傷性壊死体積を比較した。壊死組織体積は NIH Image を用い, 壊死組織面積と各切片の厚みを利用し積分により算出した (N=5)。

運動機能の評価

脳挫傷ラットの運動機能は Rota rod device を用い評価した (Fig. 2)。Rota rod device は TBI 後の運動機能評価に広く用いられており, 回転するローターからラットが落下するまでの滞在時間を測定し, 運動機能・疲労度の指標とした。脳挫傷の作成直前に基礎値を測定し¹³⁾, 各日の計測値を基礎値の割合で評価した (N=5)。

bevacizumab (抗 VEGF モノクロナール抗体)

抗 VEGF モノクロナール抗体である bevacizumab (AVASTIN 100 mg/4 ml, Roche, Swiss) を用い, VEGF 活性阻害の影響について各々の実験で行った。投与群は脳

Fig. 2 Rota rod device
「MK-630 室町機械株式会社」

Fig. 3 The time course of VEGF expression

ELISA showed that VEGF was elevated as early as 12h after the injury. And after 24h, 3d, 5d the significant difference was recognized.

挫傷作成直後に、bevacizumab 10 mg/kg をラットの尾静脈より投与した。bevacizumab の浸透圧は生理食塩水とほぼ同等であるため、非投与群には同量の生理食塩水を静脈投与した¹⁴⁾。

統計学的分析

統計解析は、Bertlett の等分散検定を行い、等分散を確認後、two-way ANOVA with Tukey's test を行った。また二群比較は Mann-Whitney U-test を用いて解析を行った。p < 0.05 をもって有意とした。

II. 結 果

脳挫傷における VEGF の影響

VEGF の蛋白発現量は ELISA 法で経時的に定量した。開頭のみを行った sham 群と比較すると 24 時間後、3、5 日後に有意に発現の増加を認めた (Fig. 3)。

VEGF 発現量が最大を示す脳挫傷作成 3 日後の検体を用い VEGF, Flk-1, vWf の発現部位の分布を調べた。VEGF 受容体である Flk-1 と新生血管の指標として vWf の染色を行った。各染色とも対側の脳組織と比較し脳挫傷周辺の大脳皮質・海馬の血管内皮細胞に多くの発現が認められた。対側に著明な発現は認められなかった (Fig. 4)。

血管透過性亢進・血液脳関門の破綻は EB の漏出を利用し評価した。冠状断で観察すると漏出した EB は挫傷脳組織のみならず、隣接する皮質脳挫傷直下の海馬まで漏出が及んでいた。EB の漏出は sham 群と比較して脳挫傷作成 3 時間後より漏出し 6 時間後に最大となった。

脳浮腫形成は乾燥重量法による水分含有率で評価した。sham 群と比較すると、脳挫傷作成 6 時間後より水分含有率は増加を認め 24 時間で最大となり、その後の水

Fig. 4 VEGF Immunohistochemistry at 3 days after the injury
 left: contusion area $\times 20$, : vascular endothelial cells.
 upper right: ipsilateral vascular endothelial cell $\times 400$.
 lower right: contralateral vascular endothelial cell $\times 400$.
 The Immuno-histchemistrys of Flk-1 and vWf is same of VEGF.

Fig. 5

left: The comparison of the BBB disruption. right: The comparison of the water content.
 The significant difference was not recognized in both comparatives.

分含有率は低下した。対側半球脳組織の水分含有率に有意差は認められなかった。

bevacizumab による VEGF 活性の阻害効果

前述の実験結果をもとに、血液脳関門の破綻は脳挫傷作成 6 時間後に、そして脳浮腫形成は作成 24 時間後に VEGF 活性の阻害効果の検討を行った。血液脳関門ならびに脳浮腫形成では、bevacizumab の投与による有意な変化は認められなかった (Fig. 5)。

VEGF による神経組織保護・修復の指標として壊死組織体積を計測した。脳挫傷作成 21 日後に bevacizumab 投与群と非投与群の比較を行った。bevacizumab 投与群では非投与群と比較し有意に壊死組織体積が増加していた (Fig. 6)。

運動機能の評価は脳挫傷を作成した 1, 3, 7, 14, 21 日後に行った。脳挫傷作成 1, 3 日後において、脳挫傷群では sham 群と比較し有意に運動機能の低下を認めた。脳挫

Fig. 6 Contusion necrosis volume at 21 days after the injury.
 The necrosis volume of the bevacizumab administered group is greater than that of the none administered group.

傷群の運動機能は 3 日後より改善傾向を示し、7 日後に sham 群と有意差が認められなくなった。一方、bevacizumab 投与群では脳挫傷作成 3, 7, 14 日後に脳挫傷単独

Fig. 7 Motor performances were measured by the use of a Rota rod device. The significant difference on 3, 7, 14 days after the injury was recognized between the none administered group and the administered group. It is thought that the recoveries of motor performances in bevacizumab administered group are delayed.

群と比較し有意に運動機能が低下した。bevacizumab 投与群は7日後から運動機能の改善が認められたが、運動機能の改善は脳挫傷単独群と比較して有意に遅延していた (Fig. 7)。

III. 考 察

VEGF は強力な血管透過性亢進作用を持ち、さらに血管新生作用に関わる重要な生理活性因子である。血管透過性亢進因子として有名なヒスタミンは内皮細胞の増殖刺激活性、すなわち血管新生の作用は有していない。一方、血管新生の作用を持つ FGF (Fibroblast Growth Factor) は血管透過性亢進作用が無い。血管透過性亢進と血管新生の両作用を併せ持つことは、VEGF の分子生物学的な大きな特徴と言える。

現在 VEGF には VEGF-A, B, C, D, E の 5 つのフェノタイプが報告されており、主要なフェノタイプとして VEGF - A が確認されている。VEGF 受容体は VEGFR (VEGF Receptor) - 1, 2, 3 の 3 種類が同定されており、特に VEGFR-2 (Flk-1/KDR) は血管内皮細胞に発現し、血管内皮細胞の増殖、遊走、管腔形成、生存を促し生理的・病的血管新生、血管透過性亢進に強い影響を及ぼしている¹⁵⁻¹⁷⁾。

脳挫傷に対する VEGF の血管透過性亢進と血管新生作用

血液脳関門は主として、血管内皮細胞の tight junction と基底膜で維持されており、血液脳関門の破綻が脳浮腫形成に深くかかわっていることが古くから知られている³⁾。脳挫傷において VEGF の発現が血管内皮細胞の障害に密接に関わっているのであれば、血管透過性亢進が血液脳関門の破綻を惹起し脳浮腫増悪にいたる。

本研究では挫傷脳の血液脳関門の破綻、すなわち EB の漏出は、脳挫傷作成 3 時間後から認められ 6 時間で最大となった。一方、挫傷性浮腫の形成は 6 時間後より急激に増加し 24 時間で最大となった。また、bevacizumab 投与により VEGF 活性は抑制されたものの、EB の漏出ならびに挫傷性浮腫の形成に有意な変化は認められなかった。これらの結果は脳挫傷による血液脳関門の破綻とその後に引き続く脳浮腫形成に VEGF 活性の関与がないことを示している。ELISA 法で定量した挫傷脳における VEGF 活性が、脳挫傷作成 3 日後に最大を示していることも上述を裏付けている。

VEGF が持つ血管新生作用は、胎生初期の脈管系や組織の形態形成に関連している¹⁸⁾。一方、病的状態では腫瘍細胞の増殖過程の他、創傷治癒部、関節リウマチにおける炎症性滑膜などで VEGF の発現と血管新生の関連が報告されている。Lennmyr はラット p-MCAO (permanent Middle Cerebral Artery Occlusion) モデルにおける VEGF, Flk-1, Flt-1 の発現は、虚血 3 日後に脳梗塞辺縁部に最も強く認められる事を明らかにした¹⁹⁾。また、Zhang らはラット脳塞栓モデルにおいて human recombinant VEGF 165 の腹腔内投与の効果について検討し、虚血後 9 日目に梗塞周辺部の血管新生ならびに微小循環の著明改善が認められたことを明らかにしている²⁰⁾。

本研究により脳損傷後に見られる VEGF の活性上昇は挫傷脳周辺で強く認められ、脳挫傷作成 3 日後を最大とし、その発現は血管新生に関わっていると考えられた。

脳挫傷の組織学的検討

血管新生ならびに微小循環の改善による神経保護・修復を調べる目的で、挫傷性壊死組織体積を計測した。bevacizumab 投与群では非投与群と比較して脳挫傷作成

21 日後では有意に壊死組織体積の拡大を認めた。この結果により挫傷脳ならびに周辺組織において、VEGF 活性を抑制することが血管新生のもつ組織修復作用を阻害し、壊死組織体積の拡大につながったと考えられる。

脳挫傷の神経学的検討

近年、臨床では重症頭部外傷の生命予後のみならず、機能予後の改善に高い関心が集まっている。本研究では機能予後を評価する目的で Rota rod device を用い、脳挫傷後のラットの運動機能、疲労度について検討した。その結果、bevacizumab 投与群では脳挫傷作成 3, 7, 14 日後には脳挫傷単独群と比較し有意に運動機能の低下を認めた。また、bevacizumab 投与群は 7 日後から運動機能の改善が認められたが、脳挫傷単独群と比較し 14 日後まで有意差を持って運動機能の回復の遅延が認められた。VEGF 活性を抑制することにより脳挫傷後の運動機能は有意に改善遅延が認められた。

挫傷脳の血流は広い範囲で低下しているものの、脳梗塞でみられるような動脈の完全閉塞ではないため、ある程度の血流は保たれている。したがって挫傷脳周辺の VEGF 活性上昇が血管新生・血流改善を促し、組織修復機転に大きく働いていると考えられた。

結 論

脳挫傷後の VEGF の発現は脳挫傷 3 日後で最大となる。VEGF の持つ血管透過性亢進作用は、早期の挫傷性浮腫には関わっておらず、血管新生による神経保護、組織修復、そして機能予後に影響を及ぼしていると考えられた。

今後、VEGF の持つ血管新生作用が新規治療のターゲットになりうると考えられた。

謝辞 本研究の遂行におきまして、多大なる協力を日本大学医学部機能形態学系生体構造医学分野 高木るり教室員に頂きましたことを感謝いたします。

文 献

- 1) Katayama Y, Kawamata T. Edema fluid accumulation within necrotic brain tissue as a cause of the mass effect of cerebral contusion in head trauma patients. *Acta Neurochir Suppl* 2003; **86**: 323–327.
- 2) 川又達朗, 片山容一. 頭部外傷をめぐる controversies: 脳挫傷・脳内血腫の手術適応, タイミングと方法. 救急医学, 2001; **25**: 1589–1593.
- 3) 片山容一, 川又達朗. 挫傷性浮腫の発生機転. 神経外傷, 2000; **23**: 10–14.
- 4) Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987; **235**: 442–447.
- 5) Senger DR, Perruzzi CA, Feder J, et al. A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines. *Cancer Res* 1986; **46**: 5629–5632.
- 6) Wakabayashi Y, Usui Y, Okunuki Y, et al. Correlation of vascular endothelial growth factor with chemokines in the vitreous in diabetic retinopathy. *Retina* 2010; **30**: 339–344.
- 7) Kimura R, Nakase H, Tamaki R, et al. Vascular endothelial growth factor antagonist reduces brain edema formation and venous infarction. *Stroke* 2005; **36**: 1259–1263.
- 8) Jansen M, de Witt Hamer PC, Witmer AN, et al. Current perspectives on antiangiogenesis strategies in the treatment of malignant gliomas. *Brain Res Rev* 2004; **45**: 143–163.
- 9) Dixon CE, Clifton GL, Lighthall JW, et al. A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat. *J Neurosci Methods* 1991; **39**: 253–262.
- 10) Skold MK, von Gertten C, Sandberg-Nordqvist AC, et al. VEGF and VEGF receptor expression after experimental brain contusion in rat. *J Neurotrauma* 2005; **22**: 353–367.
- 11) Uyama O, Okamura N, Yanase M, et al. Quantitative evaluation of vascular permeability in the gerbil brain after transient ischemia using Evans blue fluorescence. *J Cereb Blood Flow Metab* 1988; **8**: 282–284.
- 12) Salgaller ML. Technology evaluation: bevacizumab, Genentech/Roche. *Curr Opin Mol Ther* 2003; **5**: 657–667.
- 13) Hamm RJ, Pike BR, O'Dell Dm, et al: an evaluation of its effectiveness in assessing motor deficits after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 1994; **11**: 187–196.
- 14) Bauerle T, Hilbig H, Bartling S, et al. Bevacizumab inhibits breast cancer-induced osteolysis, surrounding soft tissue metastasis, and angiogenesis in rats as visualized by VCT and MRI. *Neoplasia* 2008; **10**: 511–520.
- 15) 松本太郎. VEGF レセプターシグナル伝達機構. 日本大学医学雑誌, 2007; **66**: 206–211.
- 16) Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biophys Res Commun* 1989; **15**: 851–858.
- 17) Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, et al. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983; **219**: 983–985.
- 18) Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996; **380**: 435–439.
- 19) Lennmyr F, Ata KA, Funa K, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors (Flt-1 and Flk-1) following permanent and transient occlusion of the middle cerebral artery in the rat. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998; **57**: 874–882.
- 20) Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, et al. VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. *J Clin Invest* 2000; **106**: 829–838.