

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19978

研究課題名(和文) 新たな脳動脈瘤実験モデルによる機序の解明および増大、破裂予測法の開発

研究課題名(英文) A new in vitro research model for intracranial aneurysm to bridge the gap between biology and flow dynamics

研究代表者

金子 直樹 (Kaneko, Naoki)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：10741712

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、患者特異的な脳動脈瘤形状のシリコン血管モデル内に血管内皮細胞を接着、流体力学的負荷をかける方法を開発し、そのモデル内における血管内皮細胞の遺伝子発現を測定、数値流体力学と増大、破裂等の患者情報との関連を検討することである。まず3次元プリンタで脳血管モデルを印刷したときに生じる積層段差を、脳動脈瘤形状の変化を最低限にしつつ平滑化する方法を開発、報告した。さらに3次元回転培養、還流培養後に共焦点顕微鏡で観察し親動脈と脳動脈瘤の血管内皮細胞の特徴、遺伝子発現、フローパターンが異なることを示した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to develop a new in vitro model for cerebral aneurysm research to study the biological effect of complex-flow stress on endothelial cells in three-dimensional (3D) patient-specific vascular geometry. We developed and reported a method to smoothen the surface of 3D printed object while minimizing the change in aneurysmal shape. Furthermore, we demonstrated that endothelial cells in the aneurysm exhibited different morphology, gene expression and flow pattern compared with the parent artery.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：脳動脈瘤 数値流体力学

1. 研究開始当初の背景

未破裂脳動脈瘤は 50 歳以上における有病率が約 3%といわれ、破裂をすればくも膜下出血となり約 30%が死亡する。脳動脈瘤手術で得られた組織の検討から破裂部における炎症、apoptosis, 酸化ストレスなどの存在が報告されているもののいまだ増大、破裂のメカニズムは明らかでない。UCAS Japan により年間の破裂率が約 1%で、大きさ、部位が破裂率に影響することが示された。しかし小さな脳動脈瘤でも外来での経過観察中に破裂をする症例があり正確な予測は難しい。

数値流体力学 Computational Fluid Dynamics (CFD) 解析による脳動脈瘤の研究はコンピュータ性能の向上もあり論文数も飛躍的に増加しており、増大、破裂の予測をできるツールになることが期待されている。しかし現状では以下の問題点がある。

1. 生物学的情報の欠乏: CFD は画像データから得られた血管内腔構造からのコンピュータ上での計算であり、脳動脈瘤内腔で起きている生物学的変化は示せない。
2. 計算上の制約: 計算モデルを単純化かつ条件の仮定をする必要があり実際の血行動態を反映できていない。
3. 多数のパラメーターと臨床的エビデンスの欠乏: CFD 研究から多数のパラメーターが発表されているが、いまだ増大、破裂を予測できるパラメーターはない。WSS(Wall Shear Stress) は最も代表的なパラメーターであるが、高い場合あるいは低い場合で破裂しやすいという相反する意見が存在する。

増大、破裂で発生している生物学的変化と CFD パラメーターの関連を示せれば、より CFD による脳動脈瘤の増大、破裂予測の可能性が高まると期待できる。

2. 研究の目的

我々のグループは 3 次元プリンタを用いて安価、短時間でクリッピングシミュレーション用の脳動脈瘤シリコーン血管を作製する技術を開発し報告してきた(Mashiko et al., World Neurosurg, 2013)。その技術を発展させ血管内皮細胞をシリコーン血管内に接着させる技術を開発した。

本研究の目的は、その技術を用いて脳動脈瘤形状のシリコーン血管内に接着した内皮細胞の遺伝子発現を調べることが可能なモデルを確立すること、さらにそのモデルを用いて増大、破裂等の患者情報、CFD 解析と遺伝子発現との関連を検討することである。

3. 研究の方法

<3 次元脳動脈瘤シリコーン血管モデルの作製>

三次元回転撮影や MRA などの DICOM データから画像編集ソフトを用いて対象血管を抽出し stl file に変換し 3 次元プリンタにより

プラスチック血管を造形した。透明シリコーンを塗布、乾燥させ溶媒で内部のプラスチックを溶解し中空管状のシリコーンを得た。

<3 次元シリコーン血管への血管内皮細胞の接着、還流培養>

作製されたシリコーン血管モデルを入れたチューブに血管内皮細胞懸濁液に入れ、培養装置内において 3 次元回転装置でゆっくり回転しながら培養した。それにより血管内皮細胞が複雑な形状のモデル内に均一に接着させた。その後内皮化されたシリコーン血管モデルを回路に接続し、血液と似た粘度をもつ培養液を流量調節可能なポンプにより還流した。

<遺伝子発現の解析>

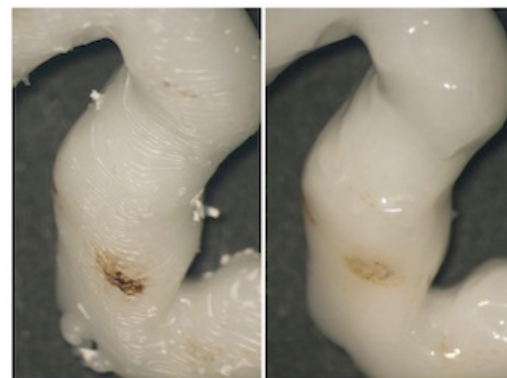
還流培養後にシリコーン血管モデル内の動脈瘤、親動脈等の内皮細胞から RNA を抽出し qPCR を行い遺伝子発現の解析を行った。また、同様の条件で還流培養されたモデルをパラホルムアルデヒドで固定し免疫染色を行い血管モデルにおけるタンパク質の分布を共焦点顕微鏡で観察した。

<血流解析>

商用ソフトウェアにより、血管モデル作製に利用した stl ファイルの動脈瘤形状において還流培養をした条件で演算した。後処理として、壁せん断応力の時間平均と最大値、壁せん断応力が最大となる時間、せん断応力との標準偏差と平均値の比、OSI、その他を算出した。

4. 研究成果

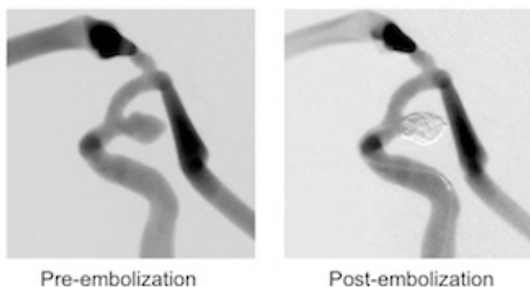
まず実物大の脳動脈瘤形状を持つシリコーン血管内腔において血管内皮細胞培養を最適化する条件の検討をした。血管内皮細胞の接着にはシリコーンモデル内腔が平滑であることが特に重要であることがわかり、血管モデルの化学的平滑化方法およびシリコーン血管作製を効果的、安易に行う方法を開発した(Kaneko et al., Scientific Reports, 2016)。



Pre-dipping

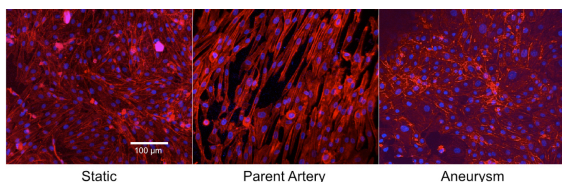
Post-dipping

この透明シリコン血管モデル作製法は安価で短時間であるため、患者ごとの血管内治療の術前シミュレーションにも有用であった。



その手法で作製されたシリコン血管形状を作製前の患者データと比較し、正確に血管モデル作製ができていることを確認した。また、疎水性であるシリコンの表面処理法や3次元回転の速度を検討し、血管内皮細胞の接着を改善させた。

3次元回転、還流培養後の免疫染色、共焦点顕微鏡での観察では、シリコン血管内では血管内皮細胞が隙間なく単層培養されていた。また、血管内皮細胞は親動脈において紡錘状で流れに対し平行に並んでいたのに対し、動脈瘤内においては細胞形状が不整形となり、細胞面積が不均一となったことを確認した (Kaneko et al., J NeuroInterventional Surg, in press)。



さらに還流培養後 RT-PCR により血管内皮細胞の遺伝子発現の変化を確認する方法を確立した。後に増大することが確認された脳動脈瘤内における血流解析結果と炎症に関わる遺伝子発現において興味ある知見が得られた。

今後症例数を増やし CFD 結果と遺伝子発現変化の関連を検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1) Namba K, Higaki A, Kaneko N, Mashiko T, Nemoto S, Watanabe E.: Microcatheter Shaping for Intracranial Aneurysm Coiling Using the 3-Dimensional Printing Rapid Prototyping Technology: Preliminary Result in the First 10 Consecutive Cases. World Neurosurg. 2015 Jul;84(1):178-86, 査読有

2) Kaneko N, Mashiko T, Ohnishi T, Ohta M, Namba K, Watanabe E, Kawai K.: Manufacture of patient-specific vascular replicas for endovascular simulation using fast, low-cost method. Sci Rep. 2016 Dec 15;6:39168, 査読有

3) Kaneko N, Mashiko T, Namba N, Tatushima S, Watanabe E, Kawai K.: A patient-specific intracranial aneurysm model with endothelial lining: A novel in vitro approach to bridge the gap between biology and flow dynamics. J Neurointerv Surg. 2017, in press, 査読有

[学会発表] (計 2 件)

1) 金子直樹, 庄島正明, 益子敏弘, 渡辺英寿: 脳動脈瘤の増大、破裂機序を解析する新たな in vitro モデルの確立. 第 38 回日本バイオレオロジー学会年会, 東京, 2015 年 6 月 6-7 日.

2) 金子直樹, 太田信, 益子敏弘, 渡辺英寿: 血管モデル作成のための ABS 樹脂平滑化法の検討. 第 31 回 NPO 法人日本脳神経血管内治療学会学術総会, 岡山, 2015 年 11 月 19-21 日.

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金子直樹 (KANEKO NAOKI)
自治医科大学・医学部・助教
研究者番号: 10741712

(2)研究分担者 ()

研究者番号:

(3)連携研究者 ()

研究者番号:

(4)研究協力者

安藤 譲二 (ANDO JOJI)

獨協医科大学・医学部・特任教授

研究者番号:20159528

竹島 太郎 (TAKESHIMA TARO)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号:50554565

庄島 正明 (SHOJIMA MASA AKI)

東京大学・医学部附属病院・特任講師

研究者番号:80376425