

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11074

研究課題名(和文) マクロファージ特異的Toll Like Receptor 4の脳動脈瘤への影響

研究課題名(英文) Effect of Macrophage-Specific Toll Like Receptor 4 on Cerebral Aneurysms

研究代表者

三井 一葉 (MITSUI, Kazuha)

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号：90568106

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、マクロファージ特異的Toll Like Receptor 4 (TLR4)が脳動脈瘤に影響するのか解明し、そのメカニズムを調べることである。  
細胞特異的ノックアウトマウスおよびリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)法などを用いて検討した。マクロファージ特異的TLR4は脳動脈瘤破裂に影響し、またTLR4ノックアウトマウスにおいて脳血管における炎症性サイトカインの発現が抑制されていることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳動脈瘤の破裂メカニズムにマクロファージ特異的TLR4が関与している可能性が本研究より示唆された。また、TLR4ノックアウトマウスにおいて、脳血管での炎症性サイトカインの発現が抑制されていることが示唆された。以上の成果および、研究者の過去の研究より、炎症に関与するTLR4が脳動脈瘤破裂に影響を与えており、特にマクロファージ細胞表面に存在するTLR4が重要であることが示唆された。TLR4機能を抑制する薬剤などにより脳動脈瘤の破裂を予防することにつながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate whether macrophage-specific Toll Like Receptor 4 (TLR4) affects cerebral aneurysms and to investigate the mechanism of this effect. Cell-specific knockout mice and real time polymerase chain reaction (RT-PCR) were used to examine. We found that macrophage-specific TLR4 affects cerebral aneurysm rupture and that the expression of pro-inflammatory cytokines in cerebral blood vessels is suppressed in TLR4 knockout mice.

研究分野：脳動脈瘤

キーワード：脳動脈瘤 Toll Like Receptor 4 炎症

## 1. 研究開始当初の背景

画像技術の向上、健診を受ける機会の増加などにより未破裂脳動脈瘤の患者数は増加している。それに伴い、クリッピング術やコイリング術の麻酔や未破裂脳動脈瘤を合併した患者の非脳外科手術の麻酔をする機会が増加している。しかし、脳動脈瘤破裂を予防するために、どの麻酔薬が最適であるか分かっていない。プロポフォールは Toll Like Receptor 4 (TLR4) やそのメディエーターの Myeloid differentiation primary response protein 88 (MyD88) を抑制することにより脳内の炎症を抑えることが分かっている 1)。近年、脳動脈瘤の病態において炎症が重要な因子であることが分かってきた 2)。また、TLR4 は各種炎症性サイトカインの発現を通じて炎症を引き起こす 3)。

このような背景のもと、我々はマウスモデルを用いて、まず TLR4 や MyD88 が脳動脈瘤の破裂に影響するか研究し、以下の事実を突き止めた。

- ・ TLR4 アンタゴニストを使用し、体内の全ての TLR4 機能を非特異的に低下させると有意に脳動脈瘤の破裂率が低下する。
- ・ 体内の全ての TLR4 が非特異的に欠損した TLR4KO マウスを用いると、野生型マウスに比較して有意に脳動脈瘤の破裂率が低下する。

TLR4 カスケードには MyD88 依存性と非依存性のものがある。どちらの経路が脳動脈瘤破裂に影響するか解明するため、MyD88KO マウスを用いた研究から以下の事実を突き止めた。

- ・ 体内の全ての MyD88 を非特異的に欠損させた MyD88KO マウスでは、野生型マウスに比較して有意に脳動脈瘤の破裂率が低下する。よって、MyD88 依存経路は脳動脈瘤破裂に重要である。

脳動脈瘤に関して、炎症性細胞の中でもマクロファージが重要な役割を担っていることが解明されてきている 4)。TLR4 は様々な細胞の表面に出現しており、どの細胞表面の TLR4 が脳動脈瘤に対して影響しているかは分かっていない。

以上の背景より、新たな脳動脈瘤破裂予防戦略としてマクロファージ特異的 TLR4 に関する研究をするに至った。「マクロファージ特異的に出現している TLR4 が脳動脈瘤破裂に特に重要な役割を果たしている」との仮説より、

- ・ マクロファージ特異的 TLR4 の脳動脈瘤への影響の検討
- ・ 脳動脈瘤における TLR4、マクロファージ、炎症性サイトカイン発現の証明

を本研究の目的とした。本研究により TLR4 による脳動脈瘤破裂の機序が明確にされる。将来の段階として、プロポフォールが TLR4 を抑制することにより脳動脈瘤破裂を予防するか研究を進めていきたい。

## 2. 研究の目的

脳動脈瘤の破裂に関して炎症の関わりが注目されている。TLR4 は炎症の重要な因子であるため脳動脈瘤との関係が示唆される。また、一般的な麻酔薬であるプロポフォールは TLR4 機能を抑制することで脳内の炎症を抑制する。我々はこれまでに、体内の全ての TLR4 機能を非特異的に欠損させると脳動脈瘤の破裂率が低下することを突き止めた。

本研究の目的は、マクロファージ特異的 TLR4 が脳動脈瘤に影響するのかが解明し、そのメカニズムを調べることである。マクロファージ特異的 TLR4 と脳動脈瘤の関係を解明し、今後 TLR4 機能抑制を通じてプロポフォールが周術期の脳動脈瘤破裂を予防しうるか検証していきたい。

## 3. 研究の方法

### (1) マクロファージ特異的 TLR4 の脳動脈瘤への影響の検討に関して

TLR4<sup>f/f</sup> LysMCre マウス (マクロファージを含むミエロイド系細胞特異的に TLR4 を欠損させたノックアウトマウス) を作製する。マウス脳動脈瘤モデルを用いて、このノックアウトマウスと同胞のマウスとを比較して脳動脈瘤の破裂率が低下するか検証する。

具体的には

- ・ 実験動物の作製

マクロファージ特異的 TLR4 ノックアウトマウス (TLR4<sup>f/f</sup> LysMCre マウス) を条件付きノックアウトシステム (Cre-loxP システム) を用いて作成する。出生した 8~10 週の雄マウスをポリメラーゼ連鎖反応法を用いてノックアウト群と対照群に分ける。

- ・ 脳動脈瘤モデルの作製

マウス用麻酔器を用いて、マウスを十分な麻酔深度に維持する。マウス用血圧測定器を用いて、

平常状態の血圧を測定後、左腎摘出術を行う。その7日後、同様に十分な麻酔深度に維持したマウスの皮下にデオキシコルチコステロン (DOCA) を投与し、1%塩化ナトリウムを与えることで高血圧を発症させる (DOCA-salt hypertension)。血圧はその後、14日目、21日目、28日目に測定する。また、DOCA 投与と同時にステレオタキシックフレームを用いて脳底部へ豚豚エラストアーゼ 35 ミリユニットを投与する。高血圧とエラストアーゼによる血管壁の脆弱化を組み合わせることにより脳動脈瘤を作製する。

#### ・脳動脈瘤の形成、破裂の評価

脳動脈瘤を作製したマウスを脳動脈瘤形成が認められる14日目から破裂が落ち着く28日目まで14日間観察する。観察期間中に神経学的検査 (0:正常~5:自発運動なし) で評価し、異常が認められるマウスを安楽死させ脳を摘出する。観察用カメラを用いて脳底部に脳動脈瘤が存在するかを確認する。

### (2) 脳動脈瘤における TLR4、マクロファージ、炎症性サイトカイン発現の証明に関して

TLR4KO マウスおよび、TLR4f/f LysMCre マウスの脳動脈瘤を組織学的に観察する。対照群と比較し、これらのマウスの脳動脈瘤における TLR4、マクロファージ、炎症性サイトカインの発現が低下しているかリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) と蛍光免疫染色法を用いて検証する。

具体的には

#### ・RT-PCR での検討

TLR4KO マウスおよび TLR4f/f LysMCre マウスに同様の方法で脳動脈瘤を導入する。13日目に安楽死させ脳組織を摘出する。摘出した脳組織から脳底動脈を取り出しホモジナイズする。その後、RT-PCR 装置を用いて各炎症性サイトカインがどの程度発現しているか確認する。確認した炎症性サイトカインは IL-6、IL-1、MCP-1、TNF- $\alpha$ 、MMP-9、NF- $\kappa$ Bp65 である。

#### ・蛍光免疫染色法

TLR4KO マウスおよび TLR4f/f LysMCre マウスに同様の方法で脳動脈瘤を導入する。導入後6日目に安楽死させ脳組織を摘出する。クリオスタットを用いて摘出した脳組織を凍結切片標本にする。TLR4 をターゲットにした抗体 (Goat 抗 TLR4 抗体) とマクロファージをターゲットにした抗体 (Rabbit 抗 CD45 抗体) を用いて蛍光免疫染色し、それぞれの発現の程度を対照群と比較する。脳動脈瘤において TLR4 とマクロファージの発現の関係性を解明する。

## 4. 研究成果

### (1) マクロファージ特異的 TLR4 の脳動脈瘤への影響の検討に関して

マクロファージ特異的 TLR4 ノックアウトマウス群において脳動脈瘤の破裂率低下が認められた。マクロファージ特異的 TLR4 が脳動脈瘤の破裂に影響していることが示唆された。

### (2) 脳動脈瘤における TLR4、マクロファージ、炎症性サイトカイン発現の証明に関して

野生型マウスに比較して、TLR4KO マウスにおいて脳血管における炎症性サイトカインの発現が抑制されていることが認められた。(脳動脈瘤導入前の状態と比較検討)

TLR4 の欠損が脳血管における炎症性サイトカインの発現を低下させ、脳動脈瘤破裂予防効果を来していることが示唆された。

以上の結果より、マクロファージ特異的 TLR4 が脳動脈瘤破裂に影響すること、また TLR4 機能抑制により脳血管における炎症性サイトカイン低下が脳動脈瘤破裂予防効果を来していることが示唆された。プロポフォールが TLR4 機能を抑制することを勘案すると、脳動脈瘤を抱えた患者の周術期管理などにプロポフォールが有効である可能性へとつながる。

- 1) Zhou CH et al. Anesth Analg. 2015;120(6):1361-8.
- 2) Hashimoto T et al. Neurol Res. 2006;28(4):372-80.
- 3) Akira S et al. Nat Rev Immunol. 2004;4(7):499-511.
- 4) Kanematsu Y et al. Stroke. 2011;42(1):173-8.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	石山 忠彦  (ISHIYAMA Tadahiko)  (90293448)	山梨大学・大学院総合研究部・准教授    (13501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関