

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16591

研究課題名(和文) 虚血脳のくも膜変性における慢性炎症の解析 新規治療の開発にむけて

研究課題名(英文) Aging-associated inflammation and fibrosis in arachnoid membrane.

研究代表者

鈴木 比女 (SUZUKI, HIME)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：30815452

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：慢性炎症を背景とする動脈硬化などの種々の要因が及ぼす慢性脳虚血状態によって生じたくも膜の組織変性を病理学的な観点から解析した。検体は病理解析が可能であったのは74例であった。病理スライド上で厚さと線維芽細胞数、CD68陽性細胞数、CD86陽性細胞数、CD206陽性細胞数の平均値を測定した。くも膜肥厚群では各種サイトカインの発現増幅も認められた。くも膜の肥厚はくも膜の線維芽細胞や炎症細胞から分泌された各種サイトカインの影響によると考えられ、加齢が最も影響すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

国内人口の高齢化が進み、動脈硬化症による脳血管障害性疾患は増加傾向にある。その背景には糖尿病や高血圧、血管壁の粥腫形成など近年慢性炎症と関連すると報告されている疾患が多くみつけられる。今回の研究では加齢に伴う動脈硬化などが背景となつて、慢性炎症がくも膜の肥厚を引き起こしたと考えられた。慢性炎症、慢性虚血性変化を起こしている脳では認知機能低下がみられることから、これらの慢性炎症をベースとした生活習慣病の是正は今後の被介護人口の増加を抑制すべく重要な事項であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The physiological and pathological significance of the arachnoid membrane (AM) is still unknown. In this study, we investigated various characteristics of the AM, focusing on the influence of inflammation and fibrosis. Small pieces of AM sample were obtained during neurosurgical procedures from 74 cases. The clinical and pathological characteristics of the hyperplastic AM group and the non-hyperplastic AM group were compared. Then, potential correlations between AM thickness and clinical characteristics were analyzed. Moreover, VEGF, TGF β , and TGF α levels were quantitated by real time PCR. The AM hyperplasia was influenced by aging and could be a result of inflammation and fibrosis through cytokine secretion from the inflammatory cells and fibroblasts in the AM.

研究分野：脳血管障害

キーワード：くも膜 慢性炎症 慢性脳虚血 動脈硬化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の疫学研究から全身の慢性炎症が心血管系イベントの発症や再発に影響することがわかってきた。炎症マーカーであるCRP、IL-1、IL-6、TNF- α の上昇が脳梗塞再発の危険因子であるということも示されている。炎症マーカーやサイトカインの上昇が動脈硬化や血栓形成を促進し、脳梗塞の再発に影響を及ぼしていると考えられている。脳梗塞急性期においてもこれらのサイトカインの上昇が確認されており、脳梗塞発症や発症後の炎症にも関与していることが推測されている。一方で、クモ膜は硬膜とクモ膜下腔における脳脊髄液循環との間の形態学的・生理学的なバリア機能を果たしており、脳脊髄液を介して脳や脳血管と接する唯一の構造である。しかしながら、これらの脳表血管に接するクモ膜の炎症については未だ検討がなされていない。クモ膜の組織構造変化を評価することにより、慢性脳虚血の活動性を評価することができるのではと考えた。

2. 研究の目的

本研究では慢性脳虚血性疾患のクモ膜と脳脊髄液からその形態学的及び病理学的変化を検討する。それによって、虚血性脳血管障害の脳における慢性炎症と変性の活動性を定量化し、臨床的予後との関係を解明することで、脳卒中再発リスク評価に寄与しうると考える。また、クモ膜や髄腔内の慢性炎症をコントロールする新規治療法への可能性を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

病理学的検討及び炎症マーカーの定量を行う。

慢性脳虚血性疾患に対する開頭血行再建術で得られたクモ膜と脳脊髄液を使用した。対象群として開頭による非虚血性疾患(未破裂脳動脈瘤クリッピング術や機能性疾患)で得られた前頭葉皮質血管(M4)直上のクモ膜を使用した。クモ膜の検体について、H-E染色でクモ膜の厚さや炎症細胞浸潤の有無と炎症の時期や程度、線維化の程度や局在などの形態学的変化を評価する。免疫染色によるIL-1, TNF, IL-6などの炎症マーカーの評価を行った。第一に、対照群とのクモ膜の形態学的相違点の有無、クモ膜と脳脊髄液中の炎症性マーカー出現の有無について比較検討を行った。第二に、慢性虚血性疾患において、臨床症状や放射線学的画像所見と病理学的所見の相関性について比較評価を行う。また、慢性虚血性疾患のなかでも病態の違い(もやもや病及び非もやもや病)における病理学的所見の違いを比較検討した。

4. 研究成果

(1)患者背景

本研究では2017年~2019年に開頭術を施行しクモ膜を採取し得た98症例のうち、病理組織解析が可能であった74症例で検討を行った。またそのうちmRNAが可能であったのは58例であった。症例の疾患分類については脳血管障害44例、脳腫瘍21例、その他が9例であった。脳血管障害44例のうち未破裂脳動脈瘤14例、もやもや病13例、動脈硬化性血管狭窄/閉塞10例、脳出血4例、AVM3例であった。母集団の年齢は中央値54歳であり、31例が女性であった。くも膜採取部位は前頭葉29例、側頭葉35例、頭頂葉3例、後頭葉4例、小脳3例であった。動脈硬化指数であるASCVD scoreと吹田スコアの中央値はそれぞれ6.0, 41.0であった。

(2)くも膜の病理学的特徴

まずH-E染色で線維芽細胞や線維、くも膜の層構造を確認した。線維芽細胞はくも膜の軟膜側に局在する傾向があり、硬膜側へ向かうにつれ線維が目立つようになった。免疫染色でマクロファージのマーカーであるCD68⁺、CD86⁺、CD206⁺染色を施行した。CD68⁺陽性細胞は線維芽細胞と同様に軟膜側に偏向する傾向があった。くも膜の厚さは中央値49.62 μ mであった。

くも膜の厚さを50 μ m以上で過形成として2グループに分類した結果、過形成グループでは37例、年齢中央値59.0歳、非過形成グループでは37例、年齢中央値47.0歳となった。臨床および病理学的特徴で両グループを比較すると、過形成グループはより高齢であることで統計学的有意差が認められた。(p=0.004)また、線維芽細胞数(p=0.004)、CD68⁺細胞数(p=0.023)、CD86⁺細胞数(p=0.005)、CD206⁺細胞数(p=0.020)で過形成グループのほうにより多くみられた。これらの結果から、加齢に伴い線維過形成と慢性炎症はくも膜過形成に関与していることが示唆された。

炎症性・抗炎症性サイトカインの測定

rt-PCR法を用いて、くも膜におけるTNF, TGF, and VEGFの測定を行い、その発現量とく

も膜肥厚について検討した。PCR 施行に耐えうる検体量が確保できたのは 58 例であり、くも膜過形成グループで 28 例、非過形成グループで 30 例であった。線維芽細胞およびマクロファージから放出され組織修復に関与する VEGF は過形成グループでより多くみられた。(p= 0.043)炎症性サイトカインである TNF , TGF は両グループで統計学的有意差はみられなかった。(各々 p= 0.936, 0.445)また、VEGF は TNF , TGF とそれぞれ相関関係がみられた。

(3)考察

上記結果から、くも膜の過形成は線維芽細胞の増加とマクロファージの浸潤が影響していることが示唆された。マクロファージは炎症を促進し炎症性サイトカインを放出する M1 と抗炎症作用面で出現し抗炎症性サイトカインを放出する M2 に分類されるが、これら M1 と M2 マクロファージはその組織の炎症・修復過程によって出現する割合が異なる。例えば動脈硬化性プラーク内部では M1 マクロファージの出現が多い。本研究では M2 マクロファージのマーカーである CD206⁺ 細胞の割合のほうが多く、線維化を促進しくも膜の過形成に影響していることが考えられた。また、くも膜においてこれらのマクロファージの浸潤や線維芽細胞の出現は軟膜側、に偏向する傾向があり、脳表血管や脳側からの炎症の波及が考えられた。また、VEGF はくも膜の肥厚に関係することが導かれたが、VEGF は線維芽細胞や炎症性細胞から産出され、特にもやもや病では VEGF の高発現が TGF 発現と相関することが示唆されえおり、これらのサイトカインと異常血管の過形成は関連があるとの報告がある。他臓器でも過度の組織線維化は組織障害の最終段階としてみられ、脳においても動脈硬化などの慢性炎症によって産出された炎症性サイトカインが脳脊髄液を經由しくも膜へも波及した可能性が考えられた。

(4)結論

慢性炎症を背景とする動脈硬化などの種々の要因が及ぼす慢性脳虚血状態によって生じたくも膜の組織変性を病理学的な観点から解析した。くも膜肥厚群は加齢の影響をうけており、また各種サイトカインの発現増幅も認められた。今回の研究では母集団の疾患が多彩であり疾患による評価を行うには症例数が不足していたが、例えばもやもや病といった比較的若年で発症する脳血管障害の症例では統計学的有意差はなかったもののくも膜の肥厚傾向がみられた。症例数を重ねていくことで、くも膜の肥厚の程度を調査することによって、その背景にある脳の状態や脳脊髄液灌流環境などを推測することが可能になると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Suzuki Hime, Mikami Takeshi, Iwahara Naotoshi, Akiyama Yukinori, Wanibuchi Masahiko, Komatsu Katsuya, Yokoyama Rintaro, Hirano Tsukasa, Hosoda Ryusuke, Horio Yoshiyuki, Kuno Atsushi, Mikuni Nobuhiro	4. 巻 21
2. 論文標題 Aging-associated inflammation and fibrosis in arachnoid membrane	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Neurology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12883-021-02202-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木比女
2. 発表標題 くも膜の線維化亢進と慢性炎症に影響する要因
3. 学会等名 第44回日本脳卒中学会学術集会
4. 発表年 2018年～2019年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------