

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591686

研究課題名(和文) 脳動脈瘤形成におけるタイトジャンクション蛋白の関与について

研究課題名(英文) Reduction of endothelial tight junction proteins on experimental cerebral aneurysm in rats

研究代表者

西京子 (NISHI KYOKO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・講師

研究者番号：60335817

研究成果の概要(和文)：

実験脳動脈瘤モデルにおいて、動脈と動脈瘤壁の機能維持および不安定化に関わる分子について明らかにするため、電子顕微鏡による内皮細胞形態と動脈瘤の大きさを確認した(J Neurosurg. 2005 Mar;102(3):532-5.)。動脈瘤の増大につれマクロファージの浸潤が増加し、occludin および ZO-1 の減少が著しいことが判明した。Occludin および ZO-1 は蛋白分解系により制御されていることを明らかにした。さらにこれらの Degradation に関与する蛋白は高血圧とエストロゲン欠乏状態で血管壁に増加すること、またこの上昇に angiotensinII が一部関与することも明らかにした。これらの結果からタイトジャンクション蛋白の安定化が動脈瘤形成抑制に重要と考えられた。成果をまとめ J Hypertension に投稿し、受理された。

研究成果の概要(英文)：

The formation of cerebral aneurysms is associated with endothelial damage and macrophage migration. Hypothesizing that the opening of tight junctions (TJs) due to the disappearance of the TJ proteins occludin and zona occludens-1 (ZO-1) in damaged endothelia facilitates macrophage migration, leading to cerebral aneurysm formation, we investigated the role of TJ proteins. To induce cerebral aneurysms, we used female rats subjected to hypertension (HT), oophorectomy (OVX), and hemodynamic stress and evaluated the vascular wall morphologically, immunohistochemically, and by quantitative RT-PCR. We also assessed the regulation of TJ proteins in human brain endothelial cells (HBECs). In the very early stage before aneurysm formation, the expression of occludin and ZO-1 was reduced in injured endothelial cell junctions exhibiting gaps. In the course of aneurysmal progression their reduction progressed and was correlated with macrophage migration. In HT+OVX rats we observed an increase in angiotensin II and the degradation molecules matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate oxidases, and monocyte chemoattractant protein-1. The mineralocorticoid receptor blocker eplerenone increased occludin and ZO-1 expression; this was associated with a reduction in angiotensin II and the degradation molecules and resulted in the inhibition of macrophage exudation and aneurysm formation. In HBECs, occludin and ZO-1 down-regulation by angiotensin II and estrogen deficiency was reversed by eplerenone, the MMP inhibitor SB3CT, and apocynin. Our results suggest that macrophage migration is associated with the reduction in TJ proteins induced by the degradation molecules.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	200,000	60,000	260,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：脳動脈瘤、タイトジャンクション蛋白、mineral corticoid receptor、phosphodiesterase、血管内皮障害、angiotensin II、エストロゲン、炎症、ラット

### 1. 研究開始当初の背景

脳動脈瘤が一度形成されると、破裂予防のために確立された治療は現在のところ血管内コイル塞栓術と開頭手術のみしかない。よって動脈瘤の発生予防または発生した動脈瘤増大の予防（サイズ依存性に破裂率が増すため）に有効な治療法を確立することが重要である。我々は中高年の女性に脳動脈瘤が多いことに着目し、雌ラットを用いて腎動脈結紮・生理食塩水経口投与（高血圧誘発）と一側頸動脈結紮（血流ストレス誘発）施行後に両側卵巣を摘出し、estrogen 欠乏状態で脳動脈瘤を発生させる新しい動物モデルを開発した（J Neurosurg. 2005;103:1046-51.）。また、この動物モデルにおいて脳動脈瘤形成初期に血管内皮が障害されていることを形態学的に示した。さらに 17 $\beta$ -estradiol によるホルモン補充療法をおこない動脈瘤形成が抑制されることも確認し、動脈瘤形成における estrogen の関与を示した（J Neurosurg. 2005, 103: 1052-7）。

### 2. 研究の目的

これまでの研究で、脳動脈瘤形成早期から病巣部位では血管内皮細胞の異常が観察されており、本研究では血管内皮細胞異常をきたす要因として細胞間接着に関与するタイトジャンクション蛋白に着目した。血管内皮に各種の刺激が加わることにより血管内皮細胞表面のタイトジャンクション蛋白が減少することにより細胞間隙が拡大し、これによって血管壁内への白血球などの細胞浸潤が生じ、血管壁の退行性変化から動脈瘤形成にいたると仮定し、タイトジャンクション蛋白発現変化やその分子学的機構について検討する。

ヒト脳動脈瘤壁を解析した結果、炎症性細胞の発現や炎症性変化が認められている。また破裂あるいは未破裂動脈瘤を解析し、動脈瘤壁内の T リンパ球やマクロファージの存在を示し、これらの浸潤が平滑筋やコラーゲン繊維の傷害や減少と関係があるとされている。我々もラット脳動脈瘤モデルで炎症性細胞の発現や炎症性変化を示した（J Neurosurg. 2007, 107:405-11）。脳動脈瘤は血管分岐部に発生する。この部位において血管内皮の間隙が拡大し、この間隙よりマクロファージが浸潤する可能性がある。この場合タイトジャンクション蛋白の発現低下がその誘因になると推察される。Kang らの報告では、卵巣摘

出を行ったマウス脳組織において、タイトジャンクション蛋白である occludin の mRNA、蛋白発現の低下がみられているが、これまで脳動脈瘤の発生過程においてその他のタイトジャンクション蛋白や遺伝子発現の変化について調べた研究はみられない。脳動脈瘤形成初期の occludin, ZO-1、および VE-cadherin, claudin などの発現変化について、脳動脈瘤誘発を行ったラット脳血管を用いて調べる。さらにこれらの蛋白発現変化と estrogen や estrogen receptors の機能との関連性について解析する。またヒト脳動脈瘤標本を用いて同様にタイトジャンクション蛋白発現の有無を評価する。

### 3. 研究の方法

1. 動脈と動脈瘤壁の機能維持・不安定性に関わる分子機構の解明

脳動脈瘤ラットモデルにおいて、動脈と動脈瘤壁の機能維持および不安定化に関わる分子としてタイトジャンクション蛋白関連分子に着目して解析する。

1) ラット脳動脈瘤モデルの作製

7 週齢雌性 SD ラットに吸入麻酔下で両側の後腎動脈と右総頸動脈を結紮する。その後、生理食塩水を投与し、1 ヶ月後に高血圧が誘発されたことを確認後、麻酔下で両側卵巣を摘出し、estrogen 欠損状態とした。

2) 両側卵巣を摘出後 2~24 週後に脳血管を摘出する。電子顕微鏡による血管内皮形態と脳動脈瘤形成との関係を解析する。凍結切片を作成し、HE 染色、Elastica van Gieson 染色、また免疫組織染色にてタイトジャンクション蛋白 (occluding, Zo-1, claudin, VE-cadherin 等) の発現分布を観察した。

3) 卵巣摘出より 12 週後に脳血管を摘出し、定量 RT-PCR にてこれら蛋白の mRNA を測定する。これによりタイトジャンクション蛋白の推移と脳動脈瘤形成の関連性を解析した。

a) ♀ sham: 10 匹

b) ♀ hypertension (HT) : 10 匹

c) ♀ oophorectomy (OVX) : 10 匹

d) ♀ HT + OVX : 10 匹

以上の群で比較、検討した。

2. 脳動脈瘤誘発後の経時的変化について

われわれの脳動脈瘤モデルでは、卵巣摘出後早期において血管内皮傷害が生じ、増大していくと推察される。また、長期に飼育したラットでは脳動脈瘤破裂によるくも膜下出血

を経験している。卵巣摘出後、3 週間、6 週間、3 ヶ月、6 ヶ月後に corrosion cast を作製し、各期間での脳動脈瘤発生、増大の過程を検討した。

### 3. 薬物治療による脳動脈瘤形態変化の解析

#### a) ラット脳動脈瘤モデルの作製

上記と同様な方法でラットに脳動脈瘤を誘発した。

#### b) 薬物投与実験 (Statin)

高脂血症治療薬である statin には

pleiotropic 作用が報告されている。血管内皮保護作用、抗酸化作用、抗炎症作用、matrix metalloproteinases (MMP) の抑制作用などを有する。これらの作用は脳動脈瘤形成、増大を抑制する可能性がある。われわれの脳動脈瘤モデルに statin を投与し、脳動脈瘤形成を抑制するか検討する。さらにタイトジャンクション蛋白と statin 投与の相関関係についても実験した。

### 4. 研究成果

脳動脈瘤壁における ccludin および ZO-1 の減少に関与する分子機構を調べた。ccludin および ZO-1 の遺伝子レベルでの変化はみられなかったが、タイトジャンクション蛋白の Degradation に関与すると考えられる MCP-1, MMP-9 および NOX4 の増加がみられ、ccludin および ZO-1 は転写レベルではなく、蛋白分解系により制御されていることを明らかにした。さらにこれらの Degradation に関与する蛋白は高血圧とエストロゲン欠乏状態で血管壁に増加すること、またこの上昇に angiotensinII が一部関与することも明らかにした。また mineral corticoid receptor 阻害剤を投与すると Degradation 関連分子の低下がみられ、マクロファージの血管壁内への浸潤が低下し、動脈瘤の形成が抑制された。これらの結果からタイトジャンクション蛋白の安定化が動脈瘤形成抑制に重要と考えられた。これらの結果をまとめて現在 J Hypertension に投稿し、revision の審査を受けている。

### 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 5 件) 関連英文誌のみ

1. Tada Y, Kitazato KT, Yagi K, Shimada K, Matsushita N, Kinouchi T, Kanematsu Y, Satomi J, Kageji T, Nagahiro S, Statins Promote the Growth of Experimentally-induced Cerebral Aneurysms in Estrogen-Deficient Rats, Stroke 2011 in press
2. Tada Y, Yagi K, Kitazato KT, Tamura T,

Kinouchi T, Shimada K, Matsushita N, Nakajima N, Satomi J, Kageji T, Nagahiro S. Reduction of endothelial tight junction proteins is related to cerebral aneurysm formation in rats. J Hypertens. 2010; 28: 1883-91.

3. Yagi K, Tada Y, Kitazato KT, Tamura T, Satomi J, Nagahiro S. Ibudilast inhibits cerebral aneurysms by down-regulating inflammation-related molecules in the vascular wall of rats. Neurosurgery. 2010; 66: 551-9
4. Tada Y, Kitazato KT, Tamura T, Yagi K, Shimada K, Kinouchi T, Satomi J, Nagahiro S. Role of mineralocorticoid receptor on experimental cerebral aneurysms in rats. Hypertension. 2009; 54: 552-7;
5. Tamura T, Jamous MA, Kitazato KT, Yagi K, Tada Y, Uno M, Nagahiro S. Endothelial damage due to impaired nitric oxide bioavailability triggers cerebral aneurysm formation in female rats. J Hypertens. 2009; 27: 1284-92.

[学会発表] (計 8 件) 関連国際学会のみ

- 1 Yagi K, Kitazato KT, Tada Y, Tamura T, Matsuzaki K, Satomi J, Nagahiro S. Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase 4-Related Vascular Inflammation Contributes to the Progression of Cerebral Aneurysms, 2009.8.30-9.4, XIV world Congress of Neurological Surgery, Boston, USA
- 2 Tada Y, Kitazato KT, Tamura T, Yagi K, Shimada K, Kinouchi T, Matsushita N, Satomi J, Nagahiro S. Eplerenone suppresses the progression of experimentally-induced cerebral aneurysms in rats, 2009.8.30-9.4, XIV world Congress of Neurological Surgery, Boston, USA
- 3 Tada Y, Kitazato KT, Tamura T, Yagi K, Shimada K, Kinouchi T, Satomi J, Nagahiro S. Role of mineral corticoid receptor on experimental cerebral aneurysms in rats 2009, The 6th International Intracranial Stent meeting 2009.8.5-7, Sendai, Japan
- 4 Nagahiro S, Tamura T, Yagi K, Tada Y, Jamous MA, Uno M, Nakajima N, Matsubara S, Kitazato KT, What should we do to prevent cerebral aneurysm formation and progression 2008.9.24-27, 6th World Stroke Congress, Vienna, Austria

- 5 Yagi K, Kitazato KT, Tada Y, Tamura T, Nakajima N, Matsubara S, Nagahiro S.  
Leucocyte adhesion molecules contribute to the development of cerebral aneurysms in rats 2008.9.24-27, 6th World Stroke Congress, Vienna, Austria
- 6 Tada Y, Kitazato KT, Tamura T, Yagi K, Shimada K, Kinouchi T, Satomi J, Nagahiro S. Role of mineral corticoid receptor on experimental cerebral aneurysms in rats 2008.9.24-27, 6th World Stroke Congress, Vienna, Austria

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 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 0 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

西 京子 (NISHI KYOKO)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・講師  
研究者番号：60332817  
(H20 研究分担者→H21 研究代表者)

中 嶋 教 夫 (NAKAJIMA NORIO)  
徳島大学・病院・助教  
研究者番号：00332817  
(H20 研究代表者)

### (2) 研究分担者

永廣信治 (NAGAIHIRO SHINJI)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・教授  
研究者番号：60145315

兼松康久 (KANEMATSU YASUHISA)  
徳島大学・病院・助教  
研究者番号：90363142

宇野昌明 (UNO MASAOKI)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・准教授  
研究者番号：90232884

松原俊二 (MATSUBARA SHUNJI)  
徳島大学・病院・講師  
研究者番号：60294675

八木謙次 (YAGI KENJI)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・助教  
研究者番号：80551837

多田恵曜 (TADA YOSHITERU)  
徳島大学・病院・助教  
研究者番号：30547964

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：