#### 研究成果報告書 科学研究費助成事業

今和 5 年 5 月 1 7 日現在

機関番号: 84404

研究種目: 基盤研究(C)(一般)

研究期間: 2020~2022 課題番号: 20K09381

研究課題名(和文)脳動脈瘤破裂予防を目指した創薬標的の同定

研究課題名(英文)Identification of therapeutic targets to prevent rupture of intracranial aneurysm.

#### 研究代表者

青木 友浩(AOKI, TOMOHIRO)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号:40633144

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文): くも膜下出血発症の原因疾患の脳動脈瘤を対象として、新規の創薬標的因子の同定を目指すトランスレーショナル研究を実施した。本研究では、網羅的遺伝子発現解析等により創薬標的3種類を同定した。その後、当該遺伝子欠損ラット系統の樹立及び使用や特異的阻害薬を使用した検討を実施し、2種の因子につき新規の病態制御因子であることを明らかとした。並行し、病変の増大や破裂の過程で形成される慢性炎症の微小環境構築の変容の検討を進めた。結果、病変増大の際に集積する特異的マクロファージ分画の同定と、病変と対しても 構を明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義本研究の成果は、脳動脈瘤という疾患を対象としつつも、多くの疾患に共通の病態制御基盤である慢性炎症局面の形成機構やその変容を制御する分子機構の一端を明らかとしたものである。その点で、生物学医学研究としての学術的意義を有する。また、取り扱う脳動脈瘤は破裂によりくも膜下出血を発症させる。くも膜下出血が、死亡率も後遺症率も高い疾患であるために、その主要な原因疾患である脳動脈瘤の増大やそれに引き続く破裂を制御誘導する機構を明らかとすることは、新規治療法の開発に資する。その点で、アンメットメディカルニースの 克服に直結するために社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文): In the present study, we have picked up three candidates which may be involved in the pathogenesis of intracranial aneurysms, a major cause of subarachnoid hemorrhage, through previously acquired comprehensive gene expression profile data. We have then established the rat line deficient in each gene and subjected animals to the model of intracranial aneurysms. Also, the drug specifically inhibits the activity of identified target is applied to models and the effect of each drug have been examined. We have then successfully identified two factors as a novel one regulating the pathogenesis. In addition, we have identified the unique macrophage subtypes exclusively present in the growing lesions. We have also clarified some but crucial mechanisms underlying the rupture of the lesions; the induction of neovessels and the infiltration of neutrophils across them.

研究分野:薬理学

キーワード: 脳動脈瘤 慢性炎症

#### 1.研究開始当初の背景

くも膜下出血は医療技術が発達した現在でもなお献身的な医療介入にもかかわらず高率な死 亡率と後遺症率を有する重篤な疾患である。さらに、くも膜下出血はしばしば生産年齢層にも発 症し突然死となる事もまれではないために社会的損失も大きい。くも膜下出血の主な原因であ る脳動脈瘤は、剖検での検討から一般人口の数%に認められ比較的罹患頻度は高いのみならず、 日本人の脳動脈瘤の破裂率は本邦の大規模観察研究(UCAS Japan)のデータから年間約1%で あり、欧米に比べて数倍高く実際に人口当たりのくも膜下出血の発症率も欧米諸外国の2~3 倍高い。近年、診断機器の普及と性能向上や脳ドックの普及等により未破裂脳動脈瘤症例が急増 しており、特に MRI が普及し国民皆保険の恩恵をうける本邦では他国と比べても症例数が急増 している。一方で現時点での未破裂脳動脈瘤の治療選択は、侵襲を伴う外科的治療(脳動脈瘤ク リッピング術や血管内手術によるコイル塞栓術)のみである。ここでさらに問題であるのは、外 科治療適応症例以外において薬物治療法が存在しないために破裂危険因子への対応(禁煙等)以 外は経過観察という名目での無治療である事である。このために、くも膜下出血が芸能人におけ る若年での突然死として報道される事などにより未破裂脳動脈瘤は潜在的な破裂の危険性を自 覚させ、結果として未破裂脳動脈瘤を治療せず有していることによる不安による社会活動の抑 制が生じる。その点でも社会的な損失は大きい。よって脳動脈瘤の新規の創薬標的の同定と新規 創薬が社会的急務である。

我々は脳動脈瘤が脳血管壁の慢性炎症性疾患であるという今日の疾患概念の確立に中心的な役割を果たしてきた。その中で、炎症反応ないしはその慢性化の制御因子として NF-□B やプロスタグランジン受容体 EP2 などを同定してきた。そして、これらの因子の脳動脈瘤治療薬の創薬標的としての可能性をモデル動物を使用した一連の検討で明らかとしてきた。また、ヒトにおいて抗炎症作用を有するスタチン製剤の脳動脈瘤破裂予防効果を検証する観察研究等を遂行し、同薬剤の脳動脈瘤破裂抑制効果の可能性を報告した。しかしながら、スタチン製剤は健常人でも血中 LDL を正常下限以下まで低下させることから低 LDL 血症の長期安全性が確立されていない以上は、脂質異常症を有する 1/4 程度の症例以外では適応とならない。また、

は健常人でも血中 LDL を正常下限以下まで低下させることから低 LDL 血症の長期安全性が確立されていない以上は、脂質異常症を有する 1/4 程度の症例以外では適応とならない。また、NSAIDs については抗血小板作用により出血を悪化させる懸念もある。すなわち、未だ脳動脈瘤治療薬の開発は達成されていないし、効果が高く安全性も高い創薬標的の同定も不十分である。また、現在まで病態の形成進展を担う因子については専ら炎症関連のものが解析されてきたが、これらは決して網羅的な手法による検討の結果明らかとされたものではない。そのために、炎症以外でも有望な創薬標的となり得るものが存在する可能性も否定できない。よって、本研究計画を立案した。

#### 2.研究の目的

本研究計画は、すでに取得済みの網羅的遺伝子発現解析によるヒト未破裂脳動脈瘤病変ないしはラットの破裂率の高い脳動脈瘤病変において正常血管と比較し発現が変容する遺伝子群のリストを使用し、1)新規の脳動脈瘤病態制御因子の候補のピックアップ、そして2)モデル動物を使用し正常血管と比較しつつ病変部での発現状況の検証、3)候補因子に対する特異的薬物ないし遺伝子改変により脳動脈瘤病態を修飾可能かの検討と、4)ヒト脳動脈瘤標本を使用した検証、5)既存薬が使用可能であれば観察研究による当該薬物のくも膜下出血抑制効果の検証、により新規の脳動脈瘤の創薬標的因子の同定を目的とする。

#### 3.研究の方法

本研究計画では、脳動脈瘤病変で正常血管と比較して発現が有意に変動する遺伝子群の情報から破裂予防のための創薬標的候補因子を抽出し、その病態形成への寄与を特異的薬物の使用や遺伝子組み換え動物の樹立を併用しつつモデル動物で検証すると共に、臨床へその結果を外挿するためにヒト脳動脈瘤手術標本を使用して対象とする因子の発現状況を検証する。

#### 網羅的遺伝子発現解析結果からの創薬標的候補因子の抽出

解析を進める創薬標的候補因子として以下の要件に合致するものを網羅的遺伝子発現解析のデータを参考に抽出する。具体的には、脳動脈瘤病変で発現が有意に亢進する遺伝子群の中から、1)正常血管と病変での発現の差異が大きいもの、2)解析した病変で普遍的に発現が亢進しているもの、3)創薬標的となりやすい受容体や酵素、4)生理的機能を担い副作用が大きいと推測される因子以外、5)他疾患含め過去の開発で中断しているもの以外、といった観点で候補を複数選択する。

# 脳動脈瘤モデル動物を使用した創薬標的候補因子の病態への寄与の検討

本研究計画では、脳動脈瘤病態を発生から破裂に至るまで検証を行えるモデル動物を使用する。本モデル動物では発生率ほぼ100%で嗅動脈 前大脳動脈に脳動脈瘤を誘発するとともに前ないし後交通動脈に発生率は低い(50%)が過半数に破裂する瘤が誘発される。よって、

本モデルでは発生から増大の過程を前者で、破裂に至る過程を後者で検証ができる。すなわち、脳動脈瘤の発生から破裂までの病態の全過程を検討可能なモデル動物である。

前項で抽出した候補因子につき、上記のラット脳動脈瘤モデルから準備した標本を使用し病期ごとの発現状況とその発現細胞を検討する。そして、副作用回避の観点から動脈瘤病変部に特異的に発現が誘導される因子を引き続き解析を行う因子として選択する。選択した因子につき、病態形成への寄与を確認するために特異的薬物(阻害薬や賦活薬)の投与、系統樹立を含め遺伝子改変ラットを使用した検討に進む。遺伝子改変ラットは購入可能なものが限定的なために、ゲノム編集技術(CRISPR/Cas9系)により遺伝子欠損ラットの樹立を行う。そして、各化合物や遺伝子改変の効果は誘発される脳動脈瘤のサイズ・破裂率や病理組織標本での炎症関連因子の発現状況等で評価される。この段階で脳動脈瘤がマクロファージ依存的な慢性炎症性疾患であることが我々の検討を中心に疾患概念として確立しつつあるが、はたしてどのような機能を持ったマクロファージが存在するかは不明である。そのため、レーザーマイクロダイセクション法と単細胞 RNA シーケンス解析を組み合わせてレパトア解析を行う。さらにそれらに対して標的因子の欠損や阻害がどのような影響を与えるかも検討する。細胞実験では、それぞれの化合物や遺伝子改変の結果生じる現象、例えば炎症因子の誘導抑制など、につき検討を行い、検討した化合物ないし遺伝子改変の作用機序を明確とする。本項目の一連の検討から、創薬標的候補因子を複数同定する。

## ヒト脳動脈瘤標本を使用した創薬標的候補因子の発現解析

前項の検討と並行し、ヒト由来手術摘出標本の準備を共同研究施設(旭川赤十字病院脳神経外科(瀧澤克己部長))において倫理委員会申請承認を含め行う。承認取得後、共同研究施設により外科的に摘出した脳動脈瘤標本とコントロール血管を国立循環器病研究センターに蓄積しそこで作製した薄切標本を使用して創薬標的候補因子の発現状況と発現細胞種を免疫組織化学にて検証する。そして、モデル動物の知見がヒトに外挿可能であるかを確認する。

### 4. 研究成果

脳動脈瘤病変部で発現変動する遺伝子群を同定した網羅的遺伝子発現解析の結果から創薬標的となり得る変動遺伝子を 3 種類同定した。そして、その各々の欠損ラット系統の樹立をCRISPR/Cas9 系にて実施した。その上で、それらラット系統を樹立済みの脳動脈瘤モデル動物に供することで、3種の内 2種において当該遺伝子の欠損により脳動脈瘤の発症を抑制可能であることを確認した。さらに、一種の標的については、特異的阻害薬による脳動脈瘤の発症予防効果を確認した。すなわち、同因子の、脳動脈瘤発症予防のための創薬標的としての妥当性を確認した。併せて、それぞれの因子に対してヒトの脳動脈瘤病変由来試料を使用した免疫組織化学により、ヒト病変部での発現を確認した。

並行し、脳動脈瘤の増大や破裂の過程で形成される慢性炎症の微小環境構築様式とその変容の検討を進めた。破裂過程で破裂部位特異的に誘導される新生血管の形成機構を解析し、低酸素と低酸素依存的な VEGF の産生誘導の寄与を示唆する所見を得た。

さらに、増大過程に注目し、ラットの頚部に新規に作成した血管分岐部に経時的に増大する動脈瘤病変を誘発するモデル動物を使用して、レーザーマイクロダイセクション併用単細胞 RNA シーケンス解析を実施した。その結果、増大部位に集積するマクロファージは神経支配を受け分化誘導される単一の集団を形成していることを示唆する所見を得た。

## 5 . 主な発表論文等

「雑誌論文〕 計6件(うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件)

| 〔雑誌論文〕 計6件(うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件)  |                      |
|---|----------------------|
| 1 . 著者名<br>Shimizu Kampei、Kataoka Hiroharu、Imai Hirohiko、Yamamoto Yuto、Yamada Tomohiro、Miyata<br>Haruka、Koseki Hirokazu、Abekura Yu、Oka Mieko、Kushamae Mika、Ono Isao、Miyamoto Susumu、<br>Nakamura Masanori、Aoki Tomohiro | 4 . 巻<br>80          |
| 2.論文標題<br>Hemodynamic Force as a Potential Regulator of Inflammation-Mediated Focal Growth of Saccular<br>Aneurysms in a Rat Model  | 5 . 発行年<br>2021年     |
| 3.雑誌名 Journal of Neuropathology & Experimental Neurology  | 6.最初と最後の頁<br>79~88   |
| 掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1093/jnen/nlaa131   | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著                 |
| 1 . 著者名<br>Shimizu Kampei、Imai Hirohiko、Kawashima Akitsugu、Okada Akihiro、Ono Isao、Miyamoto Susumu、<br>Kataoka Hiroharu、Aoki Tomohiro  | 4.巻<br>80            |
| 2.論文標題<br>Induction of CCN1 in Growing Saccular Aneurysms: A Potential Marker Predicting Unstable Lesions   |                      |
| 3.雑誌名 Journal of Neuropathology & amp; Experimental Neurology   | 6.最初と最後の頁<br>695~704 |
| 掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1093/jnen/nlab037   | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著                 |
| 1.著者名 青木友浩、栢原智道、小野功朗、岡田明大   | 4.巻<br>50            |
| 2.論文標題<br>脳動脈瘤を対象とした遺伝子解析と治療薬開発の現状  | 5 . 発行年<br>2022年     |
| 3.雑誌名<br>脳神経外科  | 6.最初と最後の頁<br>179-195 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし   | <br>査読の有無<br>無       |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著                 |
| 1.著者名 青木友浩  | 4.巻<br>80            |
| 2. 論文標題<br>脳動脈瘤モデル(橋本モデル)   | 5 . 発行年<br>2021年     |
| 3.雑誌名<br>疾患モデルの作製と利用 循環器疾患2021 下巻   | 6.最初と最後の頁<br>294-304 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし   | 査読の有無無               |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著                 |

| 1.著者名<br>青木友浩、小野功朗、栢原智道、岡田明大  | 4.巻<br>80            |
|---|----------------------|
| 2.論文標題  | 5 . 発行年              |
| 2 : 調又信題<br>  脳動脈瘤病態の分子機序に基づく新規の診断治療の可能性<br>  | 2022年                |
| 3. 雑誌名  | 6.最初と最後の頁            |
| 最新臨床脳卒中学第2版上  | 170-176              |
| 掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)   | 査読の有無                |
| なし<br>  | 無                    |
| オープンアクセス<br>  オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著                 |
|   |                      |
| 1 . 著者名<br>青木友浩、岡田明大、小野功朗、栢原智道  | 4.巻                  |
| 2.論文標題  | 5 . 発行年              |
| 脳動脈瘤発症増大の分子機序   | 2022年                |
| 3. 雑誌名<br>最新臨床脳卒中学第2版下  | 6.最初と最後の頁<br>693-698 |
| BXM IIIIIM III  | 033 030              |
| 掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)   | 査読の有無                |
| なし<br>  | 無                    |
| オープンアクセス<br>  オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著                 |
| [学会発表] 計7件(うち招待講演 4件/うち国際学会 0件)   | •                    |
| 1 . 発表者名  |                      |
| 青木友浩  |                      |
|   |                      |
| 2.発表標題<br>脳動脈瘤治療薬の探索  |                      |
| 10位到1月17日/ロ7京末 1271 本京  |                      |
|   |                      |
| 3.学会等名<br>第8回日本心血管脳卒中学会学術集会   |                      |
| 4.発表年   |                      |
| 2021年   |                      |
| 1.発表者名 青木友浩   |                      |
| 日小文店  |                      |
|   |                      |
| 2. 発表標題<br>Intracranial aneurysm as a hemodynamic force-mediated inflammatory disease |                      |
|   |                      |
| 2   |                      |
| 3.学会等名<br>第60回日本生体医工学会大会(招待講演)  |                      |

4 . 発表年 2021年

| 1.発表者名 宮田悠,九社前実香,安部倉友、清水寛平,岡美栄子,小野功朗、野崎和彦、青木友浩              |
|---|
| 2.発表標題<br>ラット脳動脈瘤のRNA sequencing網羅的遺伝子発現解析に基づく脳動脈瘤破裂制御機構の解明 |
| 3.学会等名第45回日本脳卒中学会学術集会                                       |
| 4 . 発表年 2020年   |
| 1.発表者名<br>青木友浩  |
| 2.発表標題<br>脳動脈瘤病態におけるメカノトランスダクション機構の役割                       |
| 3.学会等名 第61回日本脈管学会総会(招待講演)                                   |
| 4 . 発表年<br>2020年  |
| 1.発表者名<br>青木友浩  |
| 2 . 発表標題<br>アンメットメディカルニーズ克服に向けた脳動脈瘤に対する新規治療法の創製             |
| 3.学会等名<br>第79回日本脳神経外科学会学術総会(招待講演)                           |
| 4.発表年 2020年   |
| 1 . 発表者名<br>清水寛平、片岡大治、今井宏彦、山本悠斗、山田智裕、宮本享、中村匡徳、青木友浩          |
| 2 . 発表標題<br>炎症依存的な動脈瘤増大を制御する因子としての血行力学的負荷:ラット動脈瘤モデルにおける検証   |
| 3.学会等名<br>第79回日本脳神経外科学会学術総会                                 |
| 4 . 発表年 2020年   |
|   |

| 1.発表者名<br>青木友浩                        |                       |                  |
|---------------------------------------|-----------------------|------------------|
| 2 . 発表標題<br>脳動脈瘤の病態形成機構に基づく病理         | 学的所見の理解               |                  |
| 3 . 学会等名<br>第40回日本画像医学会(招待講演)         |                       |                  |
| 4.発表年 2021年                           |                       |                  |
| 〔図書〕 計2件                              |                       |                  |
| 1.著者名 青木友浩、清水寛平、山本希美子                 |                       | 4 . 発行年<br>2020年 |
| 2.出版社 羊土社                             |                       | 5.総ページ数<br>220   |
| 3.書名<br>疾患に挑むメカノバイオロジー                |                       |                  |
| 1 . 著者名<br>野崎和彦、宮田悠、青木友浩              |                       | 4 . 発行年<br>2020年 |
| 2. 出版社 三輪書店                           |                       | 5.総ページ数<br>46    |
| 3 . 書名<br>脳神経外科ジャーナル                  |                       |                  |
| (産業財産権)<br>(その他)                      |                       |                  |
| -                                     |                       |                  |
| 6 . 研究組織<br>氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考               |
| 7.科研費を使用して開催した国際研究類                   | <b>集会</b>             |                  |
| 〔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                    | <b>开究の実施状況</b>        |                  |

相手方研究機関

共同研究相手国