

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17933

研究課題名(和文)脳動脈瘤破裂におけるエフェロサイトーシスの役割解明

研究課題名(英文)Roles of efferocytosis in intracranial aneurysm rupture

研究代表者

宮本 健志(MIYAMOTO, Takeshi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・徳島大学専門研究員

研究者番号：80585000

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):遺伝子操作によるエフェロサイトーシス不全を起こしたマウス(ノックアウトマウス)では有意に脳動脈瘤破裂が増加することを明らかにした。また、ヒトの破裂及び未破裂脳動脈瘤壁においてもアポトーシス関連分子であるCleaved Caspase 3やTUNEL染色で染色される部位が認められ、ヒト脳動脈瘤壁においてアポトーシスが起きていることを証明できた。マクロファージと共染色を行い、アポトーシスを起こした細胞が貪食されていない部位も存在することを証明した。つまり、マウスおよびヒト脳動脈瘤においてエフェロサイトーシス不全があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳動脈瘤の有病率は3-5%である。脳動脈瘤の破裂はくも膜下出血をきたし、くも膜下出血患者のほとんどは後遺症を残すか死亡する。脳動脈瘤の破裂機序は未だに不明である。破裂機序を明らかにすることで、脳動脈瘤破裂を防ぐための薬物療法を開発することが可能となる。エフェロサイトーシスはアポトーシスを起こした細胞を貪食する機構である。エフェロサイトーシス不全が起こると、アポトーシスを起こした細胞は正常に貪食されず、炎症反応を増加させることが知られている。本研究では脳動脈においてエフェロサイトーシス不全が関係している可能性を示した。

研究成果の概要(英文):We revealed that genetically manipulated efferocytosis deficiency mice increased the rupture rate of intracranial aneurysms. In humans, we demonstrated Cleaved Caspase 3 and TUNEL-positive cells, which were apoptosis-related molecules, in ruptured and unruptured intracranial aneurysms. Immunohistochemical staining with macrophages showed some apoptotic cells were not phagocytosed by macrophages. Those results indicated that intracranial aneurysms in humans and mice had efferocytosis deficiency.

研究分野：脳動脈瘤

キーワード：アポトーシス エフェロサイトーシス 脳動脈瘤

1. 研究開始当初の背景

脳動脈瘤破裂によるくも膜下出血の発生率は世界的に 10 万人当たり 9.1 人であり、発症後 30 日以内の死亡率は 45%と非常に高い。くも膜下出血患者の 30%は自立生活が困難であり、社会および医療経済への影響は大きい。現在、未破裂脳動脈瘤に対する破裂予防は手術以外の方策は確立されておらず、新たに薬物治療が切望されている。脳動脈瘤破裂に関わる詳細な分子機構を明らかにすることで、薬物療法が確立出来る可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、(1)エフェロサイトーシス(アポトーシス細胞除去機構)に着目し、脳動脈瘤破裂との関連性を調べる。また、(2)エフェロサイトーシスの改善が脳動脈瘤破裂予防に寄与することを明らかにし、薬物による治療標的としての可能性を探求することである。

3. 研究の方法

脳動脈瘤の形成、増大、破裂には脳血管のリモデリング機構の異常や炎症が関与していることが示唆されているが、詳細な分子機構は明らかでない。血管壁のリモデリングは細胞の遊走、増殖、細胞死(アポトーシス)の結果と考えられる。

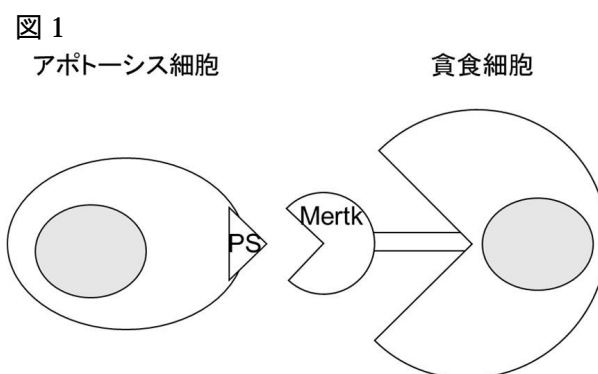
アポトーシスを起こした細胞は細胞質側に内在するホスファチジルセリン(PS)を細胞膜上に露出させる。この PS を貪食細胞が認識し、貪食される。これら一連のアポトーシス細胞の除去機構はエフェロサイトーシスと呼ばれる。アポトーシス細胞は、貪食細胞により除去され、炎症を誘導しないと考えられてきた。しかし、エフェロサイトーシス機構が低下すると、貪食されなかったアポトーシス細胞は二次的なネクローシスを起こし、炎症を誘導する。

貪食細胞側の受容体は PS を認識する MERTK 分子が主に担っている(図 1)。

MERTK は ADAM17 によって切断されることで、エフェロサイトーシス不全を起こす。また、正常細胞には CD47 が発現することで、貪食細胞からの認識を逃れている。このことから、CD47 は Don't eat me signal と呼ばれる。CD47

はアポトーシス細胞では発現が低下するため、貪食を妨げない。しかし、炎症下では CD47 が残存することで、正常なアポトーシス細胞の除去を阻害していることが明らかになってきた。つまり、異常な炎症下では MERTK の発現低下及び CD47 の残存が起こるため、エフェロサイトーシス不全を起こし、更に炎症を増悪させると予想される。

動脈硬化、悪性腫瘍、自己免疫疾患においてエフェロサイトーシス不全が報告されている。破裂脳動脈瘤ではアポトーシス細胞の増加が報告されているが、その病的意義やエフェロサイトーシス不全との関連は明らかでない。研究代表者は、エフェロサイトーシス不全が脳動脈瘤の形成および破裂に関与していると仮定し、本研究を計画した。



実験方法 破裂脳動脈瘤において、アポトーシス細胞および貪食細胞の動態を調べる。

実験 1. ヒト脳動脈瘤組織においてエフェロサイトーシス不全を同定する。手術で採取した脳動脈瘤組織切片を CD68(マクロファージ)と Cleaved Caspase 3(アポトーシス)で免疫染色し、遊離アポトーシス細胞(マクロファージに貪食されていないアポトーシス細胞)を計測する。破裂脳動脈瘤では遊離アポトーシス細胞が増加していることを同定し、破裂脳動脈瘤におけるエフェロサイトーシス不全を証明する。また、エフェロサイトーシス不全の原因として、破裂脳動脈瘤中の MERTK 分子の発現低下やアポトーシス細胞に CD47 発現が残存することを同定する。

実験 2. 薬物によるエフェロサイトーシスの阻害は脳動脈瘤破裂率を上昇させるか。

脳動脈瘤動物モデルに対して、アポトーシス細胞を貪食する受容体の阻害薬(MERTK 阻害薬)投与の有無で脳動脈瘤の破裂率を比較する。CD68 と Cleaved Caspase 3 で免疫染色し、脳血管壁における遊離アポトーシス細胞を比較する。RT-PCR で、脳血管壁の炎症関連分子の mRNA 発現を比較する。

実験 3. 遺伝子操作によるエフェロサイトーシスの阻害は脳動脈瘤破裂率を上昇させるか。

アポトーシス細胞を貪食する受容体を欠損したマウス(MERTK 欠損マウス)と野生型マウスを用いて、脳動脈瘤の破裂率を比較する。評価項目は実験 2 と同様である。

実験 4. 遺伝子操作によるエフェロサイトーシスの阻害機構の抑制は脳動脈瘤破裂率を低下させるか。

アポトーシス細胞を貪食する受容体が切断されないマウス(MERTK 切断耐性マウス)と野生型マウスを用いて、脳動脈瘤の破裂率を比較する。評価項目は実験 2 と同様である。

4 . 研究成果

実験 1 については部分的に証明できた。ヒト脳動脈瘤においてアポトーシス細胞の指標である Cleaved Caspase 3 で染色された細胞を認めたが、一部には CD68 と共染色されないアポトーシス細胞が存在した。つまり、ヒト脳動脈瘤において遊離アポトーシス細胞が存在することを証明できた。MERTK 分子の発現低下については証明できなかった。

実験 2 については MERTK 阻害薬を用いた実験系の確立が困難であり、中断せざるを得なかった。別の方法を用いた実験を計画中である。

実験 3 については遺伝子操作によるエフェロサイトーシス不全マウスは野生型と比較して脳動脈瘤破裂率が上昇していることを証明した。また、脳動脈瘤誘導後のエフェロサイトーシス不全マウスでは野生型と比較して炎症関連分子が上昇していた。

実験 4 については MERTK 切断耐性マウスの入手が困難であった。薬物学的にエフェロサイトーシスを促進する実験系を計画中である。

以上から、ヒト脳動脈瘤においてエフェロサイトーシス不全が存在することを証明した。また、脳動脈瘤を誘導した遺伝子操作によるエフェロサイトーシス不全マウスにおいても脳動脈瘤破裂率が上昇することを証明した。つまり、エフェロサイトーシス機構の低下は脳動脈瘤破裂に関わっていることを証明できた。

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 0件）

1. 著者名 Yamaguchi Tadashi, Miyamoto Takeshi, Shikata Eiji, Yamaguchi Izumi, Shimada Kenji, Yagi Kenji, Tada Yoshiteru, Korai Masaaki, Kitazato Keiko T., Kanematsu Yasuhisa, Takagi Yasushi	4. 巻 138
2. 論文標題 Activation of the NLRP3/IL-1 /MMP-9 pathway and intracranial aneurysm rupture associated with the depletion of ER and Sirt1 in oophorectomized rats	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 191 ~ 198
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3171/2022.4.JNS212945	査読の有無 有
オープンアクセス 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
---------------------------	-----------------------	----

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