

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 7 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390411

研究課題名（和文）脳動脈瘤発生増大破裂の機構解明と新規治療法の開発

研究課題名（英文）Mechanisms of cerebral aneurysmal occurrence, growth and rupture and development of new treatments

研究代表者

野崎 和彦（NOZAKI KAZUHIKO）

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：90252452

研究成果の概要（和文）：脳動脈瘤の発生、増大、破裂の機構を解明し、新たな治療法を開発することを目的とし、脳動脈瘤誘発動物モデルを用い、7T-MR 装置を用いた MRA 画像による追跡を行い、分子生物学的解析から得られた脳動脈瘤関連因子を抑制することで脳動脈瘤の発生、増大が制御できるかを検討した。これまでの報告と同様に、ラットにおいてスタチン製剤による脳動脈瘤形成に対する抑制効果、各種因子の発現抑制効果を確認し、また TNF- $\alpha$  抑制剤による新たな脳動脈瘤形成抑制効果を発見した。さらにサルにおける脳動脈瘤形成モデルを確立し、画像追跡を行っている。

研究成果の概要（英文）：In order to elucidate the mechanisms of cerebral aneurysmal development, growth, rupture, we conducted molecular and histological analyses in induced aneurysmal models of rats and monkeys. Induced aneurysms were successfully checked using 7T-MRA and the administration of statins, TNF- $\alpha$  inhibitors suppressed the development of cerebral aneurysms by inhibiting inflammatory processes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2010 年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2011 年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
年度			
年度			
総計	13,300,000	3,990,000	17,290,000

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、動物モデル、薬物治療、MR 画像、分子イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

くも膜下出血は、高率な死亡率と後遺症率を有する重篤な疾患である。また、生産年齢層に好発することから社会的損失も少なくない。しかし、脳動脈瘤が発生増大し破裂に至る分子機構は不明であり、現時点での未破裂脳動脈瘤の治療は、侵襲を伴う外科的な脳動脈瘤クリッピング術ないしは血管内手術によるコイル塞栓術のみであり、非外科的治

療の開発は皆無である。

## 2. 研究の目的

- ①我々が先に開発した脳動脈瘤モデル（マウス、ラット、サル、ラビット）を用い、脳動脈瘤発生増大破裂の分子機構を網羅的遺伝子発現解析、蛋白発現解析、生体における細胞分子イメージングを用いて明らかにする。
- ②解明された分子機構を用いた脳動脈瘤の

発生増大破裂に対する新たな治療法を確立するための準備データを構築する。

ラット脳動脈瘤モデルを用いた検討では、経口投与にてスタチン(simvastatin および pitavastatin) は脳動脈瘤サイズを有意に減少させ、中膜の菲薄化程度を改善し、機序として慢性炎症性変化の改善に伴う脳動脈瘤の増大抑制が示唆されている。ラットでの解析を継続するとともに、臨床へのステージアップの前段階として実験的サル未破裂脳動脈瘤モデルを用い、MRIにて確認された未破裂脳動脈瘤に対するスタチンの増大抑制・退縮・破裂予防に関する有効性を検証することを目的とし、ヒトに近いカニクイザルを使用した脳動脈瘤の形成実験を行う。その際のフォローアップの方法としての頸動脈穿刺法による脳血管撮影法は死亡例なども存在する。より低侵襲のMRAを用いてフォローすることによってカニクイザルの肉体的・精神的ストレスを減らせると考え、MRAを用いた実験を計画した。

### 3. 研究の方法

#### 概要

①脳動脈瘤動物モデル(ラット、マウス)を用いて証明してきた脳動脈瘤発生増大に関わる因子を、新たな脳動脈瘤モデル(ラビットまたはサル)において分子生物学的、組織学的に検証する。

②脳動脈瘤破裂モデルを確立したのち脳動脈瘤破裂に至る機構の解明を行い、破裂予測因子が同定された場合、MR画像追跡する。

③ラットモデルにおいて証明してきたstatin製剤による薬物治療の効果を大型動物(ラビット、サル)においてMR画像を含め検討し、臨床応用展開への基礎資料とする。

#### 手法

1) ラット脳動脈瘤破裂誘発モデルの開発とラビット・サル脳動脈瘤モデルの解析システムの確立

2) 脳動脈瘤形成から破裂に至る各段階での脳動脈瘤壁内の細胞群における遺伝子発現

3) 脳動脈瘤形成から破裂に至る各段階での脳動脈瘤壁におけるプロテオミクス解析

#### 解析の詳細

先に血行力学的ストレス誘発により開発したラット脳動脈瘤モデル(Hashimoto N et al Surg Neurol 10:3-8, 1978)を用いて、さらに血行力学的ストレスを加えないしは、炎症反応を惹起することにより破裂率を上昇させることを検討する。また、ラビット、サル脳動脈瘤誘発モデルはすでに確立している(Stroke 39:2085-2090, 2008, Hashimoto N et al J Neurosurg 67:903-905, 1987)が、サルにおいては経時的に組織学的検討を行うこと

は困難である。発生増大に関わる因子として、ラットモデルで重要性が証明されているマクロファージの浸潤につき画像化の可能性を検討する。ラット、白色ウサギ、カニクイザルを用いて脳動脈瘤モデルを作成し、脳動脈瘤発生増大の形態的变化の過程を、おもに7T-MRにて画像追跡するが、昨年度において行ったラット、サルにおけるMR撮像条件の設定の再確認とMR trackingの至適条件の確立を行い、さらに薬物効果を判定する。実験に使用する動物は雌のカニクイザル(Macaca fascicularis; 体重約3.0~3.5kg、年齢5歳前後)のものを使う。コントロール群、ピタバスタチン投与群(3.0mg/kg)それぞれでn=4匹/群とする。脳動脈瘤誘発処置として、まずは吸入麻酔下にて両側卵巣を摘出しエストロゲンなどの血管保護の働きを持つホルモンの影響を除く。後日落ち着いた後に、麻酔下に右腎動脈のmain trunkと左総頸動脈を結紮する。さらに1.0%の食塩水を飲水として与え、コラーゲンのクロスリンクを阻害して結合を緩くする働きを持つフマル酸βアミノプロピオニトリルを0.2%の濃度にて混餌投与する。誘発処置後3ヵ月毎にMRAにて脳動脈瘤が形成されていないかを観察する。MRAにて瘤の形成を確認した後、ピタバスタチンの投薬を開始し、その期間は8ヶ月とする。分子生物学的検討として、脳動脈瘤形成の各段階の脳動脈瘤壁から内皮細胞、中膜平滑筋細胞そしてマクロファージをおのおのlaser-microdissection法にて摘出し、各因子間の相関を解析ソフトにて検討し、脳動脈瘤壁で特に破裂に至る過程で変動する遺伝子群を同定し、解析を行う。

### 4. 研究成果

#### <脳動脈瘤動物モデル解析>

脳動脈瘤形成過程における各種因子を解析するために、5週令オスラット(72匹)を用い、フェントバルビタール50mg/kgの腹腔内投与による全身麻酔下に、左頸部総頸動脈を確保して、3-0ナイロン糸を用いて結紮施行し、両側腎動脈後枝を3-0ナイロン糸を用い結紮施行。3群に分け、3群すべてにおいて、8%塩化ナトリウムを含んだ混餌飼料を投与。4週間後、無作為に抽出したラットにおいて、7T-MRIを用いてMR angiographyを施行。右前大脳動脈-嗅動脈分岐部に嚢状動脈瘤の形成を確認した。

薬物投与実験として、atorvastatin(36匹)、TNF-α inhibitor(enanercept)(36匹)を行った。ともに3群(high dose group, low dose group, no group)とした。Enanerceptは1匹あたり1回投与量25μg、2.5μg、0μgを1週間おきに繰り返し皮下注射した。上記皮下注射は、脳動脈瘤導入手術終了後4週間経過してから開始した。皮下注射開始後8週

間後に、それぞれの薬剤効果を比較するために、以下のような検討を行った。

3群のラットの全数に付き、それぞれ3回ずつ、全身麻酔を用いないtail cuff methodを用いて血圧測定をおこなった。各個体3回の測定値の平均値にて3群間を比較するとそれぞれにおいて有意差は認めず、atorvastatin、enanerceptが血圧値には関与しない薬剤であることが確認された。血圧測定をおこなった後、実験動物の管理、使用に基づく本国の指針に従い、安楽死させた。速やかに、4%Paraformaldehyde/0.2%ピクリン酸/0.1MP BpH7.2にて還流固定を行った後、それぞれのラットのwills動脈輪の採取を行った。

還流固定を行った右前大脳動脈—嗅動脈分岐部の血管を長軸方向に、5 micro meterにカットしたのち、Elastica van Gieson染色を行い光学顕微鏡下にて、内弾性板の観察、内膜平滑筋の菲薄化の程度、脳動脈瘤の大きさの測定等を行った。脳動脈瘤の大きさの測定は、長軸径の最大値および、短軸径の最大値で測定を行った。それぞれを3群間にて比較検討を行うと、atorvastatin、etanerceptの投与量に比例して、脳動脈瘤の抑制効果が示された。

次に immunohistochemistry を用いた解析を行った。5% Donkey serum (Jackson Immune Research, Baltimore, Md)にて blocking したのち、一次抗体を1時間室温にて incubate し、その後 fluorescein isothiocyanate-conjugated donkey antirabbit IgG antibody を用いて1時間室温にて二次抗体を labeling した。CD68, iNOS, MCP-1, VCAM, MMP-2, MMP-9, IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$ B, IKK- $\alpha$ , IKK- $\beta$ それぞれの二次抗体にて染色を行った。光学顕微鏡下にての計測においては、3群間の有意差がはっきりととらえられなかったために、定量化を行うべく、RNA isolation および、Reverse Transcription を用いて定量化を行った。

Etanercept 投与実験において、MMP-9, iNOS, IL-1 は、high dose group において抑制効果が示された。VCAM1 では両群間で明らかな差は認められず、MCP-1 においては、high dose group の方が増加する傾向が得られた。NF- $\kappa$ B, IKK- $\alpha$ , IKK- $\beta$ それぞれにおいては、high dose group の方が抑制する傾向が得られた。Atorvastatin 投与実験では、各因子が抑制される傾向であった。

TNF- $\alpha$  inhibitorは脳動脈瘤の抑制効果が得られる可能性があるということ、また、この抑制機序には、マクロファージを介さない機序が関わっている可能性が示唆される。今後、次世代シーケンスによるRNA発現の網羅的解析を行い、発現更新しているmediatorに

つき、蛋白レベルで解明していくことを計画している。

また、ヒトから採取した脳動脈瘤および、正常血管についても同様の解析を施行中であり、ヒトの脳動脈瘤抑制効果に関わる機序の解明、また抑制効果を示し得る薬剤の検討に向けて更なる解析を進めていく。

#### <脳動脈瘤破裂モデルの確立>

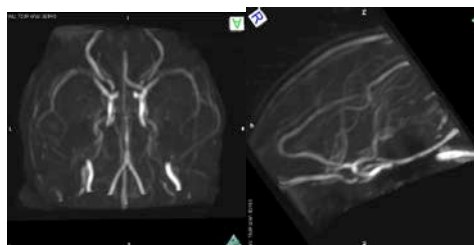
脳動脈瘤破裂モデルの作成として、30匹のラットを用いて血圧上昇実験（血圧コントロール群、血圧上昇群）を行ったが、現在までに明らかなくも膜下出血の発生頻度の上昇は見られなかった。今後は血圧上昇に加えて炎症反応を惹起することにより破裂率を上昇させることを検討する。

#### <サル MR 画像追跡と薬物投与実験>

サル MRA 撮像法：当大学の 7T-MRI 装置を用い、ボディコイルを使用し、塩酸ケタミン（商品名：ケタラール）：5mg/kg、塩酸キシラジン（商品名：キシラジン）：1mg/kg の混合液を筋注後、イソフルランを1~2%で吸入させて撮像中不動化を得る方法で行った。うつ伏せで撮像を行っていたが呼吸で胸郭が動きその影響で画像がブレるため仰向けで撮像を行い呼吸の影響を低減する事に成功した。

撮像プロトコルの選定：現在は angio monkey70 というプロトコル (TR : 40, TE : 6.5, average : 2, R0xPE 128x128, Slice FOV...readout : 80, phase : 80, orientation : axial, slice : 32, gap : 0.0, thickness : 1.5, flip angle : 70) とし、厚さ 1.5 で 32slices 撮像した。それを linux 上で1つのデータにまとめ、OSIRIX 上で 3D-MRA を作成した。

脳動脈瘤誘発処置作成後：卵巣摘出及び脳動脈瘤誘発のための手術を終え5匹につきフォローアップを行っている。脳動脈瘤が形成されたものよりスタチンの内服を開始する予定である。また、動脈瘤形成過程で適切な時期に安楽死させ、ラットで解析してきた各分子マーカー発現の解析を行う予定である。



(サル MRA 画像)

#### 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9件)

- ① Morikawa S, Murayama H, Fujimoto S, Shiino A, Inubushi T: A simple way to acquire T(1)-weighted MR images of rat liver with respiratory triggering. Magn Reson Imaging 30(3):453-8, 2012、査読有
- ② Shiino A, Watanabe T, Shirakashi Y, Kotani E, Yoshimura M, Morikawa S, Inubushi T, Akiguchi I: The profile of hippocampal metabolites differs between Alzheimer's disease and subcortical ischemic vascular dementia, as measured by proton magnetic resonance spectroscopy. J Cereb Blood Flow Metab 32(5):805-15, 2012、査読有
- ③ 横井俊浩, 齊藤実, 吉村弥生, 野崎和彦 脳動脈硬化に関する研究と今後の展開 脳動脈瘤研究と薬物治療 滋賀医科大学雑誌(電子ジャーナル版) 2012、査読無
- ④ 青木友浩、野崎和彦: 脳動脈瘤予防とスタチン 脳神経外科速報 21:64-71、2011、査読無
- ⑤ Yanagisawa D, Amatsubo T, Morikawa S, Taguchi H, Urushitani M, Shirai N, Hirao K, Shiino A, Inubushi T, Tooyama I: In vivo detection of amyloid  $\beta$  deposition using  $^{19}\text{F}$  magnetic resonance imaging with a  $^{19}\text{F}$ -containing curcumin derivative in a mouse model of Alzheimer's disease. Neuroscience 16:184:120-7, 2011、査読有
- ⑥ Shiino A, Akiguchi I, Watanabe T, Shirakashi Y, Nozaki K, Tooyama I, Inubushi T: Morphometric characterization of Binswanger's disease: Comparison with Alzheimer's disease. Eur J Radiol. 2011 Jun 25. [Epub ahead of print]、査読有
- ⑦ 青木友浩、西村真樹、片岡大治、石橋良太、森下竜一、野崎和彦、橋本信夫、宮本享: 細胞外基質の産生分解から見た脳動脈瘤増大機構の解析と治療への展望 脳卒中 32:538-543、2010、査読有
- ⑧ 横井俊浩、野崎和彦: 脳動脈瘤発生・増大のメカニズム 脳神経外科 38:787-793、2010、査読無
- ⑨ 青木友浩、西村真樹、高木康志、片岡大治、石橋良太、森下竜一、橋本信夫、野崎和彦: 脳卒中の先端治療研究 臨床への道 NF-kappaB活性化を中心とした脳動脈瘤形成の分子機序の解明と臨床応用への展望

脳卒中 31:425-432、2009、査読有

〔学会発表〕(計11件)

- ① 野崎和彦: 脳動脈瘤の発生と病理 第4回脳血管手術研究会 名古屋 H23.7.24
- ② 野崎和彦: 脳動脈瘤の成因予防 第14回日本病院脳神経外科学会(愛媛) H23.7.17
- ③ 野崎和彦: 脳動脈瘤の成因から見た薬物療法の可能性 第20回日本脳ドック学会総会(東京) H23.7.8
- ④ 野崎和彦: 脳動脈瘤 基礎と臨床 第34回香川脳血管障害研究会(香川) H23.3.4
- ⑤ Nozaki K: Molecular and genetic analysis for cerebral aneurysms 2010 Congress of Neurological Surgeons Annual Meeting, San Francisco, October 16-21, 2010
- ⑥ 野崎和彦: 脳動脈瘤の予防・治療 第14回北海道脳卒中勉強会(札幌) H22.7.10
- ⑦ 野崎和彦: 脳動脈瘤の成因と予防 第5回上総脳卒中予防研究会(千葉) H22.3.11
- ⑧ Nozaki K: Molecular and genetic analysis for cerebral aneurysms (Key Note Lecture) 5<sup>th</sup> International Mt. BANDAI Symposium for Neuroscience, Hawaii, January 25, 2010
- ⑨ 野崎和彦: 脳動脈瘤の発症機序および新しい治療法の可能性 第19回脳血管シンポジウム(東京) H21.9.12
- ⑩ 野崎和彦: 脳動脈瘤 成因と予防 第13回宮城県脳ドック研究会(仙台) H21.7.21
- ⑪ 野崎和彦: 脳動脈瘤 成因と予防 第18回日本脳ドック学会(東京) H21.6.3

〔図書〕(計6件)

- ① 青木友浩、野崎和彦: 未破裂脳動脈瘤に対する薬物療法 神経疾患最新の治療 2012-2014 巻頭トピックス 6-9 南江堂
- ② 横井俊浩、青木友浩、齋藤実、野崎和彦: 脳動脈瘤の発生増大のメカニズム 医学のあゆみ 236:107-115、2011
- ③ 青木友浩、西村真樹、野崎和彦、宮本享: 脳動脈瘤治療薬としてのスタチン製剤の可能性 脳と循環 15:207-211、2010
- ④ 横井俊浩、青木友浩、野崎和彦: 脳動脈瘤と炎症 Clinical Neuroscience 28:938-940、2010

- ⑤ 横井俊浩、野崎和彦：第5節 脳血管疾患、第6項 脳動脈瘤「モデル動物利用マニュアル」シリーズ 「疾患モデルの作製と利用—循環器疾患」エルアイシー 2010
- ⑥ 横井俊浩、森田明夫、野崎和彦：未破裂脳動脈瘤の最新エビデンスと治療 医学のあゆみ 231：535-540、2009

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

野崎 和彦 (NOZAKI KAZUHIKO)  
滋賀医科大学・医学部・教授  
研究者番号：90252452

### (2) 研究分担者

地藤 純哉 (JITO JUNYA)  
滋賀医科大学・医学部・助教  
研究者番号：50534161

西村 真樹 (NISHIMURA MASAKI)  
京都大学・医学研究科・助教  
研究者番号：60452348

横井 俊浩 (YOKOI TOSHIHIRO)  
滋賀医科大学・医学部・助教  
研究者番号：20573182

犬伏 俊郎 (INUBUSHI TOSHIRO)  
滋賀医科大学・MR 医学総合研究センター・  
教授  
研究者番号：20213142

森川 茂廣 (MORIKAWA SHIGEHIRO)  
滋賀医科大学・医学部・教授  
研究者番号：60220042