

令和 6 年 5 月 13 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16622

研究課題名(和文)脳動脈瘤病態を形作る慢性炎症環境の成立要件としての脳血管内皮細胞間バリア機能破綻

研究課題名(英文)Identification of mechanisms leading to chronic inflammation in the arterial wall responsible for the progression of intracranial aneurysm

研究代表者

栢原 智道 (Kayahara, Tomomichi)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：10895478

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：脳動脈瘤はマクロファージ依存的な脳血管壁の慢性炎症性疾患と理解されている。本研究計画では、慢性炎症局面の形成にあたり脳血管壁へのマクロファージ浸潤の障壁となる、内弾性板および血管内皮細胞間結合の破綻機構につき検証した。そして、内弾性板が断裂していない病態形成初期において、内弾性板の断裂に繋がると考えられる内弾性板、および周辺の血管壁構成細胞の形態学的変化を同定した。また、内弾性板断裂の誘導機構についても検証を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、内弾性板断裂につながると考えられる初期の形態学的変化を同定した。内弾性板断裂機構の解明は、慢性炎症に関連する個々の分子にアプローチするのではなく、脳動脈瘤病変部における慢性炎症反応の場の形成自体を阻害するという革新的な戦略の開発につながることが期待される。また、慢性炎症局面の形成は脳動脈瘤のみならず多くの疾患に共通の病態制御基盤であり、本研究の進展は炎症性疾患全般の病態形成機構の理解の一助となり得るものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have revealed that macrophage-dependent chronic inflammation in arterial walls regulates the progression of intracranial aneurysm. In the present study, I examined the mechanisms triggering the macrophage invasion into the arterial wall. As a result, I identified initial morphological changes of internal elastic lamina and surrounding cells which may lead to the disruption of internal elastic lamina. Also, I'm trying to clarify how the disruption of internal elastic lamina could be induced.

研究分野：脳血管障害

キーワード：脳動脈瘤 慢性炎症 内弾性板 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

脳動脈瘤の破裂を主要な原因とするくも膜下出血は医療技術が発達した現在でもなお、高率な死亡率・後遺症率を有する重篤な疾患である。よって、くも膜下出血はいまだにアンメットメディカルニーズとなり続けている。近年の検討から、脳動脈瘤の病態がマクロファージ依存的な脳血管壁の慢性炎症反応により制御されていることが明らかとなっている。また、脳動脈瘤にまつわる最も重要なイベントである脳動脈瘤破裂によるくも膜下出血の発症に関しても、脳血管壁の炎症反応が重要な役割を果たしていることが示唆されている。さらに、脳動脈瘤破裂によるくも膜下出血が抗炎症作用を有するスタチン製剤で抑制可能であることを示した横断的観察研究も、脳動脈瘤の進展への炎症反応寄与を示唆している。このような病態を制御する炎症反応を惹起する重要な過程として、炎症細胞であるマクロファージの脳血管壁への浸潤がある。脳血管壁では外膜部の vasa vasorum が欠如しているために、マクロファージが病態形成進展過程で脳血管壁へ浸潤する際には、必然的に最内層である血管内皮細胞層を通過する。実際に、我々も病変部の電子顕微鏡観察から内皮下でのマクロファージの存在を確認している。

内皮細胞層のバリア機能を担う主要な構造は、密着結合や接着結合に代表される血管内皮細胞間結合である。脳動脈瘤病変では、内皮細胞の形態変化が報告されているとともに、モデル動物を用いた検討で血管内皮細胞間結合に関与する Occludin が減少していることが報告されている。また、モデル動物において Evans blue dye を頸動脈より投与することで、病変部では脳血管壁への dye の漏出が認められることから、血管内皮細胞間結合の機能低下が示唆される。

しかし、どのような機構で血管内皮細胞間結合とバリア機能が脳動脈瘤の形成進展過程で損傷されるのか、その微細構造や血管透過性が各病態形成時期でどのように変化するのか、またそれが実際にマクロファージの浸潤を促進するのか、そして血管内皮細胞間結合の損傷が果たして脳動脈瘤発生の必須条件であるのかといった重要な点については、不明である。

2. 研究の目的

本研究計画では、脳動脈瘤の発生・増大・破裂の各病態時期における血管内皮細胞間結合の微細構造や血管透過性、およびマクロファージの脳血管壁への浸潤様式について、ヒト由来の標本に加えてラットの未破裂脳動脈瘤および脳動脈瘤の自然破裂によりくも膜下出血を発症するモデルを用いて検討する。

さらに *in vivo* での内皮細胞間バリア機能低下のモデルとして *Pkd1* 欠損ないしヘテロ接合ラットを採用し、脳動脈瘤の発生から破裂に至る病態がどのように促進されるか検証する。主に *Pkd1* 遺伝子 (polycystin 1 をコード) の変異で発症する常染色体優性遺伝多発性嚢胞腎 (autosomal dominant polycystic kidney disease : ADPKD) は、脳動脈瘤の有病率が高いことが疫学的に明確に示されている最大の遺伝疾患である。ADPKD で発現が低下する polycystin 1 については、ヒト尿管上皮細胞の接着結合に関与していること、ヒト血管内皮細胞の細胞間結合部位に存在していること、さらにマウスでは *Pkd1* 欠損により血管漏出や血管破裂が惹起されることが報告されている。すなわち、polycystin 1 は血管内皮細胞の細胞間結合やバリア機能の維持に重要であると推測される。

これらの検討から、脳動脈瘤の病態形成機構における内皮細胞間バリア機能破綻の意義を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

血管内皮細胞間結合の微細構造の形態学的な検証および関連するタンパク質に関する検討

ラットモデルの各病態形成時期における病変部および正常脳血管で、血管内皮細胞間結合の微細構造について電子顕微鏡を用いて検討する。また 3 次元電子顕微鏡観察法も用い血管内皮細胞間結合の立体構造も検証する。そして、密着結合や接着結合等の内皮細胞間結合につき病態形成進展過程でどのように変容するのかの情報を得る。

マクロファージの脳血管壁への浸潤様式の検証

マクロファージの脳血管壁への浸潤について、ラットモデルの各病態形成時期の標本を使用して電子顕微鏡観察や CD68 をマクロファージのマーカーとした免疫組織化学で同定し、各時期における脳血管壁内の局在や個数の変化を検討する。さらに、マクロファージの遊走因子 CCL2 のドミナントネガティブ変異体や CCL2 の受容体である CCR2 の阻害薬を使用することで、マクロファージが脳動脈瘤壁へ浸潤するために使用する情報伝達経路を同定する。

Pkd1 欠損ないしヘテロ接合ラットを *in vivo* での内皮細胞間バリア機能低下のモデルとして用いた検討

野生型、および *Pkd1* 欠損ないしヘテロ接合ラットを脳動脈瘤モデルに供して、血管内皮細胞間結合の微細構造、血管透過性、マクロファージの脳血管壁への浸潤様式の検討をそれぞれ行い、内皮細胞間バリア機能と炎症細胞浸潤につき検証する。そして、脳動脈瘤の発生、誘導された脳動脈瘤の大きさとその推移、破裂率の検討を通して、脳動脈瘤の発生から破裂に至る各病態がどのように促進されるか検証する。

4. 研究成果

まず、*in vivo* での内皮細胞間バリア機能低下モデルとして、*Pkd1* 欠損ラットの樹立を目指したがすべて胎生死となり断念した。また、脳動脈瘤の破裂時期におけるマクロファージの浸潤様式の検討のため、マクロファージの遊走因子の機能抑制を試みた。細胞実験では、遊走因子のドミナントネガティブ変異体が遊走因子の機能を抑制することを示したが、ラットに脳動脈瘤を誘導したのちドミナントネガティブ変異体をラットの血液中に発現させる手法の確立が困難であった。

これらの経緯から、血管内皮細胞間結合と同様にマクロファージ浸潤の障壁となる内弾性板の断裂機構の解明に主眼を移した。脳動脈瘤モデルラットの脳血管の電子顕微鏡撮影用標本作製し、脳動脈瘤病変部における内弾性板の微細構造につき走査型電子顕微鏡撮影により検証した。そして、内弾性板が断裂していない病態形成初期において、内弾性板の断裂に繋がると考えられる内弾性板、および周辺の血管壁構成細胞の局所的な形態学的変化を同定した。引き続き、血管壁構成細胞の内弾性板断裂への寄与に関して透過型電子顕微鏡撮影などを用いたさらに詳細な形態学的検証を進めている段階である。また、併せて内弾性板断裂への関与が示唆される酵素の発現状況や局在についての検証を進めていく。

以上から、本研究の現在の目的である内弾性板断裂機構の解明は途上ではあるが、着目すべき所見の同定はできており、今後の発展につながる基盤が構築できたと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Ono Isao, Kayahara Tomomichi, Kawashima Akitsugu, Okada Akihiro, Miyamoto Susumu, Kataoka Hiroharu, Kurita Hiroki, Ishii Akira, Aoki Tomohiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Hypoxic microenvironment as a crucial factor triggering events leading to rupture of intracranial aneurysm	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5545
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-32001-z	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 -

1. 著者名 栢原 智道、井谷 理彦、青木 友浩	4. 巻 51
2. 論文標題 総説 脳動脈瘤を例に炎症を考える	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neurological Surgery 脳神経外科	6. 最初と最後の頁 931～940
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11477/mf.1436204836	査読の有無 無
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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 栢原智道, 栗田浩樹, 青木友浩.
2. 発表標題 脳動脈瘤破裂を制御する分子機序の解明と破裂予防のための新規診断治療法開発の展望
3. 学会等名 第53回 日本脳卒中の外科学会学術集会
4. 発表年 2024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
---------	---------