

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 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：14202

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22659257

研究課題名（和文）未破裂脳動脈瘤の核磁気共鳴生体イメージングによる追跡と破裂予測システムの構築

研究課題名（英文）Prediction of cerebral aneurysmal rupture using magnetic resonance imaging

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）：脳動脈瘤の破裂の確率を外科治療前に予測することは困難で、非外科的治療は皆無であり、また破裂を予防回避するシステムは構築されていない。本研究では、脳動脈瘤の発生増大破裂過程を MR 画像を用い細胞分子レベルで追跡することを目標とし、ラット、サルモデルにおいて検証し、MR 画像による描出が可能であること、細胞レベルでの追跡の端緒となるデータが得られた。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this project is to assess cerebral aneurysms sequentially with MR imaging in rat and monkey models and to evaluate the risk of cerebral aneurysm rupture using cell imaging. The protocols of MR imaging for cerebral aneurysms in rats and monkeys were established and preliminary data for cell imaging was obtained.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	0	1,000,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	540,000	3,340,000

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：未破裂脳動脈瘤、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り、働き盛りの生産年齢層に好発することから社会的損失が大きい。近年の脳ドック普及や画像診断の発達により未破裂脳動脈瘤の症例が急増している。各脳動脈瘤の破裂の確率を外科治療前に

予測することは困難で、非外科的治療は皆無であり、また破裂を予防回避するシステムは構築されていない。我々は、先行研究において、ラット、マウスの脳動脈瘤の発生増大に血管壁の炎症反応が深く関与することを報告した (Sadamasu N et al Stroke 34:2980-2984, 2003, Moriwaki T et al Stroke

37:900-905, 2006, Sadamasa N et al J Neurosurg 106:330-336, 2007, Aoki T et al Stroke 38:162-169, 2007, Aoki T et al Stroke 38:2337-2345, 2007, Aoki T et al Circulation 116:2830-2840, 2007)。研究を推進するため脳動脈瘤の発生増大破裂過程を MR 画像を用い細胞分子レベルで追跡することを着想した。

2. 研究の目的

くも膜下出血の多くは脳動脈瘤破裂により発症し予後不良であるが、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、非外科的治療の開発や破裂予測に関する知見は皆無である。本研究の目的は、われわれが先に開発した脳動脈瘤モデル（マウス、ラット、サル）を用い、脳動脈瘤発生増大破裂の分子機構に関わる因子を生体における細胞分子イメージングを用いて画像追跡することであり、この基礎的研究を端緒として未破裂脳動脈瘤の発生増大破裂の予測システムの構築と新たな予防法の確立を目標としている。

従来の研究では、脳動脈瘤誘発処置後に一定の期間をおき動物を安楽死させ、遺伝子、蛋白発現、組織学的変化を検討してきた。本研究の目的は、我々の高率に脳動脈瘤を発症するモデル動物 (Hashimoto N et al Surg Neurol 10:3-8, 1978; Hashimoto N et al J Neurosurg 67:903-905, 1987; Morimoto M et al Stroke 33:1911-1915, 2002) を用い、脳動脈瘤発生増大破裂に至る過程を生体分子イメージングを用い明らかにすること、脳動脈瘤発生増大破裂予測システムを構築することである。脳動脈瘤の発生増大破裂に至る経過を生体で追跡するために、高率に破裂する脳動脈瘤モデルを確立し、頭蓋内脳動脈瘤の形態変化、増大を核磁気共鳴装置を用いて追

跡し、脳動脈瘤壁における細胞分子の動態を分子イメージングを用いて追跡する。

脳動脈瘤は、剖検では一般人口の 1～5% に認められる頻度の比較的高い疾患で、その破裂率は最近の UCAS Japan のデータでは年間約 1% 程度である。我々は実験的脳動脈瘤モデル動物を、1978 年ラットで開発後、数度の modification を経てマウス、サルへ拡大してきた。当モデル動物はヒト脳動脈瘤と類似した病理所見が得られ、ヒト動脈瘤のモデル動物として妥当である。脳動脈瘤の形成増大機構の解析において我々の研究組織は世界有数の報告数を誇り、モデル動物も国内外の複数施設において利用され高い国際的評価を受けている。このモデルでは自然破裂によるくも膜下出血は低い確率ながら発症し、更なる改良により十分にくも膜下出血モデルが確立できると考える。増大する未破裂脳動脈瘤のうちどの症例が破裂の危険が高いか判断する根拠に乏しく、外科治療が必要か判断する客観的証拠はなく、過剰医療や危険症例の見逃しなど多くの問題が存在する。本研究により脳動脈瘤増大破裂に深く関与する因子が解明され、分子マーカーとして多数の未破裂脳動脈瘤症例から破裂の高危険度群を抽出することができれば、適切な医療につながることを期待される。本研究から破裂機構が解明されれば、その機構を抑制する治療法の開発の可能性があり、脳動脈瘤発生増大破裂を予防する新たな治療法を開発することを目指している。

3. 研究の方法

1 : 自然発症くも膜下出血モデル動物の確立 (野崎、横井)

我々は、先に高率に未破裂脳動脈瘤を発症するモデル動物をサル、ラット、マウスにおいて確立した (Hashimoto N et al Surg

Neurol 10:3-8, 1978, Hashimoto N et al J Neurosurg 67:903-905, 1987, Morimoto M et al Stroke 33:1911-1915, 2002)。これらのモデル動物は病理学的にヒト動脈瘤ときわめて類似した脳動脈瘤を誘発できる (Hashimoto N et al Am J Pathol 110:397-399, 1983)。このモデル (ラット、マウス) を用い未破裂脳動脈瘤の病態を解明してきた (Sadamas N et al Stroke 34:2980-2984, 2003, Moriwaki T et al Stroke 37:900-905, 2006, Sadamas N et al J Neurosurg 106:330-336, 2007, Aoki T et al Stroke 38:162-169, 2007, Aoki T et al Stroke 38:2337-2345, 2007, Aoki T et al Circulation 116:2830-2840, 2007)。同モデルでは脳動脈瘤は高率に安定して誘発され、その破裂率は数%である。脳動脈瘤の増大は、血行力学的ストレスおよび血管壁の慢性炎症反応により影響される (Aoki T et al Stroke 38:162-169, 2007, Aoki T et al Stroke 38:2337-2345, 2007, Aoki T et al Circulation 116:2830-2840, 2007)。現状のモデルにさらに血行力学的ストレス増加、炎症反応亢進などにより破裂率を上昇させることを検討する。具体的には、全身血圧をさらに上昇させるためアンジオテンシン持続腹腔内投与、局所的ストレス増大のため両側頸動脈閉塞、炎症反応惹起のためリポポリサッカライド持続腹腔内投与を考えている。動物用マイクロ CT または 7 テスラ MR を用いて定期的に脳動脈瘤の形状変化やくも膜下出血発症の有無を検出する。脳動脈瘤の組織学的検討は、従来の方法に従い elastica van gieson 染色にて行う。

2: 脳動脈瘤発生から破裂に至る各段階のマーカー検索と MR 画像追跡の条件設定 (犬伏、椎野)

我々の先行研究で明らかとなった脳動脈

瘤発生増大に関わる因子、上記くも膜下出血モデルの解析により証明された因子につき破裂に関与するかを検討する。具体的には、各種抗体や阻害剤を用い各因子の発現パターンの確認や阻害による発生増大破裂率の変化をラットモデル動物およびそこに誘発した脳動脈瘤壁標本を用い検討する。破裂と深く関与する因子が見出せた場合、それらが分子マーカーとなりうるかを画像によるイメージングにより解析する。可能であれば血清での変動も検討する。本研究では超高磁場 (7 テスラ) 動物実験用 MR 装置 (Varian 社製 Unity INOVA) を用い、ラット、マウスにおける微小脳動脈瘤の画像追跡と分子マーカーの発現変化を検討し、脳動脈瘤が発生増大破裂する過程を 1 つの生体を用いて追跡し、脳動脈瘤の各段階における画像変化、分子イメージング変化を非侵襲的に捉えることを目標とする。解像度よりマウス、ラットで検出困難な場合は、ラビット脳底動脈モデルを用いる予定である。必要となる機材については、当大学において共同利用可能な診断機器を使用できる状況にあり、これらを利用する。脳動脈瘤発生増大破裂における分子マーカーとして、本研究の当初は特にマクロファージをターゲットとし、各々につき MR 撮像に関するラベルの選択と撮像に関する至適条件の選定を行うが、我々の先行研究で候補となる他の遺伝子群およびたんぱく質がすでに同定されており、脳動脈瘤の破裂の段階で発現や活性が上昇することが証明されている (Sadamas et al J Vasc Res 45:343-349, 2008)。これらからも脳動脈瘤発生増大破裂のマーカーとなりうる因子を選択する。



超高磁場（7テスラ）動物実験用MR装置

(Varian 社製 Unity INOVA)

3：脳動脈瘤発生から破裂に至る各段階でのマーカーの MR 画像によるイメージング追跡 (横井)

前年度において検討された脳動脈瘤発生増大破裂のマーカーを用い、ラット脳動脈瘤誘発モデル、ラットくも膜下出血誘発モデル、マウス、ラビット脳動脈瘤誘発モデルにおいて、脳動脈瘤発生増大破裂に至る過程を形態的に画像化し、脳動脈瘤の大きさや形状の変化、マーカーの経時的変化を捉える。破裂モデルにおいては脳動脈瘤の形状の変化と各マーカーの変化の相関を画像化する。撮像条件は前年度に設定されたものを用いるが、各マーカーにより設定条件を適宜変更する。細胞マーカーとして浸潤マクロファージを用いる場合は、我々がすでに移植細胞の MR tracking において成功している実験プロトコルに従い (Masuda C, et al Neurosci Res 56:224-228, 2006, Song Y et al Neurosci Lett 395:42-45, 2006, Maki J et al Biomaterials 28:434-440, 2007)、同一個体より得られた単核細胞またはマクロファージに同様のラベリングを行うことで脳動脈瘤への集積を確認する。また脳動脈瘤の細胞治療としての内皮修復を念頭におき、末梢血より採取した内皮前駆細胞 (EPC) (Kawamoto A et al Circulation 103:634-637, 2001) を MR tracking 用にラベルし、脳動脈瘤への集積を

MR を用いて検討し、治療応用可能か検討する。

4：脳動脈瘤発生増大破裂に対する治療効果の画像追跡 (野崎)

ラット脳動脈瘤誘発モデル、ラットくも膜下出血誘発モデル、またはマウス、ラビット脳動脈瘤誘発モデルにおいて、薬剤投与による脳動脈瘤の形態変化、細胞分子マーカーの変化を MR 画像追跡により検討する。我々は先行研究において、ラット、マウスの脳動脈瘤の発生増大に血管壁の炎症反応が深く関与することを報告してきた (Sadamasa N et al Stroke 34:2980-2984, 2003, Moriwaki T et al Stroke 37:900-905, 2006, Sadamasa N et al J Neurosurg 106:330-336, 2007, Aoki T et al Stroke 38:162-169, 2007, Aoki T et al Stroke 38:2337-2345, 2007, Aoki T et al Circulation 116:2830-2840, 2007)。これらの炎症因子の活性化を抑制する薬剤として、Ca 拮抗剤、statin 製剤に注目し、これらの薬剤がラット脳動脈瘤の増大を抑制する可能性を示してきた (Aoki T et al Stroke 39:1276-1285, 2008, Aoki T et al Curr Neurovasc Res 5: 7-45, 2008, Aoki T et al Neurosurgery in press)。ここでは、脳動脈瘤誘発処置、またはくも膜下出血誘発処置を行ったのち一定期間ののち Ca 拮抗剤、statin 製剤を投与し、1つの生体における脳動脈瘤の形態変化を MR を用いて詳細に検討し、さらに平成 22 年度に選定された各種細胞分子マーカーの薬物治療による変化を検討する。特に statin は骨髄由来の EPC の頸動脈内膜損傷病変への動員を促進することが報告されており (Walter et al Circulation 105:3017-3024, 2002)、EPC 及び statin 製剤の脳動脈瘤病態への関与が示唆される。

5：霊長類における脳動脈瘤画像診断への展開 (野崎、横井、犬伏、椎野)

ラット、マウス、ラビットにおいて検討さ

れ臨床応用の可能性があるマーカーが同定された場合、これをサル脳動脈瘤モデルに応用するための準備を行う。モデルとしては、すでに確立しているカニクイザル脳動脈瘤誘発モデル (Hashimoto N et al J Neurosurg 67:903-905, 1987) を用いる。当大学の動物生命科学研究センターにおいて繁殖維持されているカニクイザルを用いてサル脳動脈瘤モデルを作成し、脳動脈瘤発生増大の形態的過程と発生増大に関わるマーカーの発現変化を、ラットと同様に 7T-MR にて画像追跡する。さらに、ラット、マウス、ラビットにおいて有効性が証明された薬剤を用いて、サルのモデルを用いて脳動脈瘤の治療効果を検討する。

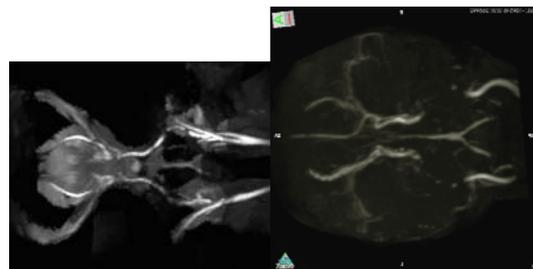
4. 研究成果

ラットを用いた研究結果:省略(論文作成中)
サルを用いた研究結果概要:雌のカニクイザル (*Macaca fascicularis*) (平均体重: 3.5kg、平均年齢: 10 歳前後) にケタミン (5mg/kg) + キシラジン (1mg/kg) の筋肉注射を行い不動化した後、維持麻酔としてイソフルレンを 1%~2% を用い、両側の卵巣摘出を行った。術後より高血圧を誘発するために 1% の食塩水を給水した。さらにコラーゲンのクロスリンクを阻害して血管壁を脆くするフマル酸 β アミノプロピオニトリルを 0.2% 含有する特殊飼料を調整し供給する事でさらに脳動脈瘤が誘発されやすい状況を創出した。7T-MRI を使用した MRA 撮影では、body coil を使用し、頭部固定器は、アクリルの筒とペットボトルを用いて自作し、ペットボトルの先には麻酔器をつないで麻酔装置としても使えるようにした。麻酔は、ケタミン (5mg/kg) + キシラジン (1mg/kg) の筋肉注射を行い、維持麻酔としてイソフルレンを 1%~2% で吸入させ撮影中の不動を得た。撮像プロトコールは以下の通りである。

TR:40、TE:6.5、average:4

FOV readout:80、phase:80、flip angle:70
slice:32、gap:0、thickness:1.2

Slice offset を 0.3 ずつずらして 4 回撮影しそれをコンピューター上で融合させて MRA を作成する方法を採用した。1 回の撮影は約 10 分程度である。9 ヶ月目のフォローアップが終わった現在、fig. 7-11 の様に 5 頭中 4 頭に MRA にて脳動脈瘤を疑わせる信号変化を認めている。現在、スタチン投与を開始し、脳動脈瘤の形成状況を確認中である。また、脳動脈瘤へのマクロファージ浸潤を画像化するための薬剤の準備を行っており、撮像プロトコールを作成中である。



ラットMRA

サルMRA

考察:最近、脳ドックや検診などで未破裂脳動脈瘤が発見される機会が増えているが、ヒトにおいて未破裂脳動脈瘤が発見された場合の処置として、脳動脈瘤の自然歴に応じて外科的治療を検討することになっている。しかし、各脳動脈瘤の破裂の確率を外科治療前に正確に予測することは困難であり、また開頭術や血管内治療以外の非外科的治療は皆無である。また、脳動脈瘤の発生増大破裂を予測したり回避するシステムは構築されていない。我々が開発してきた脳動脈瘤誘発モデルでは、脳動脈瘤の発生増大破裂に至る過程を追跡することが可能であり、従来より誘発処置後の一定時間 (2 週間、1 ヶ月、3 ヶ月) に動物を安楽死させ組織学的検討を行って

きた。このため実験動物としてラット、マウスを使用することとなり、普遍的な所見を得るまでに多くの実験動物が必要となっていた。本研究では破裂に至る経過を画像により追跡すること、1つの生体で脳動脈瘤を追跡することが可能となるため、**動物愛護**の観点からも有意義であり、特にサルを用いた研究へと発展させることが可能となる。また、脳動脈瘤の発生増大破裂に関与する新たな分子マーカーが画像化された場合、ラット、マウス、サルで得られた知見をヒトへ応用することにより、**ヒトにおける未破裂脳動脈瘤に対する適正な治療指針を再構築することが可能**となり、医療経済の観点からも極めて有意義である。我々はラット、マウスにおいて様々な因子が脳動脈瘤の発生増大に関与していることを発表してきたが、破裂に至る過程、ヒトにおける適応については未検討である。未破裂脳動脈瘤が微小であるため、脳動脈瘤の形状のみならず細胞分子マーカーを描出するためには高感度の検出装置、画像装置が必要となる。また、本研究においても当初はラット、マウスを対象とすることを予定しているため、**高性能の MR 装置**が必須である。幸い本学には動物研究用の7テスラ MRを装備しており、**生体情報の MR tracking**は革新的先端的知見を臨床現場へ提供する可能性があり、本研究により、新たな脳動脈瘤研究と臨床応用への展開がもたらされると確信している。

未破裂脳動脈瘤の治療には現在外科的治療しか存在しない。この原因として、脳動脈瘤破裂にいたる病態が不明であること、どのような因子が破裂に関与することが不明であることなどが挙げられ、脳動脈瘤破裂の病態解明において、ヒトのサンプルを用いた検討では限界がある。本研究は、我々が先に開発したモデル動物を改変し今まで確立され

ていない自然発症くも膜下出血モデルを開発すること、今まで不明であった脳動脈瘤破裂の機構を分子レベルで明らかにしようとする、1つの生体において脳動脈瘤の全過程を追跡すること、現時点では不可能である未破裂脳動脈瘤破裂の高危険群の推定を行う点において独創的であり斬新である。特に、本研究において中心的な目標である**生体における脳動脈瘤画像追跡システムの構築**は、動物実験における倫理性の確保の観点からも意義があり、また臨床現場において汎用されている定期的画像診断を考えると、臨床応用に向けて有用な結果をもたらすものと思われる。まず、脳動脈瘤の発生増大破裂に関与する因子が、診断マーカーとして有用であるか、また治療薬のターゲットとなりうるかをラット脳動脈瘤モデルにおいて組織学的検討、薬物投与実験、MR画像を用いて検討する。特に有望な知見が得られた場合には同因子につきサルを用いた実験を行う。これらの動物実験で得られた知見を最終的にヒトに臨床応用し、未破裂脳動脈瘤症例における脳動脈瘤の発生増大破裂の予測システムの構築と新たな予防法の確立を目標としている。

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9件)

(1) 横井俊浩、野崎和彦

実験的脳動脈瘤からの考察

Clinical Neuroscience 31:414-416, 2013 (査読無)

(2) 横井俊浩、野崎和彦

未破裂脳動脈瘤の基礎病理と保存的治療の展望

Annual Review 神経 2013 129-135 中外医学社 (査読無)

(3) 横井俊浩, 齋藤実, 吉村弥生, 野崎和彦
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
(査読有)

(4) 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 (査読無)

(5) 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)

(6) 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 (査読無)

(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) 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 (査読無)

(9) 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 (査
読無)

[学会発表] (計 2 件)

(1) 齋藤実, 横井俊浩, 椎野顕彦, 野崎和彦
カニクイザルを用いた実験的脳動脈瘤形成
とスタチンによる抑制効果の検証 (第一報)
第 38 回日本脳卒中学会総会
平成 25 年 3 月 23 日 東京

(2) 横井俊浩, 齋藤実, 椎野顕彦, 野崎和彦,
他
TNF- α 阻害剤による脳動脈瘤形成に対する抑
制効果の検討
第 38 回日本脳卒中学会総会
平成 25 年 3 月 23 日 東京

[図書] (計 1 件)

(1) 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. 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

犬伏 俊郎 (INUBUSHI TOSHIROU)
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

(3) 研究分担者

椎野 顕彦 (SHIINO AKIHINO)
滋賀医科大学・MR 医学総合研究センター・
准教授
研究者番号: 50215935

(4) 研究分担者

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