

## 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4月24日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791341

研究課題名（和文）マウスを用いた脂質異常症における頭蓋内脳動脈拡張後リモデリングの病態解析

研究課題名（英文）Clarification of pathophysiology of remodeling after intracranial artery injury model in mice in dyslipidemia

研究代表者

島村 宗尚 (MUNEHISA SHIMAMURA)

大阪大学・連合小児発達学研究所・寄附講座准教授

研究者番号：60422317

研究成果の概要（和文）：

マウスにおける頭蓋内脳動脈拡張後再狭窄モデルを確立し、リモデリングの過程を継時的に観察した。結果、頭蓋内脳動脈は、動脈拡張による傷害後の新生内膜肥厚が28日目以降に強くなる点、再内皮化が遅い点、炎症細胞浸潤が7日目以降に外膜を中心に起こる点が頭蓋外動脈とは異なることが明らかとなった。Lp(a)高値となるLp(a)トランスジェニックマウスでは、野生型マウスと比較してリモデリングの過程に明らかな差は認められなかったことから、脂質異常症のひとつであるLp(a)高値は頭蓋内脳動脈傷害後のリモデリングに影響を与えないことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, we established the intracranial artery injury model in mice. The temporal profile of remodeling was as follows: neointimal formation was grown from 28 days after injury; re-endothelialization was started from day 7; inflammatory cells were observed from day 7 in the adventitia. These processes of remodeling were quite different from those in extracranial arteries. Using this model, we examined whether dyslipidemia had influences on the process of remodeling. To demonstrate it, Lp(a) transgenic mice, which showed high serum Lp(a) level, were exposed to the injury model. Unexpectedly, the extent of neointimal formation and the rate of re-endothelialization were not different between the groups. From the viewpoints, Lp(a) level might have no influences on remodeling after the injury in intracranial arteries.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：脳血管内外科学、リモデリング、脳血管形成術、脂質異常症、マウス

1. 研究開始当初の背景

|

(1) 頭蓋内動脈の動脈硬化性狭窄病変は、内科的な治療法では不十分である症例も多く、新たな治療方法として頭蓋外動脈で用いられるデバイスを応用した血管拡張術が試みられてきたが、血管拡張術に伴う血管傷害により生じる再狭窄率が高いことが問題となってきた。頭蓋外動脈においてはマウスを用いた実験にて血管傷害後のリモデリングについての多くの知見がもたらされてきた。しかし、頭蓋内動脈についてはマウスモデルが存在していなかった。頭蓋外の動脈とは構造が大きく異なっていることから血管傷害後の反応が異なる可能性があるため、頭蓋内動脈傷害のマウスモデルが必要とされていた。

(2) 頭蓋内動脈傷害後のリモデリングの過程が頭蓋外動脈とは異なる反応を示すのか、明らかではなかった。また、近年、ラパマイシンなどのdrug-eluting stentによる再狭窄が5%-38% (Gupta et al. Stroke 2006, Qureshi et al. Neurosurgery 2006, Fields et al. Interv Neurorad 2011) とその効果がcontroversialであり、デバイスの問題かあるいはラパマイシン自体に再狭窄の抑制効果がないか明らかではなかった。

(3) 頭蓋外血管においてリモデリングの過程に影響を与える脂質異常症について、脳血管での影響は明らかではなかった。

## 2. 研究の目的

(1) マウスにおける頭蓋内動脈傷害モデルを確立する。

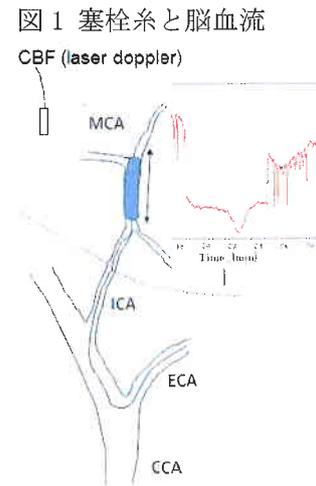
(2) 継時的な組織学的検討から頭蓋内動脈傷害後のリモデリング過程を観察することにより、頭蓋外動脈との反応の差を明らかにする。また、ラパマイシンを投与し、新生内膜肥厚を抑制可能か明らかにする。

(3) マウスを用いた血管傷害後の新生内膜肥厚を悪化させる脂質異常症の一つとして報告されているLp(a)トランスジェニックマウス (Nakagami et al. Atherosclerosis. 2010) を用いて、頭蓋内動脈におけるリモデリングに対する脂質異常症の影響を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) C57BL6/JマウスおよびFVBマウスを用いて頭蓋内に血管径の約1.5倍のサイズのコーティングを施したナイロン糸を挿入し、血管を擦過する。その際、中大脳動脈領域に設置したレーザードプラで血流を測定し、血流低

下、再灌流を確認し、ナイロン糸がきちんと往復していること (=擦過) できていることを確認する (図1)。傷害1日目、28日目、56日目の組織を確認し、傷害後のリモデリングができているか確認する。安定したモデルを確立するために、塞栓糸のサイズ、コーティングのサイズ、往復の回数、マウスの体重を調整する。



(2) (1) で確立した方法を用いて、血管傷害後、3時間、1日目、3日目、7日目、14日目、28日目、56日目の組織を作成し、H E染色、EVG染色で組織の形態を確認、また、急性期のアポトーシスについてTUNEL染色、炎症細胞の浸潤についてはF4/80に対する免疫染色、再内皮化についてはCD31、血管平滑筋については $\alpha$ SMAにて免疫染色を行う。ラパマイシンについては頭蓋外血管での過去の報告を参考に (Shen et al, PNAS 2008)、4 mg/kg/dayにて56日間投与し、新生内膜肥厚、再内皮化を確認する。

(3) (1) で確立した方法を用いて、Lp(a)Tgマウスに傷害を起こし、56日目に新生内膜肥厚と再内皮化を確認する。

## 4. 研究成果

(1) 安定したモデルの確立を目指し、様々な条件を検討したところ、5-0ナイロン糸の先端をエポキシ樹脂で血管径の約1.5倍にコーティングしたものを、26-27グラムのFVBマウスに挿入し、5分間、塞栓糸を留置後、血流を再灌流させ、10回往復して擦過することにより、急性期の血管拡張、中膜の細胞死、28-56日目における新生内膜肥厚の出現ができるようになった。手術による死亡率は約15%、術後の生存率は約80%であった。新生内膜肥厚のばらつきについては図6control群に示すようなばらつきであった。また、C57BL6/Jマウスは同様の手術において、10回往復後の再灌流にてSAHを起こすマウスが約70%と高率であ

ることから、塞栓系の改良、マウスの体重の調節を試みたが、本研究期間中には改善できなかった。

(2) 血管傷害後のリモデリングの過程は図2のような経過であった。定量の結果(図3)、血管腔のサイズは28日目までは拡大しているものの56日目には縮小傾向となった。また、血管径は継時的に拡大しているが、これは血管外膜の肥厚が寄与していると考えられた。新生内膜肥厚は14日目から出現するが、28日目から56日目にかけて拡大の傾向であった。

図2 傷害後のリモデリング (EVG 染色)

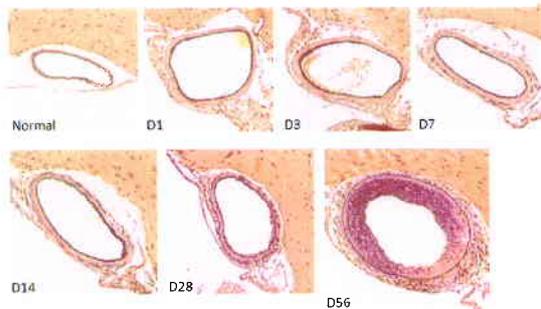
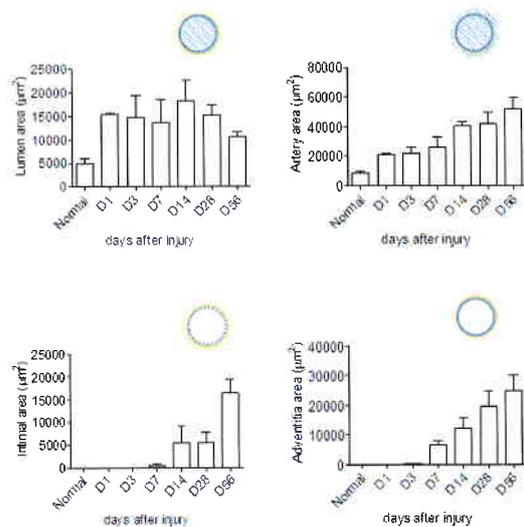


図3 リモデリング (定量)



中膜のαSMA陽性の平滑筋は早期に消失し、以後、56日目まで出現は認められなかったが、新生内膜内に出現が認められた。また、αSMA陽性の平滑筋の消失は、TUNEL染色陽性であることから、一部の細胞はアポトーシスであったことが示された。再内皮化は7日目から出現し、56日目にはしっかりと再内皮化が認められた(図4)。F4/80陽性の炎症細胞の浸潤は7日目より出現し(図5)、血管周囲に著明であり、56日目まで持続的な発現が認められた。また、シロリムスを投与したマウスでは、新生内膜肥厚が明らかに抑制されていた(図6)。また、再内皮化については特に抑

図4 傷害後の再内皮化

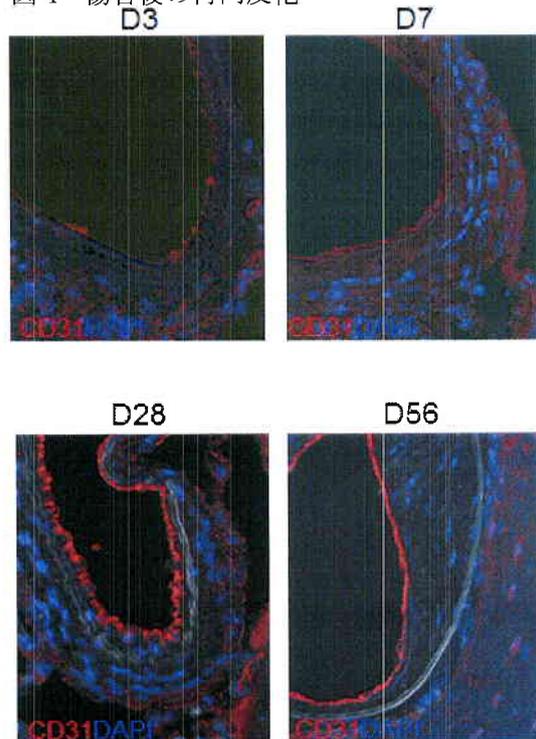
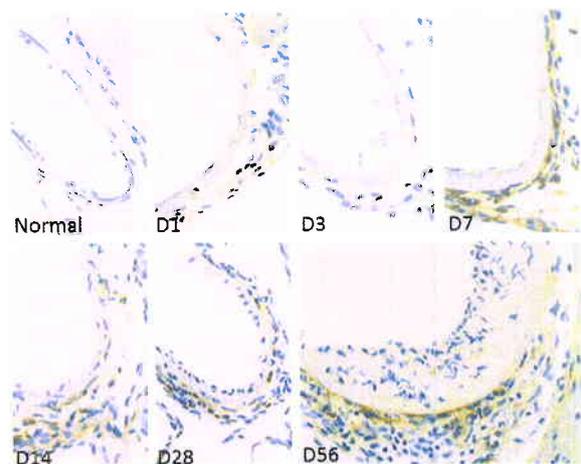


図5 F4/80 陽性細胞の出現



制されていなかった(図6)。これらの結果を過去のマウスでの頭蓋外血管での傷害モデルと比較すると図7のようになり、頭蓋内動脈の反応は頭蓋外動脈とは異なる可能性が示唆された。また、シロリムスでの効果が認められたことより、本モデルが治療実験への応用にも使えることが証明された。

(3) Lp(a) Tgマウスにおいて障害を作成したところ、56日目の時点で新生内膜肥厚に明らかな差は認められなかった(図8)。また、血管内皮も再生しており、両群、ほぼ全周性に再内皮化は完了しており、あきらかな有意差は認められなかったことから、頭蓋外で新

生内膜厚の悪化を惹起するLp(a)は頭蓋内血管傷害後のリモデリングには影響がないことが明らかとなった。

図6 ラパマイシンの効果

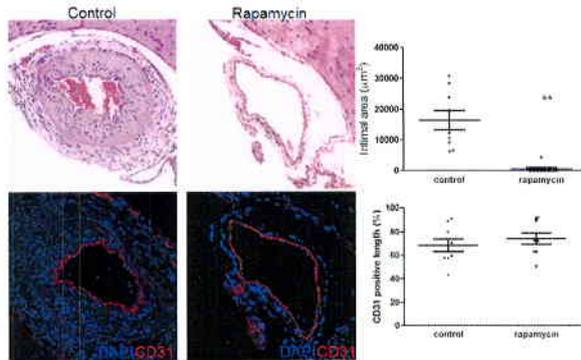
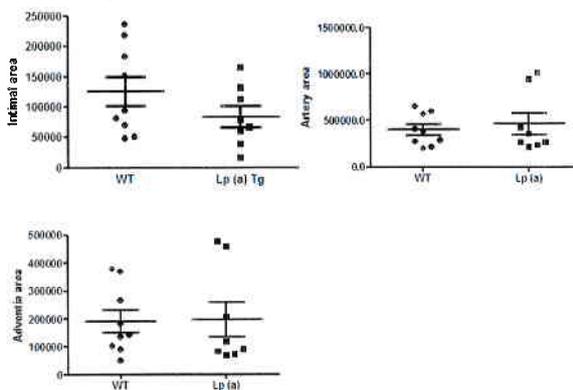


図7 頭蓋外血管との比較

	Present model	Femoral or Carotid*
Neointimal hyperplasia	D1→D28→D56	D28→D56
Re-endothelialization	D1→D14→D28→D56	D3→D28
Loss of αSMA positive cells	100%	60-70%
Inflammatory cells	D7→D56 Adventitia	D1→D28 Neointima, media, Adventitia
Response to rapamycin	Yes	Yes

\*previous studies in rats and mice  
 Sata et al., *J Mol Cell Cardiol* 2000; Viswanathan et al., *Peptides* 1997; Rubin et al., *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998; Kudrjashova et al., *Histochem Cell Biol* 2002; Liu et al., *JCI* 2000

図8 Lp(a) Tg マウスでのリモデリング



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)

[学会発表] (計2件)

①島村宗尚、中神啓徳、三宅隆、志水秀郎、大塚マリアナ今日美、中神太志、久徳真梨子、郡山弘、森下竜一. A Novel Mouse Model of Intracranial Artery Injury that Induces Delayed Neointimal Hyperplasia and Long-lasting Perivascular Inflammation.

第76回日本循環器学会総会 2012年3月18日、福岡

②島村宗尚、中神啓徳、若山幸示、三宅隆、久徳真理子、中神太志、大塚マリアナ今日美、郡山弘、森下竜一. 脳血管形成術後再狭窄の病態解明を目的とした脳血管傷害モデルの開発. アンチエイジングフェスタ 2011, 2011年12月2日大阪

6. 研究組織

(1)研究代表者

島村 宗尚 (SHIMAMURA MUNEHISA)  
 大阪大学・大学院連合小児発達学研究所・寄附講座准教授  
 研究者番号：60422317

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし