

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390342

研究課題名(和文)脳動脈瘤に対する非外科的治療法開発のための橋渡し研究

研究課題名(英文) Bridging research for development of non-surgical treatments against cerebral aneurysms

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：われわれが先に開発したラット脳動脈瘤モデルを用い、脳動脈瘤発生増大破裂に関与する因子のうち、主にTNF- α 、Interferonにつぎ、遺伝子、蛋白レベルで解析した。脳動脈瘤動物モデルを用い証明してきた脳動脈瘤発生増大に関わる因子を脳動脈瘤モデル(サル)において分子生物学的、組織学的に解析し、特にマクロファージに着目し、これをMR画像追跡するための組織学的解析を行った。さらに脳動脈瘤の発生増大破裂に対する新規薬物治療法確立を目標とし、ラットモデルにおいて証明してきたstatin製剤、抗炎症剤による薬物治療の効果をラット、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した。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the possible role of TNF- α , Interferon cascades on the development, growth and rupture of cerebral aneurysm in a rat model and performed histological and MR imaging studies in a monkey model. We also evaluated the effect of statins and other anti-inflammatory agents on the development, growth and rupture of experimentally-induced cerebral aneurysms using histological analysis and MR imaging in rat and monkey models.

研究分野：脳血管障害

キーワード：cerebral aneurysm animal model molecular mechanism macrophage MR imaging

1. 研究開始当初の背景

- (1) 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。くも膜下出血の主な原因は、脳動脈瘤破裂である。脳動脈瘤は、剖検での検討によると一般人口の1～5%に認められる頻度の比較的高い疾患であり、その破裂率は最近のUCAS Japanのデータでは年間約1%程度と見積もられている。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増加しているが、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、各症例により適応が検討されている。治療の目的は脳動脈瘤の破裂及びくも膜下出血の予防であるが、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ある。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あげられる。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。
- (2) 本研究では、我々が以前に報告した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の分子機構を解明し新たな治療法を確立することを目的とする。**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** (Sadamasu N et al Stroke 34:2980-2984,2004, Moriwaki T et al Stroke 37:900-905,2006, Sadamasu 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)。
- (3) 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未だ十分には解明されておらず、外科治療が行われている。**外科治療のリスクを考慮すると非外科的治療の開発が望まれるが、有効な薬物治療は存在しない。**
- (4) 本研究では脳動脈瘤の発生増大に血管壁の炎症反応の解析をさらにラビット、サルにおいて進めるとともに、脳動脈

瘤破裂に至る機構の解明とその予防法の確立を目指す。

2. 研究の目的

- (1) 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を主に炎症カスケードに関与する因子について、遺伝子、蛋白レベルで解析し、生体内細胞分子イメージング追跡を用いて明らかにする。**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、サル)**において分子生物学的、組織学的に検証し、さらに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、これを**MR画像追跡**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**新規薬物治療法を確立**することを目標とし、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。

3. 研究の方法

- (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**
現状の血行力学的ストレス誘発による脳動脈瘤モデルにさらに血行力学的ストレスを加え、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。全身血圧上昇としてアンジオテンシン持続腹腔内投与、局所的ストレス増大として両側頸動脈閉塞、炎症反応惹起としてリポポリサッカライド持続腹腔内投与などを計画する。くも膜下出血発症により死亡したラットは剖検にてくも膜下出血の発症を確認する。生存例では動物用マイクロCT、7T-MR (Varian社製 Unity INOVA)を用い定期的にくも膜下出血発症の有無を検出する。ラットを用いて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し、脳動脈瘤形成が画像上で確認された段階で動物を安楽死させ、脳動脈瘤壁における組織学的検討を免疫組織化学的に検討する。のちラビット、サルにおいて同様の画像追跡を行うためのMR条件設定

を検討する。細胞分子マーカーの対象因子として、ラットにおいて関与を証明してきた因子(MMP-2, MMP-9, TIMPs, iNOS, ETB receptor, Cathepsins, NFkB, MCP-1, マクロファージなど)を想定している。また、サルでは薬物投与による脳動脈瘤への影響を画像および組織学的に検討し MR tracking の至適条件を確立する。

(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

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各段階の脳動脈瘤壁を摘出し、遺伝子発現解析を行う。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する。同定した遺伝子群に関してはおのおの定量PCR法により、実際の発現量の変化を解析する。先に解析を行った遺伝子群をターゲットとし、ラット脳動脈瘤摘出標本のRNA解析とともに、抽出したたんぱく質を用い、リン酸化たんぱく質の発現解析を抗体アレイ、ウェスタンブロッティング法などにて解析する。

(3) 脳動脈瘤形成から破裂に至る各段階でのMR画像によるイメージング追跡と分子マーカー検索

先の検討から特に重要と思われる遺伝子、たんぱく質につき実際に脳動脈瘤発生増大破裂と関与するかを検討する。具体的には、各候補因子に対する各種抗体や阻害剤を用い各因子の発現パターンの変化や阻害による脳動脈瘤発生増大破裂の変化をモデル動物および脳動脈瘤壁標本を用い検討する。この検討から発生増大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検討する。解析法として画像によるイメージングを計画している。本研究では本学に設置されている7T-MRを用いて、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捉える計画を立てる。ラット、ラビット、サルのモデルを用い、平成21~23年度において設定したMR画像の至適条件のもと、ラット、ラビット、サルにおいて脳動脈瘤の発生増大破裂に至る過程をMR画像にて追跡し、重要因子につきMR trackingを行う。

脳動脈瘤の発生増大破裂において特に破裂因子の検索は極めて重要である。ここでは破裂に関する分子マーカー検索として、平成21~24年度の継続的研究において同定された、脳動脈瘤の発生増大破裂に深く関係する遺伝子、たんぱく質につき検討を行い、候補となる各遺伝子群およびたんぱく質につき、脳動脈瘤の破裂の段階で発現や活性が上昇することを証明する。評価法としては、血清中でのたんぱく質量を定量化し診断法となりうるか検討する。また、たんぱく質に対する抗体をトレーサーとしてラベルし使用することで非侵襲的に診断することを検討する。必要となる機材については、研究組織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。

(4) 未破裂脳動脈瘤形成増大破裂に対する薬物治療に関する研究

我々は、実際脳動脈瘤増大に関与する因子としてMMP-2,-9を同定しそれに対する阻害薬の投与によりラットにおいて脳動脈瘤の増大が抑制されること(Aoki T et al. Stroke 38:162-169,2007)、脳動脈瘤発生の中心的な役割を果たす分子としてNF-kappaBを同定し、NF-kappaB decoy oligonucleotidesを用いた脳動脈瘤形成抑制(Aoki T et al Circulation116:2830-2840,2007)、MCP-1抑制による脳動脈瘤形成抑制(Stroke 40: 942-951, 2009)を報告してきた。さらに、HMG-CoA reductase阻害剤経口投与が脳動脈瘤増大抑制効果を有し脳動脈瘤の増大を抑制する治療薬となる可能性を示してきた(Aoki T et al Stroke 39: 1276-1285, 2008, Aoki T et al Neurosurgery 64:357-365, 2009)。本研究では、特にHMG-CoA reductase阻害剤のpleiotropic effectおよびTNF阻害剤に注目し、ラットモデルにおける各阻害剤による脳動脈瘤発生増大抑制効果の相違、本研究において確立したラビット、サルモデルにおける同剤の脳動脈瘤形成増大抑制効果につき検討を加える。HMG-CoA reductase阻害剤については最近、他施設から異なったラットモデルにおいて用量、種類による脳動脈瘤抑制効果の違いも報告されており(Tada Y et al Stroke 42:2286-2293, 2011)組織移行性、脂溶性、細胞選択性などに留意しつつ臨床応用を念頭におき、各剤の安全性についても慎重に検討を行う。薬物の効果判定は本研究に関与しない

第三者により行う。

3. 研究成果

(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

カニクイザルを用い脳動脈瘤誘発モデルの作成を行った。5歳前後の雌カニクイザル8匹に対して両側卵巣摘出術、片側腎動脈・総頸動脈結紮術を行い、術後より1.0%食塩水、コラーゲン結合阻害作用を有する0.2%フマル酸アミノプロピオニトリルを投与し、MRIでの画像経過観察を3ヶ月毎に行った。RatでMRAが撮れるかを検討するために、最良のTR、TE、FAなどを検討した結果、gems3d(グラディエントエコー法)というプロトコルで、TR:40、TE:min、FA:45°、average:1、orientation:axial、read out:40、phase:40、PE2:30、slice:1、thickness:15.0mm、RF-coil:rat-headで撮像するとききれいなMRA画像が得られた。同じプロトコルでカニクイザルの撮像を行ったところ、良好な画像が得られず、ICA、眼動脈、BA、などが写っていたが目的であるWillis動脈輪はわからなかったため、同じgems(グラディエントエコー法)の中でTR:40、TE:min、FA:70°、average:2、orientation:axial、Read out:80、Phase:80、slice:32、gap:0、thickness:1.5mm、RF-coil:monkey-headで撮影し、撮った画像を5mmずつずらして重ね合わせる方法で再構築した(図1)。

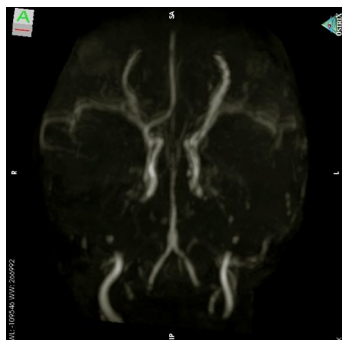


図1

観察期間中、2匹が腸管麻痺により死亡したが、術後24ヶ月経過した時点で生存していた6匹については安楽死させ、脳血管を採取し病理組織学的検討を加えた。術後12ヶ月経過した時点で4匹にMRI上脳動脈瘤が観察できた。その内訳は、前大脳動脈瘤1例、内頸動脈瘤1例、脳底動脈先端部瘤2例であったが、組織学的に脳動脈瘤の形成を認めただのは前大脳動脈瘤の1箇所のみであった。一方画像上脳動脈瘤の形

成は確認できなかったものの組織学的に10箇所脳動脈瘤を認めた。MRIで検出できない程度の小さい動脈瘤がそのほとんどを占めていた。従来の報告例と比較し高率に脳動脈瘤を誘発できた(図2)。MRIを用いた画像評価は従来用いられた脳血管撮影と比べ低侵襲であり有害事象は生じなかった。なお、ラビットのモデルは作成計画段階である。



図2

(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

ラット脳動脈瘤モデルにおいて、次世代シーケンサーを用い脳動脈瘤誘発後の脳血管壁の遺伝子発現を解析した。その結果、炎症性カスケードの複数因子の発現上昇が確認された。特に、NF-kappaB、TNF- α 、Interleukin、Interferonに關与する因子の発現変化が著明に観察された。脳動脈瘤病変部の血管切片を用いた、次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析においては、脳動脈瘤で既に発現の上昇が知られている遺伝子群や各種メディエーターの上昇を認めただけではなく、既に研究の進んでいる腹部大動脈瘤での発現の上昇が示されている各遺伝子群の上昇が確認されている。発現上昇を認めたインターフェロン γ /シグナリング経路の、MX2、OAS3等の遺伝子産物の抗体による免疫染色やウェスタンブロッティング法を行うことにより、脳動脈瘤発生部位で、インターフェロン γ /シグナリング経路が活性化しているかどうかを検討した。また、脳動脈瘤モデルラットに、インターフェロン γ の発現を抑制することが既に知られている薬剤であるポリICを投与して、脳動脈瘤の誘導が抑制可能かどうかを検討した。詳細については省略する。

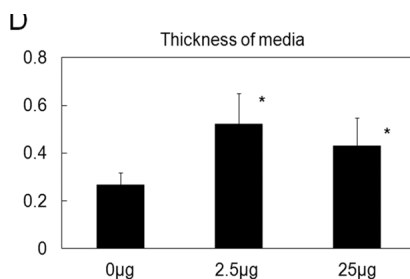
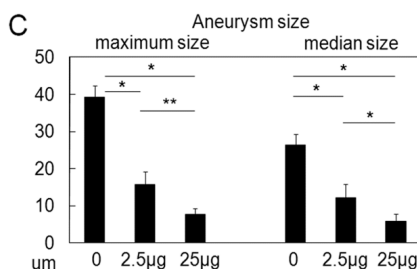
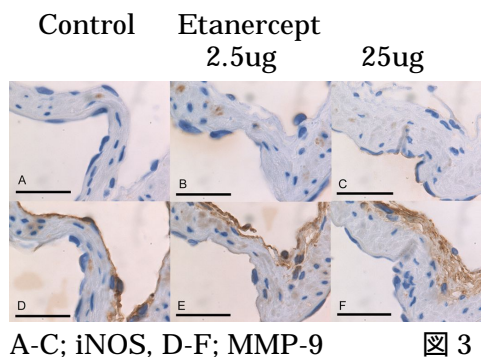
(3) 脳動脈瘤形成から破裂に至る各段階でのMR画像によるイメージング追跡と分子マーカー検索

脳動脈瘤発生増大に関わる因子として細胞で主役となるマクロファージに注目し、MRにおけるマクロファージ

イメージングの可能性につき検討を計画した。ラット脳動脈瘤モデルにおいて、脳動脈瘤に集積するマクロファージを組織学的に確認し、スタチン製剤、その他の抗炎症剤によるマクロファージ浸潤抑制と同時に脳動脈瘤形成の抑制を確認した。次いで、鉄剤 (Ferroxytol) 投与により、鉄が脳動脈瘤壁に沈着すること、鉄沈着が浸潤マクロファージと組織学的に共存することを証明した。さらに鉄沈着と浸潤マクロファージの時間的相関と抗炎症剤によるマクロファージ浸潤抑制効果を検討中である。また、サル脳動脈モデルにおいて、鉄剤 (Ferroxytol) 投与により、鉄が脳動脈瘤壁に沈着すること、鉄沈着が浸潤マクロファージと共存すること、MR を用いた画像化につき検討を進行中である。動物脳動脈瘤モデルにおけるマクロファージイメージング検証をもとにヒト脳動脈瘤におけるマクロファージイメージングの可能性につき臨床研究を計画している。

(4) 未破裂脳動脈瘤形成増大破裂に対する薬物治療に関する研究

先行研究において脳動脈瘤発生増大における NF-kappaB の重要性につき報告している。本研究では、NF-kappaB 経路に密接に関与する TNF- α の役割を検討するために、ラット脳動脈瘤モデルを用いて、TNF- α 抗体 (Etanercept) 投与 (0, 2.5 μ g, 25 μ g; 週 1 回 5 週間) の効果を検討した。用量は先行する他の動物モデルでの使用量を参考に設定した。MMP9、iNOS、IL-1、NF-kappaB、IKK、IKK などの mRNA 発現が有意に抑制され、iNOS、MMP-9 などの蛋白発現も抑制されていた (図 3)。同時に形成される脳動脈瘤の大きさが有意に縮小し (図 4-1) 中膜平滑筋層の非薄化も有意に抑制されていた (図 4-2)。また、ラット脳動脈瘤モデルにおいて、複数の statin 製剤前投与による脳動脈形成抑制効果を確認した。さらにサル脳動脈瘤モデルにおいて、モデル作成術後 12 ヶ月に画像上脳動脈瘤が観察された 4 匹についてはピタバスタチン投与を行った。脳動脈瘤が形成された 4 匹にはピタバスタチンを投与したが、その後画像上は明らかな変化は認めなかった。さらに、炎症に関する薬剤の開発を行っており、ある薬剤においてラットで脳動脈瘤の増大抑制効果があることを確認した。現在、同薬剤をサルの脳動脈瘤モデルを用い、霊長類における効果を検討中である。詳細については省略する。



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 10 件)

Tsuji K, Nozaki K, Aoki T. NF- κ B as a crucial factor for intracranial aneurysm formation and the potential of statins as drugs for intracranial aneurysm treatment through their anti-NF- κ B effect. OA inflammation in press. 査読有

Yokoi T, Saito M, Yoshimura Y, Tsuji K, Nozaki K. Cerebral aneurysms and inflammation. Neuroimmunology and Neuroinflammation 2:55-58, 2015 査読有

Yokoi T, Isono T, Saitoh M, Yoshimura Y, Nozaki K. Suppression of cerebral aneurysm formation in rats by a tumor necrosis factor- α inhibitor. J Neurosurg 120:1193-1200, 2014 査読有

Tsuji K, Aoki T, Fukuda M, Nozaki K. Statins as a candidate of drugs for intracranial aneurysm treatment. Health special issue June 2014 in 'Aneurysm Research' 査読無

Aoki T, Fukuda M, Nishimura M, Nozaki

K, Narumiya S. Critical role of TNF-alpha-TNFR1 signaling in intracranial aneurysm formation. Acta Neuropathol Commun 2(1): 34, 2014 査読有

Yoshimura Y, Murakami Y, Saitoh M, Yokoi T, Aoki T, Miura K, Ueshima H, Nozaki K, for the study group. Statin use and risk of cerebral aneurysm rupture: a hospital-based case-control study in Japan. J Stroke Cereb Vasc Dis 23(2): 343-8, 2014 査読有

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

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 pp.129-135 中外医学社 査読無

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

〔学会発表〕(計 15 件)

辻敬一、野崎和彦. 実験的誘発カニクイザル脳動脈瘤の MRI 追跡及び組織学的検討. STROKE2015. 2015 年 3 月 27 日. 広島

齋藤実、野崎和彦. カニクイザルの MRA 撮影、その実際と工夫. STROKE2015. 2015 年 3 月 27 日. 広島

野崎和彦. 脳動脈瘤モデルを用いた治療法の開発. 第 26 回日本脳循環代謝学会総会. 2014 年 11 月 21 日. 岡山

辻敬一、野崎和彦. 実験的誘発カニクイザル脳動脈瘤の MRI 追跡及び組織学的検討. 日本脳神経外科学会第 73 回学術集会. 2014 年 10 月 11 日 東京

Nozaki K. Possible medical treatments for cerebral aneurysms. The 1st Congress of Neurosurgeons of Uzbekistan. 2014 年 4 月 25 日 Bukhara

野崎和彦. 脳動脈瘤の成因から見た薬物療法の可能性. 第 14 回応用薬理シンポジウム 2012 年 9 月 3 日. 山梨

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

(3) 研究分担者

犬伏 俊郎 (INUBUSHI Toshiro)
滋賀医科大学・分子神経科学研究センター・教務補佐員
研究者番号：20213142

(4) 研究分担者

椎野 顕彦 (SHINO Akihiko)
滋賀医科大学・分子神経科学研究センター・准教授
研究者番号：50215935

(5) 研究分担者

鳥居 隆三 (TORII Ryuzo)
滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・教授
(研究期間 平成 24 年 4 月 1 日 ~ 平成 25 年 3 月 31 日)
研究者番号：50106647

(6) 研究分担者

中村 紳一郎 (NAKAMURA Shinichiro)
滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・准教授
研究者番号：50307980