

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592111

研究課題名(和文) 脳動脈瘤発生、増大、破裂に対するポリフェノールの抑制効果

研究課題名(英文) Prevention for formation and enlargement of cerebral aneurysm by polyphenol

研究代表者

大熊 洋揮 (Ohkuma, Hiroki)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40211099

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：脳動脈瘤の発生、増大を予防するためにポリフェノールの有効性を検討した。脳動脈瘤はウサギを用い、両側頸部頸動脈結紮により作成した。治療群ではアップルポリフェノール40mg/kg/日を経口投与した。非治療群では両側頸部頸動脈結紮後、動脈壁の非薄化、平滑筋の減少、動脈瘤形成が75%でみられた。治療群ではこれらの所見が抑制され動脈瘤形成は13%であった。増大に関しては両側頸部頸動脈結紮3ヶ月後からアップルポリフェノールを3ヶ月間投与し、非治療群と比較した。非治療群の動脈瘤サイズと比較し治療群では有意に増大抑制効果が認められた。以上からポリフェノールは脳動脈瘤の発生、増大抑制効果を有すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate the efficacy of polyphenol for prevention of formation and/or enlargement of cerebral aneurysm. Cerebral aneurysm was induced by ligation of bilateral carotid artery in rabbit. In treatment group, 40mg/kg/day of apple polyphenol was orally administered. In non-treatment group, arterial wall became thin, the number of smooth muscle cells decreased, and cerebral aneurysm was seen in 75% rabbit 3 months after bilateral carotid artery ligation. In treatment group, these findings were suppressed, and aneurysm formation was seen in 13% rabbit. In order to investigate the preventative effect of polyphenol, apple polyphenol was administered for 3 months from 3 months after bilateral carotid artery ligation. The size of cerebral aneurysm in the treatment group was significantly smaller than the non-treatment group. These results suggest that polyphenol has preventative effects on formation and enlargement of cerebral aneurysm.

研究分野：脳神経外科

キーワード：脳動脈瘤 ポリフェノール

### 1. 研究開始当初の背景

脳動脈瘤性くも膜下出血の脳神経外科における治療成績は向上しているが、脳神経外科管理前に死亡する症例も多く、結局、5割前後は予後不良の転帰をとることになる。こうした予後不良例を減少させるためには、発症早期の重症例の脳損傷を軽減することが一法になるが、いまだその方法は開発されていない。従って、予後不良例を減少させる一番の近道は、くも膜下出血自体を撲滅させることであり、この観点から未破裂脳動脈瘤を発見し手術的治療を施すことが広く行われている。我々の集計では未破裂脳動脈瘤の保有率は2.2%であり、特に40才以上を対象とすると4.8%の高率となる。今後の高齢社会化に伴いさらに保有率は増加すると推定される。これに対し、今後脳神経外科医の減少が危惧されており、マンパワーを考慮すると未破裂脳動脈瘤を悉皆的に手術的治療で治療することは不可能と思われる。また、手術自体にも危険性が伴うために、手術により神経学的後遺症をきたすことも懸念しなくてはならない。従って、危険性が少なくより簡便な治療法を考案することが重要な課題となる。理想的には、スクリーニングにより脳動脈瘤を未破裂の状態で見出し、経口剤投与で破裂を予防する、という方式がくも膜下出血の撲滅を図る最も有力な方法であると思われる。

### 2. 研究の目的

未破裂脳動脈瘤に対する経口剤の開発を目的とする。経口剤としては、長期間服用しても副作用が少ないものを選択する必要がある。脳動脈瘤の成因として種々の因子が検討されているが、その中で、フリーラジカルと脂質過酸化反応および炎症が重要な役割を果たすことが最近示されている。この観点から、抗酸化作用を有するエダラボンやスタチン投与の有効性が実験的に示されている。以上のことを踏まえ、臨床応用および長期経口投与という前提を考慮し、抗酸化作用を有する物質のうち最も強力なものの一つであり、かつ副作用が無く長期経口摂取が可能なポリフェノールに着目した。ポリフェノールのうち、今回用いるアップルポリフェノールは自然食品の一つでもあり、ヒトにおける安全性はすでに保証されている。プロシアニジン主成分とし、強力な抗酸化作用を有することも基礎研究で証明されている。我々もくも膜下出血後の脳血管攣縮に対するアップルポリフェノールの予防効果を検討し、脂質過酸化を強力に抑制し、強いラジカルスカベンジャー能力を有することを確認した。本研究の目的はアップルポリフェノールが脳動脈瘤の発生、増大を予防し得るかを検討することである。

### 3. 研究の方法

#### 1) 脳動脈瘤モデルの検討

脳動脈瘤モデルとして以下の2法で検討を行い、脳動脈瘤の発生がより高いモデルを以下の検討に用いることとした。

月齢6ヶ月の雌のJapan white rabbitを用い、両側腎動脈後枝結紮、食塩負荷、片側頸部頸動脈結紮の負荷を加える。モデル作成12週後に、リン酸緩衝4%パラホルムアルデヒド溶液により経心的に灌流固定を行い、脳動脈を摘出する。実体顕微鏡で内頸動脈先端部を観察し、さらに標本をパラフィン包埋し切片を作成しH-E染色、elastica van Gieson染色を施して光学顕微鏡にて観察する。

月齢6ヶ月の雌のJapan white rabbitを用い、両側頸部頸動脈結紮の負荷を加える。モデル作成3ヶ月後に、リン酸緩衝4%パラホルムアルデヒド溶液により経心的に灌流固定を行い、脳動脈を摘出する。実体顕微鏡で脳底動脈先端部を観察し、さらに標本をパラフィン包埋し切片を作成しH-E染色、elastica van Gieson染色を施して光学顕微鏡にて観察する。

#### 2) 脳動脈瘤発生の予防効果の検討

上記の検討で脳動脈瘤形成がより高率であったモデルを用いる。アップルポリフェノールの投与量は、以前の「くも膜下出血後の脳血管攣縮に対するアップルポリフェノールの予防効果の検討」の経験から、10mgまたは40mg/kg/日を1ml溶解液として、注射筒を用い経口にて投与する。モデル作成開始翌日よりアップルポリフェノールの投与を行う。「アップルポリフェノール治療群」、「対照群」(アップルポリフェノール非投与)ともに、モデル作成開始から1週、2週、4週、12週後に、リン酸緩衝4%パラホルムアルデヒド溶液による経心的灌流固定後に脳動脈を摘出する。実体顕微鏡で脳動脈瘤形成の有無を観察し、さらに標本をパラフィン包埋し切片を作成する。組織学的にエラスチンと平滑筋の変化をH-E染色、elastica van Gieson染色で検討し、また、免疫組織学的にMatrix metalloproteinase (MMP)-2、MMP-9を対象に染色し検討する。そして、これら組織学的所見と脳動脈瘤形成の有無を両群において比較検討する。これにより脳動脈瘤の発生に対するアップルポリフェノールの予防効果を検討する。

#### 3) 脳動脈瘤増大の予防効果の検討

脳動脈瘤形成モデル作成開始12週後からアップルポリフェノール投与を12週間行う。アップルポリフェノール投与量は上述の発生予防効果の検討でより有効であった量を用いる。モデル作成開始から24週後に、リン酸緩衝4%パラホルムアルデヒド溶液による経心的灌流固定後に脳動脈を

摘出する。実体顕微鏡で脳動脈瘤形成の有無を観察し、さらに標本をパラフィン包埋し切片を作成する。組織学的にエラスチンと平滑筋の変化を H-E 染色、elastica van Gieson 染色で検討し、また、免疫組織学的に MMP-2、MMP-9 を検討する。そして、これら組織学的所見と脳動脈瘤のサイズの変化をアップルポリフェノール治療群と対照群間において比較検討する。脳動脈瘤のサイズの変化は、パラフィン包埋切片の光学顕微鏡観察下に最大径を計測し、また動脈瘤頸部と動脈瘤高さから体積を計算する。この数値を「脳動脈瘤発生の予防効果の検討」における対照群の 12 週後でみられた脳動脈瘤の数値を比較対照として割合 (%) で分析する。これにより脳動脈瘤の増大に対するアップルポリフェノールの予防効果を検討する。

#### 4. 研究成果

##### 1) 脳動脈瘤モデルの検討

両側腎動脈後枝結紮、食塩負荷、片側頸部頸動脈結紮の負荷では、12 週後に 5 羽中 3 羽に内頸動脈先端部に動脈瘤の形成がみられた。また、手術侵襲により 2 羽が評価期間前に死亡した。1 羽は手術翌日、1 羽は手術 7 日目に死亡した。一方、両側頸部頸動脈結紮の負荷では、12 週後に 5 羽中 5 羽で脳底動脈先端部に動脈瘤の形成がみられた。また、評価期間の 12 週間前に死亡したウサギはなかった。

これらから、両側頸部頸動脈結紮の負荷による動脈瘤形成モデルがより至適であると判断し、以下の検討をこのモデルを用いて行うこととした。

##### 2) 脳動脈瘤発生の予防効果の検討

対照群では、モデル作成 (両側頸部頸動脈結紮) 1 週間後から、H-E 染色、elastica van Gieson 染色で、エラスチンの低下、平滑筋数の低下がみられた (n=4)。また平滑筋における MMP-2、MMP-9 の発現増大がみられた。動脈壁の厚さは変化がみられなかった。2 週間後にはこれらの所見が増強し、かつ動脈壁の軽度菲薄化が認められた (n=4)。また、肉眼所見で脳底動脈が伸展蛇行する所見がみられた。さらに 4 週間後にはエラスチンの低下、平滑筋数の低下が進行し、壁もより菲薄化し、脳底動脈先端部に軽度膨隆がみられた (n=4)。12 週間後にはエラスチンの低下、平滑筋数の低下などの組織学的所見がさらに進行するとともに、膨隆が明瞭化し動脈瘤形成が、8 羽中 7 羽 (88%) でみられた。

これに対し、アップルポリフェノール治療群では、10mg/kg/日投与では、エラスチンの低下、平滑筋数の低下などは軽度抑制された。また、平滑筋における MMP-2、MMP-9 の発現も抑制されたが発現自体は確認された。そして、12 週後の動脈瘤形性は 8 羽中 3 羽 (38%) であった。

アップルポリフェノールを 40mg/kg/日投

与した群では、エラスチンの低下、平滑筋数の低下は著明に抑制された。平滑筋における MMP-2、MMP-9 の発現も著明に抑制され、8 羽中 5 羽では発現が確認されなかった。12 週後の動脈瘤形性は 8 羽中 1 羽 (13%) のみであり、他の 7 羽では脳底動脈先端部の壁の菲薄化は認めなかった。

また 12 週後に形成された脳動脈瘤のサイズに関して、対照群の最大径を 100% とすると、アップルポリフェノール 10mg/kg/日治療群では平均 62% (n=3)、アップルポリフェノール 40mg/kg/日治療群では 34% (n=1) とサイズの縮小化が認められた。

以上から、両側頸部頸動脈結紮モデルでは、脳底動脈瘤の血流増大により shear stress が増大し、様々な組織学的所見の変化が誘導され脳動脈瘤が誘発されることが示唆され、これは同モデルを用いた過去の検討とほぼ同様の所見であった。つまり中膜の過酸化反応により平滑筋における MMP-2、MMP-9 の発現が誘導され、これによりエラスチンの溶解消失が生じ、また中膜の過酸化反応により平滑筋の細胞死による減少が生じることが示唆された。これに対し、アップルポリフェノール治療群ではアップルポリフェノールに含まれるプロシアニジンの強力な抗酸化作用により酸化ストレスにより生じる組織学的変化が抑制されたものと考えられた。それに基づき、脳動脈瘤形成も投与量に従い抑制されることが示された。また、形成されてもサイズが抑制されることも示された。

##### 3) 脳動脈瘤増大の予防効果の検討

対照群では、モデル作成 12 週後の脳動脈瘤のサイズ (上述の脳動脈瘤発生の予防効果の検討での 12 週後のサイズ) と比較し、24 週間後には、最大径は  $148 \pm 23\%$ 、体積は  $338 \pm 128\%$  の増大を示した。また壁の厚さは  $31 \pm 8\%$  に減少し、H-E 染色、elastica van Gieson 染色により検討した平滑筋、エラスチンは動脈瘤壁においてはほぼ消失していた。免疫組織学的に検討した MMP-2、MMP-9 の発現は、平滑筋の消失に伴い、動脈瘤壁では著明に減弱したが、他の動脈壁部分では維持されていた。

これに対しアップルポリフェノール治療群 (上述の脳動脈瘤発生の予防効果の検討結果から 40mg/kg/日を使用) では、モデル作成 12 週後の脳動脈瘤のサイズ (上述の脳動脈瘤発生の予防効果の検討における対照群の 12 週後のサイズ) に比較し、24 週間後 (アップルポリフェノールを 12 週間投与) では最大径は  $108 \pm 17\%$ 、体積は  $124 \pm 32\%$  の増大が認められた。壁厚は  $94 \pm 16\%$  の減少にとどまった。H-E 染色、elastica van Gieson 染色により検討した平滑筋、エラスチンは 12 週間後とほぼ同様に保たれていた。免疫組織学的に検討した平滑筋における MMP-2、MMP-9 の発現は、動脈瘤壁、周囲の動脈壁とともに 12 週間後に比較し抑制された。また、

これらから、対照群での 12 週と 24 週の変

化と比較し、アップルポリフェノール治療群（40mg/kg/日）では、組織学的変化の進行が抑制されるとともに、脳動脈瘤のサイズも軽微な増大が認められるにとどまっていた。従って、アップルポリフェノールは脳動脈瘤の増大抑制効果を有することが示唆された。

以上の結果から、アップルポリフェノールは、脳動脈瘤の発生が危惧される症例、例えば喫煙、高血圧、家族歴を有する症例に対し、予防的に投与を行うことにより、脳動脈瘤の形成が抑制される可能性があることが示唆された。さらに未破裂脳動脈瘤が小さいサイズの段階で発見された症例には、投与することで増大が予防される可能性のあることも示唆された。しかし、軽微ながら増大がみられたことから、増大に対する予防効果が完全とは言えないことも示唆された。

今後、アップルポリフェノールの脳動脈瘤発生・増大抑制の作用機序に関して、血管壁内の過酸化反応をどのように抑制しているのかなどを詳細に解明することで、至適投与量を検討することや、アップルポリフェノール以外の抗酸化作用を有する薬剤の可能性を探ることが可能となると考えられる。こうした追加研究の蓄積により、臨床応用が可能な治療法が開発されることが期待される。

棟方聡 (Munakata Akira)  
弘前大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号：80400159

## 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) 大熊洋揮, SAH 後の新たな管理・治療—病態に関する新知見に基づいた展望—, 日本脳神経外科学会第 72 回学術総会, 2013 年 10 月 16 日～18 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

(2) 大熊洋揮, くも膜下出血の急性期治療の検証と再評価—overall outcome 向上のために残された課題—, 第 39 回日本脳卒中学会総会, 2014 年 3 月 13 日～15 日, 大阪国際会議場 (大阪府・大阪市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大熊洋揮 (Ohkuma Hiroki)  
弘前大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：40211099

### (2) 研究分担者

浅野研一郎 (Asano Kenichirou)  
弘前大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号：90312496

嶋村則人 (Shimamura Norihito)  
弘前大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号：40312491