

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10831

研究課題名(和文) 脳動脈瘤破裂予防を目指したinflammasomeに関する基礎的研究

研究課題名(英文) Inflammasome activation induced rupture of intracranial aneurysms

研究代表者

多田 恵曜 (TADA, Yoshiteru)

徳島大学・病院・特任講師

研究者番号：30547964

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)：炎症関連分子IL-1 やMMP-9の活性化がinflammasome (NLRP3, ASC, Casp-1の複合体)の活性化と関与するため、脳動脈瘤破裂ラットモデルにおいて、脳動脈瘤破裂とinflammasomeとの関連性を調べた。エストロゲン欠乏状態ではエストロゲン受容体 (ER)の発現低下に伴い、inflammasomeの発現増加を認め、脳血管内皮や平滑筋細胞ではエストロゲン欠乏により酸化ストレス関連分子の増加とは逆に、抑制系分子が低下し、結果的にinflammasome構成分子NLRP3の発現が増加することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳動脈破裂によるくも膜下出血(SAH)は、予後が重篤で、寝たきり原因の国内第一位である。予防的治療に外科的治療が行われるが、閉経期以後の女性に発症例が多いが、経過観察を行う場合もあり、多角的な原因究明と有効な薬物治療法が切望されている。本研究では治療標的探索のため、動物実験モデルや細胞実験において、エストロゲン欠乏により、inflammasomeが活性化し、炎症関連分子のIL-1 や、血管を構成するマトリックスの崩壊分子MMP-9が高発現し、エストロゲン受容体の制御によりこれらを制御できる可能性を見出した。またこれらの分子の制御が治療標的となる可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：Subarachnoid hemorrhage (SAH) due to rupture of intracranial aneurysms is catastrophic and the prognosis is poor. To study the relationship among IA rupture, estrogen deficiency, and the activation of NLRP3 inflammasomes we used rat IA model and human brain vascular endothelial- and smooth muscle cells (HBEC, HBSC). The rate of ruptured IAs was higher in ovariectomized hypertensive (OVX+/HT) - than non-ovariectomized hypertensive (OVX-/HT) rats ($p < 0.05$). In OVX+/HT rats, ER α ; but not ER β was reduced and NLRP3 was elevated at the vascular wall prone to rupture, in correlated with an increased mRNA level of NLRP3, IL-1 β and matrix metalloproteinase-9 and a decrease in the mRNA level of Sirtuin (SIRT1). We confirmed the similar changes in HBEC and HBSC under the estrogen deficient conditions. The down-regulation of ER α and SIRT1 by estrogen deficient may contribute to the activation of the NLRP3/IL-1 β /MMP-9 pathway and result in the rupture of intracranial aneurysms.

研究分野：脳神経外科

キーワード：脳 脳動脈瘤破裂 くも膜下出血 エストロゲン欠乏

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳動脈破裂によるくも膜下出血 (SAH) に対する予防的治療としては外科的治療が行われるが、経過観察を行う場合もあり、多角的な原因究明と有効な薬物治療法が切望されている。そこで脳動脈瘤予防に対する有効な薬物治療を確立するために研究代表者は独自に確立したエストロゲン欠乏脳動脈瘤ラットモデルを確立し、脳動脈瘤破裂における炎症性変化との関連性を報告してきている (Yagi, Neurosurgery 2010、Matsushita, Hypertension, 2012、Miyamoto, 2017、JCBFM, Yamaguchi, JNS)。さらに様々な薬効の承認薬を用いて薬物治療効果を検討した結果、降圧薬のミネラルコルチコイド受容体阻害薬の有効性を見出し、臨床においてパイロット試験を行い、9 mm以下の未破裂脳動脈瘤に対して破裂抑制効果が認められることを初めて報告し (J Stroke Cerebrovasc Dis, 2018) 薬物治療の可能性を示唆している。一方、破裂予防のために、破裂にいたる病態を脳動脈瘤破裂モデルにおいて解析し、破裂しやすい血管壁では炎症性反応と関連した IL-1、MMP-9 の高い発現が見られることを報告している。

2. 研究の目的

IL-1 や MMP-9 の活性化は inflammasome (NLRP3, ASC, Casp-1 の複合体) の活性化が関与することから、脳動脈瘤破裂モデルを用いて、脳動脈瘤破裂と inflammasome 活性化の関係を調べるために本研究を行った。

3. 研究の方法

動物モデルでの検討；13 週齢雌性ラットを使用し、両側卵巢摘出によるエストロゲン欠乏、一側総頸動脈結紮による血行動態変化を誘導し、8% の高食塩食給餌により 2 週間飼育後、左右の後腎動脈結紮を 1 週間隔で行い、その間、標準食での飼育により体力の回復を確認後、8% の高食塩で飼育すると、ヒトと類似した前交通動脈 (ICA, Acom) および後交通動脈 (P1, PCA) に 4-10 週後に約 50% の頻度で破裂を認めた。あらかじめ雌性ラットの卵巢摘非摘出群と無処置対照群を用意し、卵巢摘出モデルとの差異を破裂率及び形状変化および免疫組織学的評価により、比較検討した。また未破裂状態での血管壁を摘出し、mRNA レベルでの変化を qRT-PCR で解析し、統計学的な評価を行った。

ヒト脳血管内皮細胞および脳血管平滑筋細胞における検討； inflammasome 活性化に至るメカニズムをさらに解析するため、細胞を通常の条件で培養後、エストロゲン欠乏状態を模倣するために FBS - free の培養液に置換し、24 時間後に変化した IL-1、MMP-9、inflammasome 構成分子 (NLRP3) および酸化ストレスマーカーの変動を western blot 法で解析した。

4. 研究成果

ラット脳動脈瘤モデルにおいて、エストロゲン欠乏状態 (OVX+) で高血圧 (HT) を誘導した OVX+/HT ラットでは脳動脈瘤誘導早期から破裂しやすい脳血管壁における形態変化が電子顕微鏡下で観察され、sham ラットの同部位と較べて明らかな異常が認められた (図 1)。

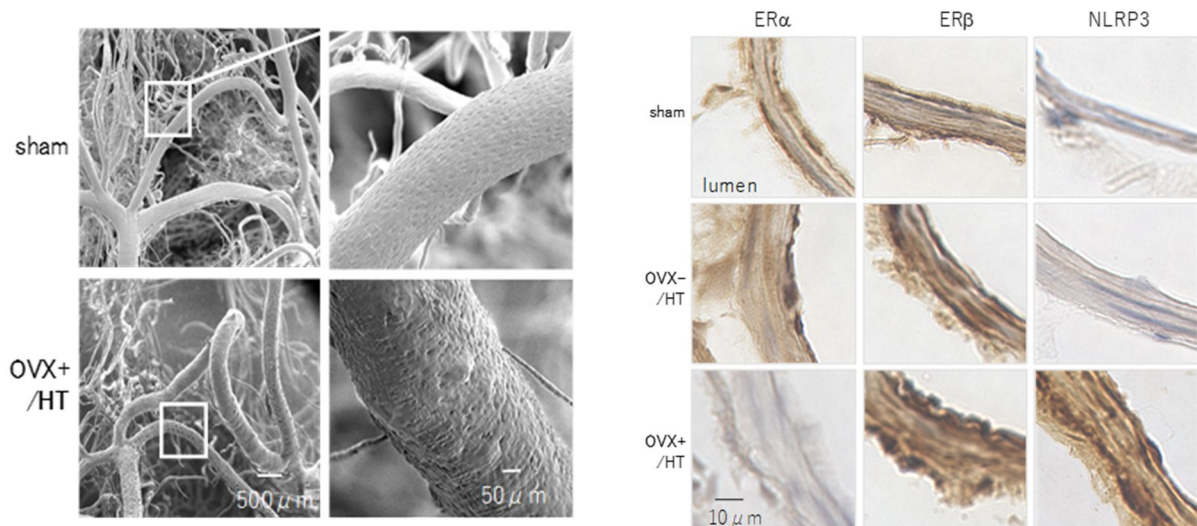


図 1 電子顕微鏡写真

図 2 脳血管免疫染色

この破裂しやすい脳血管はヒト脳動脈瘤の破裂しやすい部位と類似しており、本モデルでの検討の妥当性が示唆された。またエストロゲン存在下で高血圧を誘導した OVX-/HT 脳動脈瘤誘導モデルラットに較べて OVX+/HT では破裂率が高まる結果を得た。このことから、未破裂脳動脈瘤の発生においてエストロゲン欠乏状態が影響するだけでなく、脳動脈瘤破裂にもエストロゲン欠乏が影響することが明らかとなった。

そこでエストロゲン欠乏による脳血管への影響を詳細に検討するため、エストロゲン受容体の役割に着目した。免疫組織学的評価 (図 2) において OVX+/HT ラットの破裂しやすい血管

壁では sham ラットの同部位に較べて脳動脈瘤誘導早期からエストロゲン受容体（ER）の発現が低下しているが、ER への影響はほとんど認められなかった。一方、NLRP3 inflammasome の発現増加を認め、脳動脈瘤破裂血管における早期からの炎症性変化や酸化ストレスとの関連性が示唆された。現在、脳血管内皮細胞や平滑筋細胞においてエストロゲン欠乏状態では酸化ストレスに関連した分子の増加に反して、抑制系の分子が低下することを明らかにしており、結果的に inflammasome 構成分子 NLRP3 の発現増加となることを見出している。途中経過をまとめ、2019 年 2 月に米国で開催された International Stroke Conference で発表しており、現在、論文化に向けて準備を進めている。さらに inflammasome の制御が破裂抑制につながるかどうかについて治療薬を用いて今後検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nagahiro Shinji, Tada Yoshiteru, Satomi Junichiro, Kinouchi Tomoya, Kuwayama Kazuyuki, Yagi Kenji, Nakajima Kohei, Matsushita Nobuhisa, Miyamoto Takeshi, Yamaguchi Tadashi, Shimada Kenji, Korai Masaaki, Mure Hideo, Okayama Yoshihiro, Abe Takashi, Harada Masafumi, Kitazato Keiko T., Kanematsu Yasuhisa	4. 巻 27
2. 論文標題 Treatment of Unruptured Cerebral Aneurysms with the Mineralocorticoid Receptor Blocker Eplerenone Pilot Study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases	6. 最初と最後の頁 2134 ~ 2140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2018.03.008	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Maekawa Hidetsugu, Tada Yoshiteru, Yagi Kenji, Miyamoto Takeshi, Kitazato Keiko T., Korai Masaaki, Satomi Junichiro, Hashimoto Tomoki, Nagahiro Shinji	4. 巻 14
2. 論文標題 Bazedoxifene, a selective estrogen receptor modulator, reduces cerebral aneurysm rupture in Ovariectomized rats	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Neuroinflammation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12974-017-0966-7	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 Yamaguchi Tadashi, Miyamoto Takeshi, Kitazato Keiko T., Shikata Eiji, Yamaguchi Izumi, Korai Masaaki, Shimada Kenji, Yagi Kenji, Tada Yoshiteru, Matsuzaki Yoshihito, Kanematsu Yasuhisa, Takagi Yasushi	4. 巻 -
2. 論文標題 Time-dependent and site-dependent morphological changes in rupture-prone arteries: ovariectomized rat intracranial aneurysm model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 1 ~ 9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3171/2019.6.JNS19777	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 多田恵曜
2. 発表標題 未破裂脳動脈瘤に対する薬物治療の可能性
3. 学会等名 第27回日本脳ドック学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamaguchi Tadashi, Kitazato K, Miyamoto T, Korai M, Shimada K, Tada Y, Kanematsu Y, Satomi J, Nagahiro S, Takagi Y
2. 発表標題 Estrogen deficiency activates inflammasome in a rat model of intracranial aneurysms
3. 学会等名 11th World Stroke Congress 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Miyamoto T, Kitazato K, Tada Y, Shimada K, Yagi K, Korai, Maekawa H, Yamaguchi T, Yoshioka S, Kinouchi T, Kanematsu Y, Satomi J, Nagahiro S
2. 発表標題 Pro-inflammatory Response Elicited by Porphyromonas Gingivalis Lipopolysaccharide Exacerbates the Rupture of Experimental Cerebral Aneurysms
3. 学会等名 International Stroke Conference 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Korai M, Kanematsu Y, Tada Y, Yamaguchi I, Yamamoto N, Yamamoto Y, Satomi J
2. 発表標題 Treatment strategy and outcom of ruptured vertebral artery dissecting aneurysms
3. 学会等名 14TH CONGRESS OF THE WORLD FEDERATION OF INTERVENTIONAL AND THERAPEUTIC NEURORADIOLOGY (国際学会)
4. 発表年 2017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
研究 分担者	兼松 康久 (KANEMATSU Yasuhisa) (90363142)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・准教授 (16101)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	島田 健司 (SHIMADA Kenji) (60624351)	徳島大学・病院・特任講師 (16101)	
研究分担者	高麗 雅章 (KORAI Masaaki) (60794013)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学域）・徳島大学専門 研究員 (16101)	