

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：16101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24013

研究課題名（和文）脳動脈瘤破裂におけるエフェロサイトーシスの役割解明

研究課題名（英文）Role of efferocytosis in intracranial aneurysm rupture

研究代表者

宮本 健志（MIYAMOTO, Takeshi）

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学域）・助教

研究者番号：80585000

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：新規実験計画の立案、実行を行った。遺伝子操作によるエフェロサイトーシス不全を起こしたマウス（ノックアウトマウス）では有意に脳動脈瘤破裂が増加していた。エフェロサイトーシス不全は脳動脈瘤破裂を増加させることが示せた。今後はヒトおよび動物の検体を用いてエフェロサイトーシスおよびその阻害因子、促進因子を同定し、背景にある分子機構を解明する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳動脈瘤は破裂するとくも膜下出血をきたす。治療には手術しかなく、薬物による破裂予防は確立されていない。破裂に至る機序は明らかにすることで、将来的に薬物療法を確立出来る可能性がある。エフェロサイトーシスは細胞死の中でもアポトーシスを起こした細胞を処理する機構である。この死細胞除去機構の異常により、脳動脈瘤破裂を促進させる可能性があると考えた。もし、この仮説が証明できれば、脳動脈瘤を薬物的に治療する方法の一つとなり得る。

研究成果の概要（英文）：We have planned a new experiment. We used efferocytosis deficiency mice and observed increased rupture rate. We have demonstrated that efferocytosis deficiency enhance aneurysm rupture. We will do further experiments using human and animal samples to elucidate the mechanism.

研究分野：脳動脈瘤

キーワード：脳動脈瘤 アポトーシス エフェロサイトーシス

1. 研究開始当初の背景

脳動脈瘤破裂によるくも膜下出血の発生率は世界的に 10 万人当たり 9.1 人であり、発症後 30 日以内の死亡率は 45% と非常に高い。くも膜下出血患者の 30% は自立生活が困難であり、社会および医療経済への影響は大きい。現在、未破裂脳動脈瘤に対する破裂予防は手術以外の方策は確立されておらず、新たに薬物治療が切望されている。

2. 研究の目的

本研究では、(1) エフェロサイトーシス (アポトーシス細胞除去機構) に着目し、脳動脈瘤破裂との関連性を調べる。また、(2) エフェロサイトーシスの改善が脳動脈瘤破裂予防に寄与することを明らかにし、薬物による治療標的としての可能性を探求する。

3. 研究の方法

脳動脈瘤の形成、増大、破裂には脳血管のリモデリング機構の異常や炎症が関与していることが示唆されているが、詳細な分子機構は明らかでない。血管壁のリモデリングは細胞の遊走、増殖、細胞死 (アポトーシス) の結果と考えられる。

アポトーシスを起こした細胞は細胞質側に内在するホスファチジルセリン (PS) を細胞膜上に露出させる。この PS を貪食細胞が認識し、貪食される。これら一連のアポトーシス細胞の除去機構はエフェロサイトーシスと呼ばれる。アポトーシス細胞は、貪食細胞により除去され、炎症を誘導しないと考えられてきた。しかし、エフェロサイトーシス機構が低下すると、貪食されなかったアポトーシス細胞は二次的なネクローシスを起こし、炎症を誘導する。

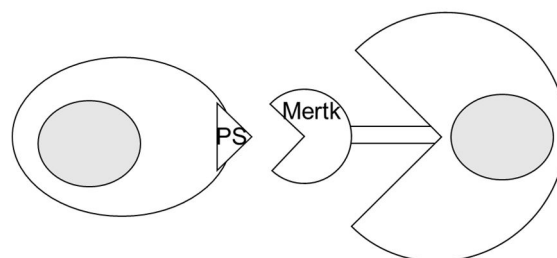
貪食細胞側の受容体は PS を認識する MERTK

分子が主に担っている (図 1)。MERTK は ADAM17

図 1 アポトーシス細胞

貪食細胞

によって切断されることで、エフェロサイトーシス不全を起こす。また、正常細胞には CD47 が発現することで、貪食細胞からの認識を逃れている。このことから、CD47 は Don't eat me signal と呼ばれる。CD47 はアポトーシス細胞では発現が低下するため、貪食を妨げない。しかし、炎症下では CD47



が残存することで、正常なアポトーシス細胞の除去を阻害していることが明らかになってきた。つまり、異常な炎症下では MERTK の発現低下及び CD47 の残存が起こるため、エフェロサイトーシス不全を起こし、更に炎症を増悪させると予想される。

動脈硬化、悪性腫瘍、自己免疫疾患においてエフェロサイトーシス不全が報告されている。破裂脳動脈瘤ではアポトーシス細胞の増加が報告されているが、その病的意義やエフェロサイトーシス不全との関連は明らかでない。研究代表者は、エフェロサイトーシス不全が脳動脈瘤の形成および破裂に関与していると仮定し、本研究を計画した。

実験方法

破裂脳動脈瘤において、アポトーシス細胞および貪食細胞の動態を調べる。

実験 1. ヒト脳動脈瘤組織においてエフェロサイトーシス不全を同定する。

手術で採取した脳動脈瘤組織切片を CD68 (マクロファージ) と Cleaved Caspase 3 (アポトー

シス)で免疫染色し、遊離アポトーシス細胞(マクロファージに貪食されていないアポトーシス細胞)を計測する。破裂脳動脈瘤では遊離アポトーシス細胞が増加していることを同定し、破裂脳動脈瘤におけるエフェロサイトーシス不全を証明する。また、エフェロサイトーシス不全の原因として、破裂脳動脈瘤中の MERTK 分子の発現低下やアポトーシス細胞に CD47 発現が残存することを同定する。

実験 2. 薬物によるエフェロサイトーシスの阻害は脳動脈瘤破裂率を上昇させるか。

脳動脈瘤動物モデルに対して、アポトーシス細胞を貪食する受容体の阻害薬(MERTK 阻害薬)投与の有無で脳動脈瘤の破裂率を比較する。CD68 と Cleaved Caspase 3 で免疫染色し、脳血管壁における遊離アポトーシス細胞を比較する。RT-PCR で、脳血管壁の炎症関連分子の mRNA 発現を比較する。

実験 3. 遺伝子操作によるエフェロサイトーシスの阻害は脳動脈瘤破裂率を上昇させるか。

アポトーシス細胞を貪食する受容体を欠損したマウス(MERTK 欠損マウス)と野生型マウスを用いて、脳動脈瘤の破裂率を比較する。評価項目は実験 2 と同様である。

実験 4. 遺伝子操作によるエフェロサイトーシスの阻害機構の抑制は脳動脈瘤破裂率を低下させるか。

アポトーシス細胞を貪食する受容体が切断されないマウス(MERTK 切断耐性マウス)と野生型マウスを用いて、脳動脈瘤の破裂率を比較する。評価項目は実験 2 と同様である。

4. 研究成果

令和元年度から 2 年度にかけて研究環境の整備、動物や試薬、器具等の購入、データの整理、新規実験計画の立案、実行を行った。当初の予想通り、遺伝子操作によるエフェロサイトーシス不全を起こしたマウス(ノックアウトマウス)では有意に脳動脈瘤破裂が増加していた。ノックアウトマウスと野生型のマウスの血圧を比較したところ、2 群間で DOCA 誘発性高血圧に有意差はなかった。血圧に関係なく、遺伝子的差異が脳動脈瘤破裂を増加させたと考えられた。エフェロサイトーシス不全は脳動脈瘤破裂を増加させることが示せた。今後はヒトおよび動物でエフェロサイトーシスを同定し、背景にある分子機構を解明する予定である。ヒト脳動脈瘤血管壁を用いて、免疫組織化学染色や免疫蛍光染色を行っている。過去の文献を参考にして、Cleaved Caspase 3、TUNEL 染色を行っているが、特異的な反応は得られていない。今後も抗体や染色条件の変更など、至適条件を検討中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shotaro Yoshioka, Takeshi Miyamoto, Junichiro Satomi, Yoshiteru Tada, Kenji Yagi, Kenji Shimada, Koji Naruishi, Eiji Shikata, Izumi Yamaguchi, Tadashi Yamaguchi, Masaaki Korai, Yoshihiro Okayama, Masafumi Harada, Keiko T. Kitazato, Yasuhisa Kanematsu, Shinji Nagahiro, Yasushi Takagi	4. 巻 1
2. 論文標題 Disequilibrium of Plasma Protease/Anti-Protease Due to Severe Periodontal Disease Contributes to Human Subarachnoid Hemorrhage	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurosurgery Open	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） 10.1093/neuopn/okaa007	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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------