

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17929

研究課題名(和文)脳動脈瘤破裂機序の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of rupture of intracranial aneurysm

研究代表者

宮田 悠 (Miyata, Haruka)

滋賀医科大学・医学部・客員助教

研究者番号：40869749

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：モデル動物の脳動脈瘤壁の網羅的遺伝子発現解析を行い、破裂における好中球の関与が示唆された。モデル動物に対するG-CSF投与にて病変部に浸潤する好中球を増加させると、脳動脈瘤自然破裂も有意に増加した。破裂瘤標本において、好中球浸潤は壁のvasa vasorum近傍に多く、Hypoxyprobeを用いたin vivoでの組織低酸素の検出では脳動脈瘤外膜における低酸素状態の存在を確認した。免疫染色にて同部位におけるFGF2、VEGFの発現を認めた。動脈瘤外膜の低酸素刺激がFGF2、VEGFを誘導し、血管外膜におけるvasa vasorum増生、浸潤した好中球が破裂を惹起するという病態が推定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳動脈瘤の破裂機序はこれまでほぼ解明されておらず、未破裂脳動脈瘤に対しての治療介入は外科治療しか選択肢が存在せず、内科治療の創出がunmet medical needとなっている。一方、破裂機序が解明されれば、脳動脈瘤破裂予防に対する薬物治療を創出する可能性がある。本研究で明らかになった好中球などの炎症を脳動脈瘤壁局所で制御できれば、脳動脈瘤破裂を予防できる可能性があり、社会的意義があるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Comprehensive gene expression analysis of the wall of intracranial aneurysms in model animals suggested the involvement of neutrophils in aneurysmal rupture. Spontaneous rupture of intracranial aneurysms was also significantly increased when neutrophil infiltration of the lesion was increased by G-CSF administration to the model animals. In ruptured aneurysm specimens, neutrophil infiltration was predominantly near the vasa vasorum of the wall, and in vivo detection of tissue hypoxia using Hypoxyprobe confirmed the presence of hypoxia in the outer membrane of cerebral aneurysms. Immunostaining showed the expression of FGF2 and VEGF in the same region. We hypothesized that hypoxic stimulation of the aneurysmal adventitia induces FGF2 and VEGF, which in turn induce vasa vasorum growth in the adventitia and rupture of the infiltrated neutrophils.

研究分野：脳動脈瘤

キーワード：intracranial aneurysm rupture

1. 研究開始当初の背景

くも膜下出血は、高い死亡率・後遺症率を有する重篤な疾患であり、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、日本人の破裂率はUCAS Japanのデータでは年間約1%で、欧米に比べて高い(Morita A et al. N Engl J Med. 366:2474-2482,2012)。近年、未破裂脳動脈瘤の症例が発見されることが急増しているが、現時点での未破裂脳動脈瘤の治療手段は、侵襲を伴う外科的治療(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等)のみで、患者および社会的負担も大きい。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、各脳動脈瘤の破裂率を治療前に正確に予測することは困難である。これは、脳動脈瘤が破裂に至る病態や関与する因子が未だ不明であるためである。我々は先行研究において、ラットの脳動脈瘤の発生増大には血管壁のマクロファージを中心とした炎症反応と血管壁の力学応答が深く関与すること(Miyata H et al. Neurol Med Chir (Tokyo). 59:19-26,2019, Miyata H et al. PLoS One. 12:e0175421,2017, Shimizu K et al. J Neuropathol Exp Neurol. 78:798-807,2019, Aoki T et al. Sci Rep. 9:10387,2019, Koseki H et al. Transl Stroke Res.2019 in press, Yamamoto R et al. Br J Pharmacol. 174:2085-2101,2017, Aoki T et al. No Shinkei Geka. 46:275-294,2018)、また、脳動脈瘤の破裂には血管壁の器質的変化と炎症反応の関与が示唆されること(Miyata H et al. J Neurosurg. 16:1-11,2019)を報告し、モデル動物における検証実験を行ってきた。このように脳動脈瘤の発生・増大のメカニズムに比して、破裂に至る機構については未解明の部分が多く、各脳動脈瘤の破裂危険性の予知や侵襲の小さな薬剤治療開発のためには、脳動脈瘤破裂に至る機構の解明が重要である。

2. 研究の目的

先に我々は既存の実験的脳動脈瘤誘発モデル動物に対して改良を行い、くも膜下出血を自然発症するモデル動物を開発した(Miyata H et al. J Neurosurg. 16:1-11,2019)。当モデル動物は、破裂脳動脈瘤・未破裂脳動脈瘤ともヒト脳動脈瘤と極めて類似した病理学的所見を有し、脳動脈瘤の自然破裂モデル動物として妥当であることを示した。また、このモデル動物を使用して脳動脈瘤破裂と脳動脈瘤壁の器質的変化に関連がみられることを報告した。特記すべきこととして、本モデル動物は破裂危険性の異なる2種類の脳動脈瘤を自然誘発することができるという利点を有する。破裂危険性の高い脳動脈瘤を破裂前に標本採取し破裂危険性の低い瘤と比較解析することで、破裂による影響を排除して解析できるという、他のモデル動物やヒト標本の解析では取得できない利点がある。本研究はこのモデル動物を用い、脳動脈瘤における血管壁の器質的変化を惹起するメカニズムを解析し、その器質的変化が誘導する血管壁の炎症反応・退行性変化の詳細を解析することで脳動脈瘤破裂を制御する機構を解明し、新たな薬物治療法の開発につなげるためのトランスレーショナルリサーチを行うことを目的とする。また現在、未破裂脳動脈瘤のうちどの症例が破裂の危険が高く、侵襲的であるにしろ外科的加療が必要かを判断する客観的根拠は存在しない。そのため、過剰な医療介入や破裂高危険症例の見逃しなど多くの問題が存在する。くも膜下出血を自然発症するモデル動物を用いた我々の検討により、脳動脈瘤破裂を制御する因子が解明

されれば、分子マーカーとしての応用から、多数の未破裂脳動脈瘤症例から破裂の高危険度群を抽出することができ、適切な医療介入につながることを期待される。また、本研究から破裂と関与する機構が解明されれば、それらの機構を抑制する新たな非侵襲的な治療法・予防法の開発の可能性があり、脳動脈瘤の破裂およびくも膜下出血の発症を抑制でき社会的負担を軽減できる可能性が期待される。

3. 研究の方法

本研究計画では、我々の先行研究を進展させ脳動脈瘤壁の器質的变化を誘導する因子及び誘導された vasa vasorum の形態的特徴や役割、器質的变化に伴う瘤壁での炎症反応・退行性変化促進の主体を解明するとともに破裂予防のための治療法の標的候補因子の抽出と検証を行う。

脳動脈瘤自然破裂モデル動物を用いた脳動脈瘤壁器質的变化の病態解析

本研究計画では、脳動脈瘤自然破裂モデル動物を使用する。本モデル動物では破裂瘤において有意に血管壁の器質的变化 (vasa vasorum 形成) が認められ、Fgf2 の発現と関連することを我々はすでに報告している (Miyata H et al. J Neurosurg. 16:1-11, 2019)。これらの変化を惹起する因子として、具体的には血管壁における虚血・低酸素応答が関連している可能性を検討する。このため、脳動脈瘤病変と正常血管の間での発現変動遺伝子の抽出、低酸素応答関連因子の脳動脈瘤標本の免疫染色、Hypoxyprobe を用いた in vivo での組織低酸素の検出を行い、脳動脈瘤壁の器質的变化を惹起する候補因子について検討する。これらの因子の中から、vasa vasorum 形成を反映する分子マーカーを探索、破裂危険性を予測する質的診断法開発へつなげる。さらに抽出された因子に対して、動物モデルにおいて薬理学的阻害実験ないしは賦活実験を行い、脳動脈瘤壁の vasa vasorum 形成の抑制や誘導が得られるか、ひいては脳動脈瘤破裂の抑制や誘導が達成しうるかを検討する。また本来、生理的には頭蓋内血管に vasa vasorum は存在しない。脳動脈瘤壁での vasa vasorum の形成が血管腔内から発生する vasa vasorum interna か、外膜側から発生する vasa vasorum externa であるかについても検討する。血管新生の薬剂的な抑制を行うに際して、血中からの薬剤投与が好ましいか、あるいは髄液中からの薬剤投与が有効であるかを検討するためにも重要な観点であると考え。具体的には、脳動脈瘤モデル動物に生体で使用可能な蛍光標識レクチン (トマトレクチン) を投与し内皮細胞を標識した上で病態各段階の脳動脈瘤標本を摘出し、多光子顕微鏡を用いた観察で脳動脈瘤および外膜血管 (vasa vasorum) の構造を 3 次元画像で再構築し、脳動脈瘤壁の vasa vasorum の起源を同定する。また近年、ガドリニウム造影剤を用いた MRI での脳動脈瘤の vessel wall enhancement に関する報告が散見され、ガドリニウムの造影効果と脳動脈瘤の破裂危険性が相関するとされている。血管壁が造影効果を受ける機序の可能性として、脳動脈瘤の血管内皮機能の低下、vasa vasorum からの造影、炎症細胞の取り込みが考えられる。この可能性にアプローチするため、モデル動物にエヴァンスブルーを投与した後、脳動脈瘤標本を摘出し共焦点顕微鏡で観察し透過性亢進部位を同定することで血管外漏出の主座を確認する。

脳動脈瘤自然破裂モデル動物を用いた脳動脈瘤壁の炎症反応・退行性変化促進因子の解析

器質的变化を生じた脳動脈瘤が高度な退行性変化を生じることで破裂に至るという仮説を検証するため、前項と同様、脳動脈瘤自然破裂モデル動物を用いて検討を行う。同モデル動物には前大脳動脈-嗅動脈分岐部の脳動脈瘤と、前交通動脈・後交通動脈の脳動脈瘤の 2 種

類が誘発される。後者は誘発された瘤のうち約半数が自然破裂を起こす一方、前者は破裂しない性質を有している。破裂脳動脈瘤を直接解析すると破裂による影響が artifact とし結果に含まれる可能性があるという懸念がある。我々の開発した脳動脈瘤自然破裂モデル用いれば、破裂しない性質を有する前大脳動脈-嗅動脈分岐部瘤をコントロールとして、未破裂の前交通動脈・後交通動脈瘤を比較解析することで破裂に至る機構を解明することができる。すでに我々は上述のモデル動物脳動脈瘤標本の網羅的遺伝子発現解析を行い、脳動脈瘤はマクロファージ依存的な慢性炎症性疾患であることが知られているが発現変動遺伝子の中には、炎症細胞として好中球に関連したものが多数存在するという結果を得ている。すなわち脳動脈瘤の破裂に至る機構においてはマクロファージに加えて好中球の関与する炎症反応が重要である可能性が示唆されている。さらに脳動脈瘤自然破裂モデルを用いて、G-CSF 投与による好中球過剰状態でも膜下出血の増加が惹起されるという実験結果も予備的に得ており好中球の破裂への寄与が想定される。今後、病変における好中球が血管壁に退行性変化を生じさせるメカニズムについて、好中球自体が分泌する蛋白分解酵素の影響、好中球細胞外トラップの関与、好中球のサイトカイン分泌によりマクロファージなど他種の炎症細胞の活性化などの可能性の関与について、病理組織の免疫染色等での解析や初代培養好中球ないしは細胞株を用いた細胞実験で検討する。

上記一連の検討で明らかとなった因子について創薬標的の候補となる因子を抽出し、脳動脈瘤の自然破裂抑制につながるかをモデル動物で検討する。

4 . 研究成果

モデル動物の脳動脈瘤壁の網羅的遺伝子発現解析を行い、破裂における好中球の関与が示唆された。モデル動物に対する G-CSF 投与にて病変部に浸潤する好中球を増加させると、脳動脈瘤自然破裂も有意に増加した。破裂瘤標本において、好中球浸潤は壁の vasa vasorum 近傍に多く、Hypoxyprome を用いた in vivo での組織低酸素の検出では脳動脈瘤外膜における低酸素状態の存在を確認した。免疫染色にて同部位における FGF2、VEGF の発現を認めた。動脈瘤外膜の低酸素刺激が FGF2、VEGF を誘導し、血管外膜における vasa vasorum 増生、浸潤した好中球が破裂を惹起するという病態が推定された。

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 Mika Kushamae, Haruka Miyata, Manabu Shirai, Kampei Shimizu, Mieko Oka, Hirokazu Koseki, Yu Abekura, Isao Ono, Kazuhiko Nozaki, Tohru Mizutani, Tomohiro Aoki	4. 巻 10
2. 論文標題 Involvement of neutrophils in machineries underlying the rupture of intracranial aneurysms in rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20004
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-74594-9.	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Mika Kushamae, Tomohiro Aoki, Haruka Miyata, Kazuhiko Nozaki, Tohru Mizutani
2. 発表標題 Neutrophils Infiltrating Through Vasa Vasorum Facilitate Rupture Of Intracranial Aneurysms
3. 学会等名 International Stroke Conference 2020（国際学会）
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------