

機関番号：16101

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21390412

研究課題名 (和文) 脳動脈瘤増大・破裂における分子機構と薬物制御

研究課題名 (英文) Pathogenic molecular mechanisms in the formation and rupture of cerebral aneurysm and impact of drug treatment

研究代表者

永廣 信治 (NAGAIHIRO SHINJI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：60145315

研究成果の概要 (和文)：

雌ラットに脳動脈瘤を誘発し、高血圧やエストロゲン欠乏状態が脳動脈瘤形成および増大に及ぼす分子機序の解明と、薬物治療による脳動脈瘤壁の安定化の可能性、機序を検討した。酸化ストレスや炎症関連分子によって血管壁が崩壊することで脳動脈瘤形成にいたる可能性を示した (J Hypertension, 2010)。脳動脈瘤の形成・増大に炎症や酸化ストレスが強く影響することを示した (J Hypertension, 2009, Neurosurgery, 2009)。さらに脳動脈瘤抑制には RAS に加えて mineralcorticoid receptor (MR) の抑制が重要であり、かつ脳動脈瘤形成において高血圧よりエストロゲン欠乏と、体内塩分貯留が強い影響を及ぼす可能性が示唆された (Hypertension, 2009)。

研究成果の概要 (英文)：

The pathogenesis of cerebral aneurysm is multifactorial. To elucidate on how to generate, grow, and rupture, we establish a reproducible aneurysmal model in estrogen deficient female rats. Using this model, we first demonstrated that the reduction of tight junction protein induced by oxidative stress and inflammatory led to the degradation of endothelial gap, thereby facilitating the infiltration of macrophages into the aneurysmal wall. The increase in macrophage promotes inflammation, directed to vice cycle, resulting in the growth and rupture of cerebral aneurysm. To assess whether some drugs are possible to inhibit the formation and growth of cerebral aneurysms, we used an angiotensin type I receptor a blockade, phosphodiesterase 4 inhibitor, 17 β -estradiol in hormonal replacement therapy and a mineralcorticoid receptor antagonist. These drugs were effective to prevent the formation of cerebral aneurysms and the mechanism underlying the effects by these drugs associated with anti-oxidative and anti-inflammatory. On the other hand, statins exerted diverse effects; beneficial and deleterious effects. Notably, a high dose statin and a lipophilic statin induced rupture. Furthermore, we found new evidence that the combination of estrogen deficiency and high salt intake is exclusively associated with the formation of cerebral aneurysm. In the further study, we will verify the relationship between high salt intake and cerebral aneurysms.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2009年度 | 7,200,000 | 2,160,000 | 9,360,000 |
| 2010年度 | 6,200,000 | 1,860,000 | 8,060,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 13,400,000 | 4,020,000 | 17,420,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：脳動脈瘤、タイトジャンクション蛋白、mineral corticoid receptor、phosphodiesterase、血管内皮障害、angiotensin II、エストロゲン、炎症

1. 研究開始当初の背景

脳動脈瘤壁の構造や機能に関する組織学的研究は国内外で広く行われてきたが、その治療や予防に関連づけた実験的研究は少ない。実験脳動脈瘤モデルが日本で開発された（橋本のモデル）こともあり、実験的研究は主に日本国内で行われ、世界に向けて多くの情報を発信してきた。さらに卵巣摘出というエストロゲン欠乏状態で脳動脈瘤の発生（図1）や内皮細胞機能、血管壁の不安定化機序などを検討する研究は（J Neurosurg. 2005, 103: 1052-7, J Neurosurg. 2007, 107: 405-411）我々のグループのオリジナルであり、国内外にも例はない。

実験脳動脈瘤モデルで、動脈瘤の形成過程におけるマクロファージ浸潤によるMMP-9発現が血管壁の脆弱化に関与していることが示唆されているものの、エストロゲン欠乏モデルでの研究はなく、血管壁へのマクロファージ浸潤経路の検討もなされていない。さらに、炎症性変化に関連した白血球接着因子、タイトジャンクション、酸化ストレスなどの関与は明らかでなく、脳動脈瘤の発生、増大を制御する上で詳細な分子機構を明らかにすることが必要である。

2. 研究の目的

雌ラットにおいて脳動脈瘤の誘発には高血圧及びエストロゲン欠損が重要であることを示し（J Neurosurg. 2005; 103: 1046-51.）、脳動脈瘤の形成、増大にマクロファージなどの炎症細胞が大きく関与していることを確認している（J Neurosurg. 2007, 107: 405-411）。血管壁にマクロファージが浸潤するためには、高血圧やエストロゲン欠損によって酸化ストレスが上昇し、これによってタイトジャンクション蛋白が減少し、血管内皮の間隙が拡大することによって、その間隙より炎症細胞が浸潤すると推察される。さらにこれらの炎症細胞によるMMP-9発現が脳動脈瘤壁の退行性変化に関与すると想定した。血管内皮での病態変化に着目し、脳動脈瘤形成とこれらの関係を明らかにするために抗炎症、抗酸化あるいは血管内皮保護作用を持つと考えられる薬剤をラット脳動脈瘤モデルに投薬し、脳動脈瘤の抑制が可能かどうかを未治療ラットと比較することにより、脳動脈瘤の形成、増大、破裂にいたる分子機構を明らかにし、ヒトにおける薬物治療の開発へと結びつけるのが本研究の目的である。

3. 研究の方法
ラット脳動脈瘤モデルを用い、高血圧やエストロゲン欠乏状態が脳動脈瘤形成および増大に及ぼす分子機序の解明と、薬物治療による脳動脈瘤壁の安定化の可能性、機序を検討する。

a) 血管内皮、接着因子、炎症性因子、酸化ストレス、タイトジャンクション蛋白、apoptosisの脳動脈瘤発生、増大における役割

ラット脳動脈瘤モデルを用い、脳動脈瘤形成過程に応じた形態変化から3つに分類した各ステージにおける接着因子（ICAM-1, VCAM-1, P- and E-selectin）、酸化ストレス（Nox4, p22phox, Rac1）、タイトジャンクション蛋白（occludin, ZO-1）、apoptosis関連蛋白（caspase-3, Bcl-2, Bax）発現を免疫染色で評価する。走査型および透過型電子顕微鏡においても各ステージで形態学的変化を評価する。上記のmRNA発現について定量RT-PCRにより評価する。

●免疫組織学的に脳動脈瘤壁では接着因子の発現、酸化ストレスの上昇、タイトジャンクション蛋白（occludin, ZO-1）の発現低下とマクロファージの浸潤、MMP-9の発現、eNOSの発現低下等が観察された。また電子顕微鏡での観察において、血管内皮の形態学的変化、血管内皮の間隙形成やその間隙からの炎症細胞の浸潤が確認できている。

●ヒト血管での検討

当施設での開頭クリッピング術施行例のうち同意が得られた場合に採取し、対照例の脳血管は外傷または脳腫瘍において脳葉切除が必要な症例から採取する。ヒトとラット脳動脈瘤壁の比較を行う。

b) 脳動脈瘤形成、増大における骨髄前駆細胞の役割

我々はヒトの脳動脈瘤壁におけるBTEB2/FLK-5（転写因子）の発現による検討から、合成型平滑筋細胞は未破裂脳動脈瘤壁において増加しているが、破裂脳動脈瘤壁では認められず、合成型平滑筋細胞は脳動脈瘤壁の安定化に関連している可能性を示唆した。佐田らはマウス大腿動脈拡張後の再狭窄における合成型平滑筋細胞は骨髄前駆細胞



図 1. 形成された脳動脈瘤

由来であることを証明した (Nat Med. 2002)。これらのことより、脳動脈瘤壁における合成型平滑筋細胞は、同様に骨髄前駆細胞由来である可能性が考えられた。この場合、脳動脈瘤壁の修復に関わっている可能性もあるため検討を行う。

C) 薬物による脳動脈瘤形成、増大の制御 (ホルモン補充療法; HRT, アンジオテンシン I 型受容体拮抗薬; ARB, PDE-4 阻害剤; ibudilast, 選択的ミネラルコルチコイド受容体拮抗薬; エプレレノン)

脳動脈瘤モデルに血管の鋳型 (vascular corrosion cast) を作製し、血管内皮の形態学的変化から脳動脈瘤形成の過程を 4 ステージ分類した。このモデルに 17β -estradiol によるホルモン補充療法 (HRT) を行い、脳動脈瘤形成が抑制されることを報告した。さらに ARB (投稿中), PDE-4 inhibitor, 選択的ミネラルコルチコイド受容体拮抗薬であるエプレレノンを投薬することによって、脳動脈瘤抑制効果を認めた。これらの薬剤による脳動脈瘤抑制の機序を、上記の血管内皮機能、接着因子、炎症、酸化ストレス、タイトジャンクション蛋白、MMP-9 等との関係を調べることにより明らかにする。また、原発性アルドステロン症 (primary aldosteronism; PA) の患者と本態性高血圧症の患者を比較した場合、血圧値が相対的に低いにもかかわらず PA 患者において脳血管障害の発症リスクが高いことが報告されている。脳動脈瘤モデルラットに対し、血圧に影響を与えない量のエプレレノンで脳動脈瘤を抑制したことから、脳動脈瘤形成におけるミネラルコルチコイド受容体の関与が推察されるのでさらに検討を加える必要がある。脳動脈瘤の増大、破裂を予防できる薬物を探求し、有効性の高い薬剤を用いた臨床試験を予定する。

4. 研究成果

高血圧やエストロゲン欠乏状態が脳動脈瘤形成および増大に及ぼす分子機序の解明と、薬物治療による脳動脈瘤壁の安定化の可能性、機序を検討するために雌ラットに脳動脈瘤を誘発した。

動脈瘤の形成・増大過程における血管内皮の tight junction 蛋白の occludin や ZO-1 の低下がマクロファージの血管壁への浸潤を亢進し、酸化ストレスや炎症関連分子によって血管壁が崩壊することで脳動脈瘤形成にいたる可能性を示した (J Hypertension, 2010)。さらに抗炎症、抗酸化あるいは血管内皮保護作用を示す可能性のある薬剤 (エストロゲン補充療法, angiotensin II type 1 receptor, phosphodiesterase 4 inhibitor) をラット脳動脈瘤モデルに投薬し、脳動脈瘤の形成・増大抑制作用を検討すると抑制効果がみられ、

脳動脈瘤の形成・増大に炎症や酸化ストレスが強く影響することを示した (Neurosurgery, 2009, J Hypertension, 2009)。さらに特異的な mineralcorticoid receptor 阻害剤 (MRA) で治療すると血圧非依存的に動脈瘤が抑制され、この効果と相関して塩分摂取量が低下した。逆に MR agonist である DOCA を投与した DOCA-salt ラットでは塩分摂取量の増加が認められ、軽度の血圧増加にもかかわらず高血圧ラットと同頻度の動脈瘤形成を認めた。脳動脈瘤抑制には RAS に加えて MR の抑制が重要であり、かつ動脈瘤形成がエストロゲン欠乏状態では血圧より体内塩分量によって強い影響を受ける可能性が示唆された (Hypertension, 2009)。動脈瘤破裂に関しては増大とは別の部位で認められることから機序が異なる可能性があり、また apoptosis 誘導作用物質で破裂しやすいことが判明しており、さらに詳細に破裂の機構を解明することが必要と考えている。以上当該研究計画はほぼ達成した。これらの研究から新たな知見が得られた。臨床での治療効果を調べるために、さらに新たな方向性も含めた多角的な研究を進める必要があると考えている。

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 件)

〔学会発表〕 (計 件)

〔図書〕 (計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計◇件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永廣信治 (NAGAHIRO SHINJI)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・教授
研究者番号：60145315

(2) 研究分担者

佐田政隆 (SATA MASATAKA)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・教授
研究者番号：80345214
里見淳一郎 (SATOMI JUNICHIRO)
徳島大学・病院・講師
研究者番号：10304510
兼松康久 (KANEMATSU YASUHISA)
徳島大学・病院・助教
研究者番号：90363142
八木謙次 (YAGI KENJI)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・助教
研究者番号：80551837
多田恵曜 (TADA YOSHITERU)
徳島大学・病院・助教
研究者番号：30547964

(3) 連携研究者

()

研究者番号：