

令和元年6月21日現在

機関番号：84305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10323

研究課題名(和文) 脳動脈瘤発生における血行力学的因子の役割検討および瘤形成抑制への試みに関する研究

研究課題名(英文) Study on role of hemodynamic factors in cerebral aneurysm development and research on trial for suppression of aneurysm formation

研究代表者

福田 俊一 (Fukuda, Shunichi)

独立行政法人国立病院機構(京都医療センター臨床研究センター)・糖尿病研究部・主任研究員

研究者番号：10600546

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：脳血管内皮細胞の血流感知機構に關与するP2X4 purinoceptorの遺伝子欠損マウスやP2X4阻害剤paroxetineを実験的脳動脈瘤誘発動物に用いたところ、脳動脈瘤誘発率が有意に低下し、脳動脈瘤形成に關与していることが知られている炎症因子の発言も有意に低下した。ヒト脳動脈瘤3次元画像を用いたCFD解析の臨床研究では、前交通動脈瘤と中大脳動脈瘤86例に關して瘤の大きさや発生部位と血行力学因子の分布との相関関係を年齢・性別・高血圧・喫煙歴などの因子とともに多変量解析を用いて解析した結果、瘤の大きさや発生部位による破裂率の違いは、血行力学因子の分布の相違に依存している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、脳血管における局所的な血行力学的負荷の増大が脳動脈瘤発生のきっかけになっている可能性が示唆された。血流感知機構に關与しているP2X4の阻害剤paroxetine投与によってラット脳動脈瘤誘発率が有意に減少した。Paroxetineは抗うつ剤としてすでにヒトに使用されている安全性が担保された薬剤であり、脳動脈瘤治療薬としての臨床応用が期待される。また、ヒト脳動脈瘤3次元画像を用いた計算流体力学的解析結果によって、血行力学的因子やこれを反映した血管構造因子が鋭敏な脳動脈瘤破裂リスク因子として利用できる可能性が示唆され、破裂予測因子としての臨床応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Using a P2X4 purinoceptor (involved in the blood flow sensing mechanism of cerebral endothelial cells) gene deficient mouse or the P2X4 inhibitor paroxetine in an animal model of experimentally induced cerebral aneurysms results in a significant decrease in cerebral aneurysm induction rate. The inflammatory factors known to be involved in aneurysm development were also significantly reduced. Patient-specific geometries and flow rates of 84 cerebral aneurysms were acquired from our clinical study, the CFD ABO Study. Multivariate analyses were performed to identify associations between hemodynamic metrics and known rupture predictors (age, sex, hypertension, smoking history, location, and size). The data suggested that the differences in aneurysm rupture rate according to size and location may reflect differences in hemodynamic environments in qualitatively different ways.

研究分野：脳血管障害

キーワード：wall shear stress cerebral aneurysm P2X4 purinoceptor CFD analysis animal model

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

死亡率が高く危険な疾患であるくも膜下出血の主な原因は脳動脈瘤破裂である。現状では破裂前に瘤を見つけ手術加療することがくも膜下出血予防の最も確実な方法であるが、未破裂脳動脈瘤罹患率は約2～8%もある一方、平均破裂率は年1%とそれほど高くない。手術合併症リスクを考慮すれば、破裂し易い瘤のみを治療することが望ましいが、瘤の大きさ・発生部位・形状など判明している破裂関連因子だけでは、例えば小さな動脈瘤でも破裂し易い群が存在するなど、破裂の可能性を正確に判断できないのが現状である。もし動脈瘤の発生そのものを抑制することができれば、くも膜下出血を未然に予防できる。そのためには、まず脳動脈瘤の発生機序を解明することが必要である。脳動脈瘤は動脈吻合である Willis 動脈輪の分岐部に好発するが、動脈瘤症例では Willis 動脈輪の非対称性を有する率が正常群に比べ有意に高い (Kayembe KNT. *Stroke* 1984;15:846-50)。生理的または病的に動脈輪の一部に狭窄や閉塞が存在すると、代償的に他の部位の血流負荷が増大する。すなわち、局所的な脳血流の増加による血行力学的量の増大が瘤形成に強く関係していると考えられ、血行力学的解析が動脈瘤発生機序の解明につながる。

瘤形成における血行力学量の役割の解析方法としては、2つの approach が考えられる。1つは、動物実験を用いた検討である。Hashimoto らは、腎性高血圧と片側頸動脈結紮によってラットに脳動脈瘤を誘発させることに成功し、Willis 輪への局所的な血行力学的負荷の増大だけで動脈瘤を惹起しうることを示した (*Surg Neurol* 1978;10:3-8)。血行力学的負荷の感知機構に関しては、壁ずり応力の変化を血管内皮細胞が感知することでシグナルが伝達されていることがわかっている (Kamiya A. *Am J Physiol* 1980;239:H14-21)。血管は、生理的範囲内の壁ずり応力の変化に対応して様々な物質を放出し、血管形態を変化させ、細胞活性を促進し、血管生理機能の恒常性を保持している。生理的限界外の低ずり応力下では、恒常性が破綻してプラーク形成を来すことが知られている。逆に、過度の高ずり応力下では、血管壁の破壊・菲薄化から動脈瘤形成を来す可能性がある。実際に動脈瘤誘発モデルを用いた流体力学的検討で、瘤増大が進行していく瘤頸部で壁ずり応力が最大となっていた (Nakatani H. *J Neurosurg* 1991;74:258-26)。そこで研究代表者は「血管分岐部に加わる過度な高ずり応力を血管内皮が感知することを契機に血管壁に細胞傷害性物質が誘発され血管壁の菲薄化が進行し動脈瘤が形成される」と仮定し、ヒトおよびラット脳動脈瘤で細胞傷害物質である NO の誘導型合成酵素 (iNOS) が発現することを確認し、壁ずり応力の低下や iNOS の阻害によって瘤誘発処置ラットの動脈瘤発生が抑制されることを示した (Fukuda S. *Circulation* 2000;101:2532-38)。その後、種々の分解酵素などが動脈瘤形成時に誘発され血管壁障害に関与していることが瘤誘発モデルを用いた実験で示された。

動脈瘤近傍の血行力学的因子の詳細な分布の検討に関しては、第二の approach である計算流体力学 (CFD) の応用が期待される。近年、ヒト脳動脈瘤症例の3次元脳血管画像を利用した CFD 解析によって血行力学的負荷を定量的に評価した報告が散見される。CFD 解析では、血管流入口における流速値の設定が重要な境界条件である。しかるに大半の報告では、境界条件として文献上報告されている健常成人の平均値が用いられているが、この値は左右対称な形状の Willis 輪の流速を反映したものになっており、流速は均一であると仮定されている。血行力学的負荷の増大が Willis 輪の不均衡から生じていることを考えれば、動脈輪の各部位によって流速が不均一であることが予想され、個々の症例の流速値を用いることが必須と考えられる。そこで、動脈瘤発生時における血行力学量の分布を検討するため、力学的解析に基づいて人工的に瘤を除去して、瘤発生前の血管形状を近似的に再現した (Shimogonya Y. *J Biomech*

2009;42:550-554)。「何故そこに瘤が発生し他部位には発生しなかったのか」に注目し、内頸動脈瘤や中大脳動脈瘤症例のように対称部位に瘤を有しない正常血管構造を持つ症例において、左右のずり応力分布の比較検討を行ったところ、瘤が発生した分岐部の壁ずり応力は対側同部位の正常な分岐部に比べて有意に高値であり、動物実験モデルでの仮説を裏付ける結果となった (Fukuda S. International Stroke Conference 2014, San Diego, CA)。

## 2. 研究の目的

連携研究者である安藤らは、P2X4 プリノセプターに関する  $Ca^{2+}$  イオンの流入が内皮細胞のずり応力感知機構に大きく関与していることをつきとめ、その遺伝子欠損マウスでは、ずり応力反応が抑制されていることを報告した (Yamamoto K *Nat Med* 2006;12:133-137)。この P2X4 プリノセプター遺伝子欠損マウスに動脈瘤誘発処置を行い野生型マウスと比較したところ、瘤発生率が有意に低く、iNOS や COX-2、MCP-1 などの瘤形成関連因子の発現が抑制されているという結果が得られた (Fukuda M. *FASEB J* 2014;28:LB669)。すなわち、血管内皮のずり応力感知機構を阻害することで、脳動脈瘤形成を抑制できる可能性がある。一連の動脈瘤形成反応の initiation であるずり応力センサーを阻害すれば、これより下流の様々な血管壁障害反応をすべて block できる可能性が考えられる。P2X4 プリノセプターの阻害剤としては、臨床で抗鬱薬として用いられている paroxetine が報告されている。本研究では、脳動脈瘤誘発処置を施したラットに paroxetine を投与して、脳動脈瘤発生が抑制されるかどうかを検討したい。加えて、免疫組織学的・分子生物学的検討によってずり応力センサーの役割を確認し、将来的な目標である瘤発生予防の研究につなげたい。

CFD 解析を用いた研究では、これまでに提案されている血行力学因子や新たな力学量の分布を解析し、血行力学的発生関連因子を特定したい。CFD 解析による動脈瘤の破裂・増大関連因子の検討についても、研究代表者が代表となって国立病院機構共同臨床研究として、3年間の前向き観察研究を施行中である (CFD ABO Study: UMIN000013584)。今回我々は、脳動脈瘤形成にずり応力が実際に関与している証拠を動物実験によって始めて示し得た。CFD 解析と動物実験という2つの approach を相補的に用いることによって、脳動脈瘤形成機序の解明を進めていきたい。

## 3. 研究の方法

### 脳動脈瘤誘発動物実験

7週齢のオス C57BL/6 マウス(野生型)およびオス P2X4-KO マウス、オス SD ラットに片側頸動脈結紮および片側腎動脈結紮による脳動脈瘤誘発処置を行う。術後は、8% 食塩と 0.12% b-aminopropio- nitrile を含む餌を継続して与える。ラット paroxetine 投与群では、Alzet Osmotic Pumps を用いて 8mg/kg の paroxetine を持続投与する。マウスは術後 20 週後、ラットは術後 3 週間後に脳血管を採取する。採取した右嗅動脈-前大脳動脈分岐部から 5  $\mu$ m 厚の凍結切片を作成し、Elastica van Gieson 染色にて脳動脈瘤の有無を顕微鏡下に観察し発生率とその大きさを測定し、ラット 3 群間での統計学的有意差を検討する。マウスでは、免疫組織染色法を用いて脳動脈瘤形成過程に誘発され瘤形成に関与している可能性がすでに報告されている炎症因子の発現を比較検討する。また、RT-PCR 法で瘤形成に関与している可能性がすでに報告されている炎症因子群の発現を比較する。

### CFD 解析

ヒト脳動脈瘤 3 次元 CT 画像データの DICOM データからマテリアライズ社の 3 次元モデル編集ソフト 3-matic を用いて 3 次元構成を行う。さらに人工的な瘤除去作業を行い瘤発生前の血管形

状モデルを力学的解析に基づいて近似的に再現する。次に、拍動流条件にて解析ソフト ANSYS で流体解析を行い、ANSYS と自作プログラムによるデータ処理にて可視化および統計解析を行う。流入境界条件には頸動脈エコー検査によって得られた血流速度から算出された値を用いる。これまでに提案されている様々な血行力学因子の分布を検討し、まず有意差のある力学量をスクリーニングし、新たな血行力学量を含めた血行力学的動脈瘤発生関連因子の同定を行う。

#### 4 . 研究成果

##### 脳動脈瘤誘発動物実験

実験的脳動脈瘤誘発動物モデルを用いた研究では、P2X4 プリノセプター遺伝子欠損マウスでは野生型マウスと比較して瘤発生率が有意に低く、免疫染色法において iNOS や COX-2、MCP-1 などの瘤形成関連因子の発現が抑制されていた。ラットを用いた実験では、qPCR 法によって脳動脈瘤形成に関与していることが知られている炎症因子: MCP-1, TNF アルファ, IL1 , iNOS, COX-2 が、脳動脈瘤誘発処置群において非処置群に比べて有意に増加し、P2X4 阻害剤である paroxetine 投与によって有意に減少することが示された。脳動脈瘤誘発率も、paroxetine 投与によって有意に減少していた。Paroxetine は、別の作用である抗うつ剤としてヒトに臨床的に用いられており、その安全性は確認されている薬剤である。したがって、脳動脈瘤治療剤としての臨床応用が期待できる。これらの成果をまとめて論文投稿中である。

##### CFD 解析

人工的な瘤除去作業を行い瘤発生前の血管形状モデルを力学的解析に基づいて近似的に再現する方法を用いて解析を行い論文を投稿したが、十分な評価を受けることができなかった。

そこで、国立病院機構臨床共同研究 CFD ABO Study の 461 登録症例から 84 例( Acom 瘤 42 例 MCA 瘤 42 例 )の 3DCTA と頸動脈エコー結果を用いて拍動流による CFD 解析を行い、血行力学指標と既知の破裂予測因子( 年齢 性別 高血圧 喫煙歴 部位 大きさ )との関連を多変量解析で検討した。結果、瘤の大きさは、壁ずり応力の大きさや時間的な乱れを表す指標と有意な相関を認めた。部位の違いでは、ずり応力の大きさと有意な相関を認め、乱れの指標に関しては多方向性の乱れの指標  $N_{transWSS}$  のみと有意な相関を認めた。他の既知の破裂リスクでは有意な相関は見られなかった。すべての指標の中で  $N_{transWSS}$  が部位と大きさ双方に対し最も高いオッズ比を示した。新たに提案した血管構造指標 AAI は、ずり応力の大きさ・乱れに対し強い相関を示した。以上より、脳動脈瘤の大きさや部位による破裂率の違いは、瘤の血行力学的環境の相違を反映している可能性が示唆された。部位と大きさでは破裂の血行力学的要因が異なっていると考えられた。これらの成果をまとめて AJNR に報告した

#### 5 . 主な発表論文等

##### [ 雑誌論文 ] ( 計 2 件 )

1. Shimogonya Y, Fukuda S. Computational and experimental studies into the hemodynamics of cerebral aneurysms. **JBSE** 2016;11:15-00488.
2. Fukuda S, Shimogonya Y. Differences in Cerebral Aneurysm Rupture Rate According to Arterial Anatomies Depend on the Hemodynamic Environment. **American Journal of Neuroradiology** **AJNR** 2019;40:834-839.

##### [ 学会発表 ] ( 計 21 件 )

1. Shimogonya Y, Fukuda S. Computational fluid dynamics for simulating the blood flow in arteries: Its applications to hemodynamic analyses of the cerebral aneurysm formation. **10<sup>th</sup> World**

**Congress for Microcirculation Satellite Symposium** Sep 24, 2015.Kyoto.

2. Fukuda S. A role of hemodynamic stress on the cerebral aneurysm formation: a series of studies using an animal model of experimentally induced cerebral aneurysms. **10<sup>th</sup> World Congress for Microcirculation Satellite Symposium** Sep 24, 2015.Kyoto.
3. Fukuda S, Shimogonya Y, Fukuda M, Tsukahara T. Hemodynamic Localizations in Anterior Communicating Artery Aneurysms in Comparison With Middle Cerebral Artery Aneurysms With Computational Fluid Dynamics Analysis. **International Stroke Conference 2016** Feb 17, 2016. Los Angeles, CA.
4. Fukuda S, Shimogonya Y. Hemodynamic Localizations in Anterior Communicating Artery Aneurysms in Comparison with Middle Cerebral Artery Aneurysms with Computational Fluid Dynamics Analysis. **Experimental Biology 2016** April 6, 2016. San Diego, CA.
5. Fukuda S, Shimogonya Y. Wall Shear Stress Strength Over the Cerebral Aneurysm is Drastically Affected by Aneurysm Location While the Magnitude of Disturbed Flow is Closely Related to Aneurysm Size and Surface Area. **International Stroke Conference 2017** Feb. 22, 2017 Houston, TX.
6. Fukuda S, Fukuda M, Ando J, Yamamoto K, Tsukahara T, Ito Y, Hasegawa K. Inhibition of the Endothelial Shear Stress Sensor, P2X4 Purinoceptor Drastically Reduces Cerebral Aneurysm Formation. **International Stroke Conference 2017** Feb. 22, 2017 Houston, TX.
7. Fukuda S, Shimogonya Y. Surface area may be a more useful risk factor for cerebral aneurysm rupture than maximum diameter **Experimental Biology 2017** April 28, 2017.Chicago, IL.
8. Fukuda S, Fukuda M, Ando J, Yamamoto K, Tsukahara T, Hasegawa K. Shear Stress Sensing on the Endothelium Initiates Chronic Inflammation of the Arterial Wall During Cerebral Aneurysm Formation: Potential Novel Therapy for Cerebral Aneurysms With Paroxetine. **International Stroke Conference 2018** Jan 24, 2018. Los Angeles, CA.
9. Fukuda S, Shimogonya Y, Imamura H, Matsui Y, Yonemoto N, Sakai N. Enhancement of Disturbed Flow is Involved in Recanalization After Complete Endovascular Coil Embolization of Internal Carotid Artery-Posterior Communicating Artery Aneurysms. **International Stroke Conference 2018** Jan 24, 2018. Los Angeles, CA.
10. Shimogonya Y, Fukuda S. Significant Correlations between risk factors for rupture of cerebral aneurysms and hemodynamic factors by using computational flow dynamic (CFD) analysis and multivariate analysis. **International Stroke Conference 2018** Jan 25, 2018. Los Angeles, CA.
11. Fukuda M, Fukuda S, Ando J, Yamamoto K, Ito Y, Inoue T, Tsukahara T, Asahara N, Hasegawa K, Shimazu A. Excessive shear stress sensing on the arterial endothelium initiates cerebral aneurysm formation. **Experimental Biology 2018** April 23, 2018.San Diego, CA.
12. Correlation between multi-directional wall shear stress and risk factors of cerebral aneurysm rupture. Oral. Shimogonya Y, Fukuda S. **8th World Congress of Biomechanics** Tuesday, July 10, 2018. Dublin, Ireland.
13. 福田俊一、下権谷祐児、福田美雪、安藤譲二 脳動脈瘤形成における血行力学因子の役割について：実験的脳動脈瘤誘発動物とヒト脳動脈瘤 CFD 解析 **第 54 回生体医工学会大会** 2015 年 5 月 8 日 名古屋
14. 福田俊一、下権谷 祐児 CFD 解析は未破裂脳動脈瘤の破裂・増大予測や治療に貢献しうるか？ 多施設前向き臨床研究：CFD ABO Study 中間解析報告 **第 74 回日本脳神経外科学会総**

会 2015年10月15日 札幌

15. 下権谷祐児、福田俊一 計算流体力学による破裂脳動脈瘤に関する検討：DISTURBED FLOWの観点から **第39回日本バイオレオロジー学会年会** 2016年6月18日 東京
16. 福田俊一、下権谷祐児 計算流体力学(CFD)解析による中大脳動脈瘤と前交通動脈瘤破裂率の相違に関する検討：CFD ABO Study 中間報告 **日本脳神経外科学会第75回学術総会** 2016年10月1日 福岡
17. 福田俊一、下権谷祐児 計算流体力学(CFD)解析による未破裂脳動脈瘤の最大径および表面積による血行力学的因子の分布の相違の検討 **第42回日本脳卒中学会学術集会(STROKE2017)** 2017年3月17日 大阪
18. 福田俊一、下権谷祐児、The CFD ABO Study Group 多変量解析による未破裂脳動脈瘤の破裂リスクの血行力学因子に対する相関性の検討～計算流体力学(CFD)解析を用いて～ **日本脳神経外科学会第76回学術総会** 2017年10月12日 名古屋
19. 福田俊一、下権谷祐児、The CFD ABO Study Group 血行力学的因子を最も反映する血管構造指標は何か? : CFD解析による新たな未破裂脳動脈溜破裂リスクの検討 **第47回日本脳卒中の外科学会学術総会** 2018年3月15日 福岡
20. 福田美雪、福田俊一、安藤譲二、山本希美子、伊藤由紀、井上隆之、塚原徹也、長谷川浩二、島津章 血管内皮壁ずり応力センサーP2X4 プリノセプター阻害薬 Paroxetine を用いた脳動脈瘤形成抑制の検討 **第47回日本脳卒中の外科学会学術総会** 2018年3月15日 福岡
21. 福田俊一、下権谷祐児、NHO CFD ABO Study Group、NHO Carotid CFD Study Group. 計算流体力学(CFD)解析を用いた脳血管障害の血流解析臨床研究について：2つのNHOネットワーク共同臨床研究 **第72回国立病院総合医学会** 2018年11月9日 神戸

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等 0件

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：下権谷 祐児

ローマ字氏名：Yuji Shimogonya

所属研究機関名：日本大学

部局名：工学部機械工学科

職名：准教授

研究者番号(8桁)：30552575

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：安藤 譲二

ローマ字氏名：Joji Ando

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。