

平成 31 年 4 月 25 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10718

研究課題名(和文) う蝕原因菌による脳動脈瘤破裂のメカニズム解明とバイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Investigation of mechanisms of rupture in cerebral aneurysm and research of its biomarkers

研究代表者

梅村 和夫 (umemura, kazuo)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：40232912

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)：本研究の目的は、新規の脳動脈瘤動物モデルを確立し、そのモデルを用いて口腔細菌の脳動脈瘤破裂におけるメカニズムを解明することにある。3T-MRI装置とマウス頭部用コイルを用いてマウス脳イメージング環境を構築した。高脂血症マウスモデルに脳動脈瘤を誘引して破裂に及ぼす影響を検討したところ、正常脂質のマウスと比べ、高脂血症マウスでは、脳動脈瘤の破裂は有意に低下した。また、プラスミノゲンノックアウトマウスを用い、プラスミンの役割を検討した。プラスミノゲンノックアウトマウスでは、有意に破裂が減少し、プラスミンが脳動脈瘤破裂に関与していることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔細菌と全身疾患は、古くから報告されているが、そのメカニズムは不明なものが多い。我々がこれまでに証明してきた高病原性う蝕原因菌と頭蓋内出血との関連性の解明やそのメカニズムの解析は口腔細菌と全身性疾患を考える上で1つの道筋を付ける研究と位置づけられる。今までにはない研究の切り口やアイデアが独創的で斬新である。脳動脈瘤の破裂に関する原因はすべてが解明されているわけではない。この高病原性う蝕原因菌が脳動脈瘤破裂の原因の1つであれば、脳動脈瘤破裂の予防や治療に大きく貢献できる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to establish animal model of cerebral aneurysm and to investigate its mechanisms using the animal model. Using 3T-MRI and coil for mouse head, we can image the arteries in mouse brain. In high cholesterol mice, the rupture of aneurysm increased rather than that in normal cholesterol mice. In plasminogen-knockout mice, the rupture of aneurysm reduced rather than that in control mice. This suggests that plasmin may be related with the rupture of aneurysm.

研究分野：循環薬理学、脳循環

キーワード：脳動脈瘤 MRI 動物モデル

1. 研究開始当初の背景

我々は、口腔細菌であるう蝕原因菌が頭蓋内出血のリスクファクタの1つである可能性を示した。この成果は*Nature Communications* (2011) のオンライン版に掲載された。この研究では、う蝕原因菌の中に高病原性菌が存在し、その菌は脳血管内皮傷害部位に集積し、**matrix metalloproteinase (MMP) -9** の産生亢進や活性化を増強し、血管の細胞外マトリックスを融解し、頭蓋内出血を増強する可能性を示した(図1)。さらに、脳疾患患者の口腔細菌を解析したところ、脳出血および破裂脳動脈瘤患者で、この高病原性う蝕原因菌を保菌している頻度が有意に高いことを見出した(表)。口腔細菌は、抜歯や歯磨きで血液中に容易に侵入し、菌血症を起こすといわれている。このことから、口腔内に高病原性う蝕原因菌を保菌し、抜歯や歯磨きにより菌血症を起こすことで、頭蓋内出血を増悪する可能性を示すもので、頭蓋内脳出血のリスクファクタになる可能性を示す。この研究では、高病原性う蝕原因菌は菌の表面にコラーゲン結合蛋白質を発現していることが特徴で、このコラーゲン結合蛋白質をロックアウトした高病原性う蝕原因菌を用いた実験では頭蓋内出血は増悪されなかった。さらに、このコラーゲン結合蛋白質を人工的に合成して、菌本体がない状態で蛋白質だけを投与した場合にも頭蓋内出血を増悪することを確認した。



図1：高病原性う蝕原因菌によるマウス頭蓋内出血

破裂動脈瘤患者での高病原性う蝕原因菌の保菌率が未破裂動脈瘤患者のそれと比べ有意に高値であることから、高病原性う蝕原因菌が上記で示したメカニズム(図2)により動脈瘤を破裂させる可能性がある。

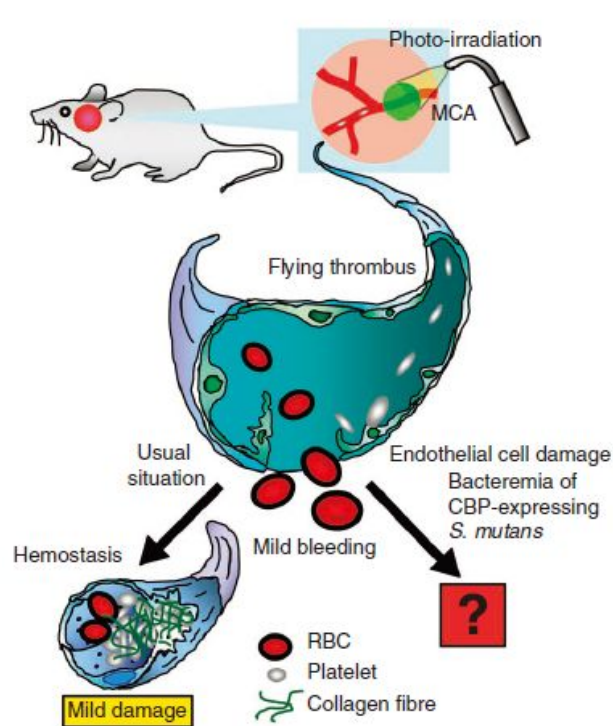


図2：血管破綻のメカニズム

表 脳卒中患者の病型における*S.mutans* およびコラーゲン結合タンパク質の陽性率

	<i>S.mutans</i> 陽性率	コラーゲン結合タンパク質陽性率	<i>p</i>
健常人	30/51 (58.8%)	4/30 (13.3%)	—
脳卒中患者			
脳出血	29/53 (54.7%)	11/29 (37.8%)	0.0391
破裂動脈瘤	20/39 (41.0%)	8/20 (40.0%)	0.0445
未破裂動脈瘤	56/98 (57.1%)	8/56 (14.3%)	NS

2. 研究の目的

最終的な目的は、脳動脈瘤が破裂する原因に高病原性う蝕原因菌の関与があるのかどうかを検討することにある。今回の研究では、新規の脳動脈瘤動物モデルを確立し、そのモデルを用いて動脈瘤破裂のメカニズムを解明することにある。

3. 研究の方法

(1) 血中脂質レベルが脳動脈瘤発生および破裂に及ぼす影響

クモ膜下出血は突然発症する疾患であり、脳血管の破裂によって重篤な症状を呈し、高頻度で社会復帰が困難となることが問題となっている。脳梗塞をはじめとする脳循環障害を予防する上で、血中の脂質レベルをコントロールすることは有用であるが、脳動脈瘤の破裂予防に関してはさまざまな報告がされている。今回、我々はLdl受容体(Ldlr)およびApobec1を欠損させたマウス(Ldlr^{-/-}, Apobec1^{-/-})を用いることによって血中の脂質レベルを高くし、この動物に実験的に脳動脈瘤を誘導することによって、脳動脈瘤の発生および破裂の変化をみた。実験的に脳動脈瘤を誘導するためにHashimotoモデルを用いた。実験開始の1週間前に片腎を摘出した。脳底クモ膜下腔に豚膵エラスターゼを投与し、脳血管を脆弱化した。また、エラスターゼ投与後、皮下に徐放性のデソキシコルチコステロンペレットを留置するとともに、飲水として1%食塩水を摂取させることで高血圧を誘導した。実験開始から3週間後に脳組織を摘出し、脳動脈瘤の有無およびクモ膜下出血の有無を評価した。

(2) マウス脳梗塞モデルによる運動量測定アプリケーションの評価

我々は、iPad (Apple Inc. Cupertino, U.S.A)を用い簡便にマウス行動量を測定することのできるアプリケーションを開発し、マウス脳梗塞モデルにおける行動量の変化を測定した。マウス行動量アプリケーションは、マウスの体表に接着した直径7mmの球状マーカの位置をiPadおよびアプリケーションに記憶させることで行動量を距離として計測することが可能な装置である。脳梗塞モデルには7週齢の雄性C57BL/6Jマウスを用い、左中大脳動脈に緑色光を照射すると同時に静脈内に光増感剤であるローズベンガルを投与することで脳梗塞を発症させた。さらに、実験期間中の脳梗塞領域を決定するために3テスラMRIを用い撮像を行った。

4. 研究成果

(1) 血中脂質レベルが脳動脈瘤発生および破裂に及ぼす影響

コントロールとして用いたC57BL/6群は17匹中10例においてクモ膜下出血がみられ、また4例に未破裂脳動脈瘤があった。一方、Ldlr^{-/-}, Apobec1^{-/-}群は28例中1例においてのみクモ膜下出血がみられ、10例に未破裂脳動脈瘤がみられた。

今回の研究においてLdlr^{-/-}, Apobec1^{-/-}群はクモ膜下出血がほとんどみられず、血中の高い脂質レベルは脳動脈瘤破裂に対し保護的に作用する可能性が示唆された。今後は血中の脂質が直接的に脳動脈瘤の破裂予防に寄与しているのか、もしくは血液凝固系が関与しているのかなどの検討を行っていく予定である。

(2) マウス脳梗塞モデルによる運動量測定アプリケーションの評価

脳梗塞を発症させる前の行動量を4日間観察したところ、いずれの日においても行動量に大き

な差はなく一日あたりの行動距離は約 300m であり、安定したデータ収集をすることができた。実験的に脳梗塞を発症させることによってマウスの行動距離は大幅に低下し、脳梗塞 1 日後の行動距離は約 60m であった。その後、マウスの状態が回復するとともに行動量は増加し、脳梗塞から 7 日後の行動距離は約 200m であり、ほぼ脳梗塞発症前のものと同様であった。

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 3 件)

外村和也、牧野洋、加藤孝澄、木村哲朗、夏目貴弘、鈴木智、難波宏樹、中島芳樹、梅村和夫
マウス脳梗塞モデルによる運動量測定アプリケーションの評価

第 59 回 脳循環代謝学会

2016 年 11 月

外村和也、牧野洋、鈴木智、岩城孝行、中島芳樹、難波宏樹、梅村和夫
血中脂質レベルと脳動脈瘤発生および破裂の関係性

第 61 回 脳循環代謝学会

2018 年 10 月

Kazuya Hokamura, Hiroshi Makino, Tomo Suzuki, Takayuki Iwaki,

Ryou Imai, Yoshiki Nakajima, Hiroki Namba, Kazuo Umemura.

Association with blood cholesterol and cerebral aneurysm

第 92 回日本薬理学会年会

2019 年 3 月

6 . 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名：外村和也

ローマ字氏名：(HOKAMURA, Kazuya)

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。