

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月17日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10719

研究課題名(和文) 脳動脈瘤病態形成進展に対するT細胞機能の寄与の検討

研究課題名(英文) Contribution of T cell function to the pathogenesis of intracranial aneurysms.

研究代表者

青木 友浩 (AOKI, TOMOHIRO)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：40633144

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)：本検討では脳動脈瘤を対象疾患としその病態へのT細胞機能の関与につき検討を行った。我々は本検討のために脳動脈瘤モデル動物を使用した。まず、脳動脈瘤病変内でのT細胞の浸潤を病理組織学的に確認した。その上で、T細胞の機能を欠損したラットや薬物によりT細胞機能を阻害したラットをモデルに供した。結果、脳動脈瘤病態へのT細胞機能の寄与が限定的であることを明らかとした。また、新たに樹立した自然破裂によりくも膜下出血を発症するラットを使用し病理組織学的検討を行ったところ、破裂前後ないしは破裂しやすい瘤でT細胞の浸潤数は変化しなかった。よって、病態へのT細胞機能の寄与は限定的であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究計画では、致死的疾患のくも膜下出血の原因疾患である脳動脈瘤を対象疾患とした。ここで、脳動脈瘤は人口の数%を占める高頻度の疾患である一方で、いまだ薬物治療が存在しない。そのために、脳動脈瘤の進展破裂を予防する薬物治療法開発が急務である。

脳動脈瘤は脳血管壁内の慢性炎症反応に制御される疾患であると理解されている。一方、病変部の炎症細胞の一定部分を占めるT細胞については病態への寄与につき不明であった。よって本検討では、病態に対するT細胞の寄与を検討した。その結果、脳動脈瘤病態へのT細胞機能の寄与が限定的であることを明らかとした。

本検討の結果、脳動脈瘤の創薬標的についての理解が深まった。

研究成果の概要(英文)：Given the social importance of intracranial aneurysm as a major cause of a lethal subarachnoid hemorrhage, clarification of mechanisms underlying the pathogenesis is essential for social health. To examine whether T cell function is involved in aneurysm progression, intracranial aneurysm model of rats was used. CD3-positive T cells were present in human aneurysm walls, whose number was significantly larger compared with that in control arterial walls. However, deficiency in T cells in rats and pharmacological inhibition of T cell function by oral administration of Cyclosporine A both failed to affect intracranial aneurysm progression. Furthermore, number of T cells infiltrating in rupture-prone lesions was similar with that in aneurysm lesions which never rupture. Thus, T cell function is dispensable for the pathogenesis of intracranial aneurysms.

研究分野：脳神経外科

キーワード：脳動脈瘤 くも膜下出血 T細胞 炎症

## 1. 研究開始当初の背景

くも膜下出血は脳卒中の一種であり、脳動脈瘤破裂がその主要な原因疾患である。くも膜下出血は脳卒中の中でも最も予後の悪い疾患であり、一旦発症すると死亡率が50%に及ぶのみならず、たとえ救命できたとしても生存者の過半数は重篤な後遺症のため自立した生活や復職が不可能である。以上のような予後の悪さ・社会的損失の大きさからくも膜下出血の治療の進歩による予後の改善が望まれる。しかしながら実際は、手術や集中治療を含む医療技術は日進月歩であり様々な疾患の予後が改善しているにもかかわらず、くも膜下出血の死亡率は横ばいである。このように、脳動脈瘤が破裂した結果としてのくも膜下出血の予後の悪さや現在の治療介入の限界からも、脳動脈瘤を破裂させないように治療しくも膜下出血の発症自体を抑制することが社会的に重要であり急務でもある。

ここで、くも膜下出血の原因である未破裂脳動脈瘤の有病率は2~4%であり(Iwamotoら; Stroke1999)、決してまれな疾患ではない。また、本邦では医療アクセスの良さから未破裂脳動脈瘤は脳ドックや外来でのスクリーニング検査等で多数発見される。この現状が意味することは、本邦においては未破裂脳動脈瘤の破裂を予防する治療機会が存在するという点である。一方で、高血圧治療や禁煙など破裂の危険因子管理以外には脳動脈瘤の治療手段は未だ手術治療しか存在しない。手術には侵襲が伴い術後の麻痺や高次脳機能障害などといった合併症の危険が内在している。そのために、脳動脈瘤の破裂予防のための外科治療は破裂の推定危険性が高くかつ比較的安全に手術が施行できると見込まれる症例を選択し施行される。よって、手術加療を受けている症例は半数以下にとどまり(Moritaら; N Engl J Med. 2012)、実に半数以上が無治療である。この現状を打破し破裂によるくも膜下出血を予防するためにも未破裂脳動脈瘤に対する薬物治療の開発が急務である。

未破裂脳動脈瘤に対し破裂予防のための新規薬物治療法の開発のためには、脳動脈瘤の進展や破裂を制御する分子機序の詳細を明らかとしたり寄与する細胞種を同定することが必須である。この観点より我々は血流ストレス負荷に伴い脳血管分岐部に脳動脈瘤を誘発するモデル動物を使用し脳動脈瘤形成進展を担う分子機構や寄与する細胞種の同定を継続的に行ってきた。その中で、脳動脈瘤形成増大を制御する因子として、転写因子 NF- $\kappa$ B やサイトカイン TNF- $\alpha$ 、生理活性脂質であるプロスタグランジン経路等を同定し、また寄与する細胞種としてマクロファージを同定した(Aokiら; Acta Neuropathol. Commun.2014, Aokiら; Trends Pharmacol.Sci.2012, Aokiら; Br.J.Pharmacol.2011, Aokiら; Expert Opinion on therapeutic Targets2010, Aokiら; Stroke2009, Aokiら; Circulation2007, Aokiら; Stroke2007)。これらの結果から我々は脳動脈瘤が脳血管壁の炎症性疾患であるという概念を提唱した(青木友浩.脳神経外科診療プラクティス 5.2015, Aokiら; Trends Pharmacol.Sci.2012, Aokiら; Expert Opinion on therapeutic Targets2010)。しかし、いまだ脳動脈瘤形成進展そして破裂に至る機構の全容は明らかとされておらず、結果として薬物治療法はいまだ開発されていない。例えば、ヒトの動脈瘤標本に存在する炎症細胞としてマクロファージに加えて数の多い細胞種としてT細胞がCD3陽性細胞として報告されている(Frosenら; Neurosurgery. 2006, Chyatteら; Neurosurgery. 1999)。さらに興味深いことに、Frosenらは、破裂動脈瘤壁において未破裂動脈瘤よりも浸潤T細胞数が多いと報告しており、T細胞が脳動脈瘤破裂にも関与している可能性を示唆している。T細胞のうちでもTh17細胞から分泌されるIL-17といったサイトカインの含有量が脳動脈瘤のドーム内では大腿動脈と比較高いことも報告されており、Th17といった特定のT細胞サブセットが脳動脈瘤壁内で機能していることも示唆される(Chalouhiら; Stroke2013)。また、ラットの脳動脈瘤モデルでの病変部でもT細胞はマクロファージの次に数の多い細胞種であることを我々は既に報告している(Aokiら; Stroke2007)。しかし、脳動脈瘤壁内でのT細胞の存在は20年程度前から明らかであるにもかかわらず、存在するT細胞のサブセットも不明でありかつこの細胞種が果たして脳動脈瘤形成進展そして破裂を制御しているかないしはむしろ抑制的に機能するかについても明らかでない。

## 2. 研究の目的

脳動脈瘤壁に浸潤しているT細胞につき、1)脳動脈瘤病変部に浸潤するT細胞サブセットの同定(モデル動物・ヒトの脳動脈瘤標本)、2)T細胞欠損や薬理的機能阻害を通し脳動脈瘤形成進展に対するT細胞の寄与の検証、の2点を本研究計画で明らかとすべき目的とする。また本研究計画により、T細胞の脳動脈瘤治療標的としての可能性を明らかとし新規の脳動脈瘤治療戦略を提唱することも目的とする。

## 3. 研究の方法

#### 1) 脳動脈瘤病変内に存在するT細胞のサブタイプ同定

現在までにヒト脳動脈瘤壁内でのT細胞の存在がCD3陽性細胞として同定されている(Chyatte Dら; Neurosurgery, 1999)。しかし、そのサブタイプや病変形成進展との相関は不明である。そのため、脳動脈瘤モデル動物に誘発した各形成進展段階の脳動脈瘤標本を使用して、脳動脈瘤病変内でのT細胞の存在およびその推移を免疫組織学的に確認する。さらに、各サブタイプのマーカー分子に対する抗体(CD4, CD8, IL-17等)を使用した免疫組織化学にて病変内に存在するT細胞サブタイプの同定を行う。この検討により、脳動脈瘤形成過程でのT細胞各サブタイプの経時的な変動を確認する。

#### 2) T細胞機能欠損ラットを使用した検討

脳動脈瘤形成へのT細胞の寄与を検討するためにWhn(winged-helix nude)の変異によりT細胞機能を欠失したラット(Nehls M. et al, Nature, 372: 103-107, 1994)であるF344/N-rnuを使用する。同ラットの野生型コントロールとなるF344/Nラットとともに脳動脈瘤誘発処置(片側頸動脈結紮および高塩分負荷)を施し、脳動脈瘤形成や進展を比較することによりT細胞機能の脳動脈瘤形成進展に対する寄与を明らかとする。

#### 3) 免疫抑制剤によるT細胞機能欠損による検討

前項2)と並行し薬剤によるT細胞機能抑制を行うことにより脳動脈瘤形成へのT細胞の寄与を薬理学的にも検証する。そのためにカルシニューリン阻害によりT細胞機能を抑制するシクロスポリンやタクロリムスをラット脳動脈瘤モデル動物に投与し脳動脈瘤形成進展が影響されるか検討を行う。

#### 4) T細胞機能欠損の脳動脈瘤壁での炎症反応に対する影響の検討

昨年度に実施した、薬剤ないしは自然変異ラットでのT細胞機能欠損により脳動脈瘤病変内での炎症細胞分画や病態形成を制御することが明らかとなっている炎症反応等がどのように影響を受けるかを検討する。具体的には脳動脈瘤壁での内弾性板断裂の程度や平滑筋菲薄化の程度を組織学的に評価したり、マクロファージなど他の炎症細胞の浸潤数の免疫組織学的検討、病変部でのTNF-alpha等のサイトカインの産生量の確認(Western blot, ELISA)、PCR法による各種脳動脈瘤形成進展制御遺伝子の発現検討等を組み合わせ検証する。

#### 5) ヒト脳動脈瘤病変でのT細胞サブセットの存在の確認

ヒト未破裂脳動脈瘤標本において免疫組織化学により動物モデルにおいて検証し確認したT細胞サブセットが存在することを確認する。この検討によって、動物モデルを使用した検討から得られた知見がヒトの脳動脈瘤に外挿可能であることを確認する。

### 4. 研究成果

平成28年度には、以前より使用している片側頸動脈閉塞と血流ストレス負荷による脳動脈瘤モデルラットを使用し、1)脳動脈瘤病変内に存在するT細胞のサブタイプ同定、2)T細胞機能欠損ラットを使用した検討、3)免疫抑制剤によるT細胞機能欠損による検討の3項目につき検討を行った。その結果、ヒトの未破裂脳動脈瘤壁では正常血管と比較してCD3陽性のT細胞の数が多し、サブセットとしてCD4、CD8陽性T細胞については同程度存在することを明らかとした。その後、T細胞欠損F344-rnu/nuラットに脳動脈瘤誘発処置を行いコントロールであるF344ラットと形成される脳動脈瘤サイズを比較検討した。結果、形成される脳動脈瘤サイズに有意な差異は認めず、病変内の炎症反応にも明らかな差異は検出できなかった。さらに、T細胞機能抑制のために免疫抑制剤であるCyclosporine Aを投与したが、T細胞欠損の場合と同様に脳動脈瘤のサイズや病変内の炎症反応に影響を及ぼさなかった。このような、T細胞欠損ないし抑制下では脳動脈瘤形成進展に重要であるマクロファージの機能阻害が生じている可能性を否定できないために、in vitroの検討でマクロファージ機能につき検討を行った。結果、T細胞欠損ラットでも初代培養マクロファージにおいてLPS反応性のNF-kB活性化や炎症関連遺伝子発現誘導が維持されることを確認した。これらの結果から、T細胞機能が脳動脈瘤の少なくとも形成や進展には関与しないことが示唆された。

平成29年度から30年度にかけて、平成28年度のT細胞機能が脳動脈瘤の少なくとも形成と進展には関与しないという研究結果を踏まえ、ではT細胞機能が脳動脈瘤の最大の問題点である破裂によるくも膜下出血に寄与しているのかという点を検討する目的で自然破裂によりくも膜下出血を発症するモデルの確立を行った。結果、既報を参考にしつつエストロゲン欠乏、血流ストレス負荷増大等を組み合わせることにより脳動脈瘤の発生率は半数程度であるが一旦誘発された病変が半分以上の確率で自然破裂によるくも膜下出血を発症するモデルラットを確立した。そして、免疫組織化学にて未破裂、破裂両病変部におけるT細胞浸潤の程度につき検討を行った。結果、T細胞数は好中球とは異なり破裂脳動脈瘤病変で有意な増加を来さなかった。そのため、T細胞機能の脳動脈瘤破裂に対する寄与は限定的であることが予想された。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

- 1) Shimizu K., Kushamae M., Mizutani T., Aoki T.  
Intracranial Aneurysm as a Macrophage-Mediated Inflammatory Disease.  
Neurologia medico-chirurgica in press
- 2) 青木友浩、小関宏和、宮田悠、安部倉友、清水寛平  
炎症を通し脳動脈瘤を理解する  
脳神経外科 46(4):275-294, 2018
- 3) 青木友浩  
脳動脈瘤に対する新規薬物治療法・診断法開発の可能性と近未来展望  
脳神経外科ジャーナル 27(12):882-888, 2018
- 4) 青木友浩  
脳血管の慢性炎症性疾患としての脳動脈瘤の理解と薬物治療法開発への展望  
循環器病研究の進歩 19(1), 66-74, 2018
- 5) Aoki T., Yamamoto R., Narumiya S.  
Targeting macrophages to treat intracranial aneurysm.  
Oncotarget 28;8(62):104704-104705, 2017
- 6) Miyata H., Koseki H., Takizawa K., Kasuya H., Nozaki K., Narumiya S., Aoki T.  
T cell function is dispensable for intracranial aneurysm formation and progression.  
PLoS ONE 12(4):e0175421, 2017
- 7) 青木友浩  
脳動脈瘤治療のパラダイムシフト  
The 35th Meeting of The Mt. Fuji Workshop on CVD. 35, 1-9, 2017

〔学会発表〕(計6件)

- 1) 青木友浩  
マクロファージ依存的な脳血管の慢性炎症性疾患としての脳動脈瘤の理解  
第77回日本脳外科学会総会 2018・10・12 仙台 シンポジウム 招待講演
- 2) 青木友浩  
脳動脈瘤の発生進展と慢性炎症  
第37回Mt. Fuji Workshop on CVD 2018・8・25 名古屋 シンポジウム 招待講演
- 3) Tomohiro Aoki  
IA rodent models  
Towards standardization of studies onto human and animal intracranial aneurysm wall vulnerability. 2018・5・25 Geneva, Switzerland 招待講演
- 4) 青木友浩  
脳動脈瘤に対する新規薬物治療法・診断法開発の可能性と近未来展望  
第38回日本脳神経外科コンgres総会 2018・5・20 大阪 シンポジウム 招待講演
- 5) Tomohiro Aoki  
Rat Model of intracranial aneurysm.  
Vasospasm Meeting 2017 2017・10・2 Los Angeles, CA, USA 招待講演
- 6) 宮田悠, 小関宏和, 瀧澤克己, 糟谷英俊, 野崎和彦, 青木友浩  
脳動脈瘤形成・増大におけるT細胞機能  
第42回日本脳卒中学会総会 2017・3・16 大阪

〔図書〕(計1件)

- 1) 野崎和彦、青木友浩  
脳動脈瘤の発生と破裂の分子生物学的メカニズム  
プライム脳神経外科、三輪書店、木内博之・斉藤延人 監修、木内博之 編集、p5-11、2017

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：小関宏和

ローマ字氏名：Koseki Hirokazu

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。