

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16651

研究課題名(和文) 脳動脈瘤に対するNADPH oxidaseをターゲットとしたナノ粒子治療の開発

研究課題名(英文) Development of Nanoparticle treatment targeted NADPH oxidase in cerebral aneurysms

研究代表者

西村 中(Nishimura, Ataru)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：90452755

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：培養ラット脳血管内皮細胞(GPNT)に層流および乱流負荷をかけると、Nox4のmRNAの発現は乱流負荷においてのみ有意に発現が上昇した。またその他の炎症系分子については層流、乱流ともに上昇し、特に乱流では強い発現の上昇を認めた。ラット脳動脈瘤モデルにおいて、Noxファミリータンパク質のうちNox4の発現のみ上昇し、免疫染色では動脈瘤における頸部周囲の乱流が起こる部位に発現の上昇を認めた。GPNTに対し、Nox4の過剰発現を行うと、層流、乱流負荷にて最も強く発現が上昇する炎症系分子であるMCP1の発現が低下した。Nox4はMCP1抑制による動脈瘤の形成・増大の抑制効果があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究でNox4は脳動脈瘤において、炎症の強く起こる乱流部に発現し、動脈瘤の形成・増大に強く関わるMCP1の発現を抑制することで保護的な役割を担っていることが示唆された。今後は内皮に発現するNox4をターゲットとした脳動脈瘤の形成・増大を抑制するための新規薬剤の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated by RT-PCR that rat brain microvascular endothelial cell line (GPNT) specifically expressed Nox4 among the Nox family proteins under laminar shear stress. Inflammatory molecules expressed Nox4 both under laminar and turbulent shear stress, especially, turbulent shear stress strongly increased the expression of Nox4. In experimentally induced cerebral aneurysms in rats, Nox4 were specifically expressed in cerebral aneurysms among the Nox family proteins. Immunohistochemistry demonstrated that the expression of Nox4 was high in the neck of aneurysms where turbulent shear stress loads. We examined the roles of Nox4 in GPNT by Nox4 overexpression using virus vector. Nox4 overexpression downregulated the expression of MCP-1, an inflammatory molecules which is upregulated both in laminar and turbulent shear stress. The upregulated Nox4 may control the expression of MCP-1 in endothelial cell, thereby restraining the enlargement of cerebral aneurysms.

研究分野：脳血管障害

キーワード：NADPH oxidase 脳動脈瘤 炎症

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脳動脈瘤は、脳血管障害の中でも、死亡率と後遺症率の高いくも膜下出血の原因となる疾患である。現時点でのくも膜下出血の予防法は、脳動脈瘤に対する外科的治療(クリッピング)や血管内治療(コイルリング)などの侵襲的治療が主であるが、これらに治療は術中破裂や再発など一定の合併症のリスクを有している。脳動脈瘤の増大・破裂を抑制するための新たな治療として、より低侵襲で安全性の高い内科的治療法が切望されている。

脳動脈瘤形成に関しては、脳動脈瘤壁にマクロファージを中心とした炎症細胞が浸潤し、動脈瘤壁の形成に伴い増加することが報告されている(Chyatte JR, Neurosurgery. 1999)。また、動脈瘤増大に関して、フリーラジカルスカベンジャーや p47phox ノックアウトマウスを用いた実験で、NADPH oxidase (Nox) の産生する活性酸素種 (ROS) の抑制が動脈瘤における炎症を抑えることで、その発育を抑制するとの報告もある (Aoki T, Lab Invest. 2009)。

申請者はこれまで、脳虚血病態における NADPH oxidase (Nox) ファミリータンパク質の役割についての研究を行ってきた(Nishimura A, J Cereb Blood Flow Metab. 2016)。ROS は様々な細胞において、細胞機能を制御する重要な因子である。生理的環境下では、細胞内 ROS の多くは ATP 産生に伴いミトコンドリア電子伝達系から受動的に生成されと考えられている。しかしながら、特に病的環境下では、ミトコンドリア酵素以外の酵素からも ROS は産生される。Nox ファミリータンパク質は ROS 産生に特化した酵素であり、5 つの Nox ファミリータンパク質(Nox1-5)のうち、Nox1, Nox2 および Nox4 が心血管系細胞に発現し、心血管疾患に重要な役割を果たしていることが報告されている。しかし、脳動脈瘤の形成において、いずれの Nox ファミリータンパク質がどのように発現し、瘤の増大に関わっているかの詳細なメカニズムは未だ解明されていない。

申請者は、動脈瘤の増大・破裂を抑制するための重要なターゲットとして Nox ファミリータンパク質に注目しており、Nox 阻害薬が脳動脈瘤治療における新たな治療戦略に繋がるものとして期待している。しかし現在他疾患においても Nox 阻害薬が臨床応用されている例はなく、可能な限り投与量が少なく(副作用の軽減)、効果的に病変に薬剤が集積し、長時間作用させることが必要であると考えられる。これを実現する手法として、今回タンパク質ナノ粒子による Drug Delivery System (DDS) に注目した。タンパク質ナノ粒子は高い血中安定性と低い細胞毒性・免疫原性を有するという特徴があり、これに Nox 阻害薬を封入することで、臨床応用するために患者にとってより効果的で安全性の高い治療法となり得るものと考えている。

### 2. 研究の目的

本研究では、脳動脈瘤の増大・破裂に関する Nox ファミリータンパク質の分子メカニズムを、マウス脳動脈瘤モデルを用いて検討する。これにより脳動脈瘤に関して、Nox ファミリータンパク質の時間的・空間的な発現と機能を明らかにし、いずれの Nox タンパク質が治療のターゲットとして適切か、ノックアウトマウスや Nox 阻害薬を用いて明らかにする。そして有効な Nox 阻害薬をタンパク質ナノ粒子に封入し、マウス脳動脈瘤モデルに対する効果的な投与法を検討することで、脳動脈瘤破裂によるくも膜下出血の発症を抑制する新たな治療法として研究を進める。

### 3. 研究の方法

#### 1) マウス脳動脈瘤モデルを用いた、Nox ファミリータンパク質の発現の解析

##### ・マウス脳動脈瘤モデルの作成

野生型マウスを用いてマウス脳動脈瘤モデルを作成する (Hashimoto N, Am J Pathol. 1983)。実験には 8 週齢のマウスを用いて、左の頸動脈および腎動脈を結紮、術後より collagen の架橋構造形成を抑制する beta-aminopropionitrile (BAPN) を添加した食餌の投与による結合組織の強度低下を通じ、頭蓋内主幹動脈分岐部に嚢状動脈瘤の形成を誘発する。

##### ・脳動脈瘤組織サンプルにおける Nox ファミリータンパク質の mRNA 発現解析

手術施行後 3 ヶ月後に内頸動脈 - 嗅動脈分岐部の血管を採取し、このサンプルから mRNA およびタンパクを抽出する。これを用いて Nox ファミリータンパク質 (Nox1-5) の発現を PCR, real-time PCR, ウェスタンブロットにより解析する。

##### ・脳動脈瘤組織サンプルにおける Nox ファミリータンパク質の病理組織学的検討

手術施行後 3 ヶ月後に内頸動脈 - 嗅動脈分岐部の血管を採取し、このサンプルから凍結切片を作成する。これを用いて Nox ファミリータンパク質 (Nox1-5) の発現とその分布を蛍光免疫染色にて解析する。またどの細胞に発現しているか調べるため、内皮細胞、血管平滑筋細胞、炎症細胞や細胞外マトリックスなどのマーカーとの蛍光二重染色を行う。

#### 2) Nox ファミリータンパク質のノックアウトマウスを用いた脳動脈瘤の増大・破裂に対する分子メカニズムの解明

##### ・Nox ファミリータンパク質のノックアウトマウスを用いた脳動脈瘤モデルの作成

心血管系細胞に発現する Nox ファミリータンパク質である Nox1, 2, 4 のノックアウトマウスを用いて実験 1) と同様に脳動脈瘤モデルを作成する。コントロールとして野生型マウスに対

する脳動脈瘤モデルを用いる。

・Nox ファミリータンパク質ノックアウトによる脳動脈瘤の増大・破裂に関する検討

野生型と Nox1, Nox2 および Nox4 ノックアウトマウスそれぞれ 3 ヶ月間観察を行い、その過程でも膜下出血による死亡がないか観察する。3 ヶ月後にマウスを安楽死させ内頸動脈 - 嗅動脈分岐部の血管を採取を行い、その時点でのくも膜下出血の有無と、パラフィン固定した動脈瘤標本から HE 染色を行い、動脈瘤の最大径と病理組織学的検討を行う。

・摘出した脳動脈瘤組織サンプルを用いた分子メカニズムに関する解析

野生型と Nox1, Nox2 および Nox4 ノックアウトマウスに対する脳動脈瘤モデル作成後 3 ヶ月の内頸動脈 - 嗅動脈分岐部の血管を採取し、タンパクを抽出する。これを用いて、炎症に関連したタンパクや細胞外マトリックス、シグナル伝達に関するウエスタンブロットを行い、脳動脈瘤における Nox ファミリータンパク質の役割を解析する。

3) マウス脳動脈瘤モデルに対する Nox 阻害薬封入タンパク質ナノ粒子の、脳動脈瘤の増大・破裂抑制効果の検討

・マウス脳動脈瘤モデルにおけるタンパク質ナノ粒子の分布の解析

古細菌 Mj285 を用いて精製したタンパク質ベースのナノ粒子を使用する (Murata M, Mol Pharm. 2015)。このタンパク質ナノ粒子に FITC を封入し、手術施行 3 ヶ月後のマウス脳動脈瘤モデルに投与する。投与後翌日にマウスを安楽死させ、内頸動脈 - 嗅動脈分岐部の血管を採取し、凍結切片を作成し、蛍光顕微鏡にて動脈瘤への FITC の分布を評価する。

・Nox 阻害薬封入タンパク質ナノ粒子の投与による脳動脈瘤増大・破裂に対する効果解析

Nox4 の阻害剤である VAS2870 (Enzo Life Science, Japan) 及び GKT137831 (Genkyotex S.A., Switzerland) を封入したタンパク質ナノ粒子を作成する。手術施行 2 ヶ月後のマウス脳動脈瘤モデルにこのナノ粒子を投与する。コントロールとして、マウス脳動脈瘤モデルに対してナノ粒子非投与群、および薬剤を封入していないナノ粒子を手術施行 2 ヶ月後に投与した群を用いる。手術施行後 3 ヶ月にマウスを安楽死させ、内頸動脈 - 嗅動脈分岐部の血管を採取し、その時点でのくも膜下出血の有無と、パラフィン固定した動脈瘤標本から HE 染色を行い、動脈瘤の最大径と病理組織学的検討を行う。

#### 4. 研究成果

平行平板型(層流)および回転円錐型(乱流)壁すり応力負荷装置を用いてラット脳血管内皮細胞(GPNT)に shear stress を負荷し、強度別における mRNA、タンパクの発現を解析した。また、ラット脳動脈瘤モデルを作成し、脳血管における mRNA、タンパクの発現を解析した。GPNT における Nox4 の mRNA の発現は、乱流負荷において有意に発現が上昇した。またその他の炎症系分子については層流、乱流ともに 上昇し、特に乱流では強い発現の上昇を認めた。脳動脈瘤モデルにおいて、Nox ファミリータンパク質のうち、Nox4 の発現のみ上昇し、免疫染色では動脈瘤における頸部周囲の乱流が起こる部位に発現の上昇を認めた。GPNT に対し、Nox4 の過剰発現を行うと、層流、乱流負荷にて最も強く発現が上昇する炎症系分子である MCP1 の発現が低下した。これらの結果より Nox4 は脳動脈瘤において、炎症の強く起こる乱流部に発現し、動脈瘤の形成・増大に強く関わる MCP1 の発現を抑制することで保護的な役割を担っていることが予測された。マウス脳動脈瘤モデルを作成したが、採取した組織の量が非常に少なく、解析するために十分なサンプルが得られなかった。上記の結果により Nox4 は保護的に作用していることが示唆されたため、今後は Nox4 を局所で賦活するような新規治療の開発を検討する必要があるものと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 井戸 啓介
2. 発表標題 脳動脈瘤の病態における NADPH oxidase 4 の役割についての検討
3. 学会等名 第44回 日本脳卒中学会学術集会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 井戸 啓介
2. 発表標題 脳動脈瘤の病態における NADPH oxidase 4 の役割についての検討
3. 学会等名 日本脳神経外科学会 第77回学術総会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 井戸 啓介
2. 発表標題 脳動脈瘤形成・増大におけるNADPH oxidase 4の役割
3. 学会等名 第43回日本脳卒中学会学術集会
4. 発表年 2017年～2018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
---------------------------	-----------------------	----