

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K10120

研究課題名(和文)血管壁の極性とプロテアーゼ活性に着目した頭蓋内組織脆弱性の解析

研究課題名(英文) Analysis of intracranial tissue fragility viewed from the aspect of radial polarity of vasculature and its protease activities

研究代表者

塚 正彦 (ZUKA, MASAHIKO)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：00272956

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：法医解剖事例で観察される未破裂脳動脈瘤のうち、従来の小動脈瘤(11 mm未満)と微小動脈瘤(隣接する正常径より約2倍)に分けて、それらの頻度と分布を、脳脊髄液(CSF)の生化学的性状と併せて解析した結果、CSF中のゼラチナーゼ(galatinase A及びgalatinase B)活性が脳動脈瘤早期病変の鋭敏な指標となりうる($p<0.001$)事を以前示したが、瘤形成の進展過程におけるCSF中のゼラチン分解活性は、局所のCa調節を司る -Klotho蛋白の部位別測定値と、少なくとも初期段階では相関していなかった。小動脈-大型動脈瘤さらには巨大動脈瘤の進展及び破裂機序に関わ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

頭蓋内の組織の脆さは、異状死体の死因究明に大きく関わる。特に脳動脈瘤の進展機序の解明は、異状死と関連が深い内因性急死の予防に役立つ。本課題の研究成果は、脳脊髄液中における血管壁脆弱性に関わるゼラチナーゼA(MMP-2)の活性化が、脳脊髄液中のカルシウム濃度の制御を受けながらも、脳動脈瘤の進展過程と破裂のマーカーとなる可能性を見出したことである。この新事実が、突然死予防に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The frequency and distribution of unruptured cerebral small aneurysms and aneurysms of minimal size in forensic autopsy cases were analyzed, measuring the activities of galatinases in cerebrospinal fluid(CSF). However the results showed that gelatinolytic activities of CSF generated from gelatinase A and B can serve as good markers of early-stage cerebral aneurysm($p<0.001$), the gelatinolytic activities of CSF did not demonstrate parallels enough with the concentration of -klotho protein by which Ca deposition is controlled locally in the body. That means these Ca-dependent biochemical values of CSF can help to predict the development of cerebral aneurysms in late stages and the risk of rupture.

研究分野：法医学

キーワード：脳小動脈瘤 マトリックスメタロプロテアーゼ 脳脊髄液 粥状硬化症 カルシウム

1. 研究開始当初の背景

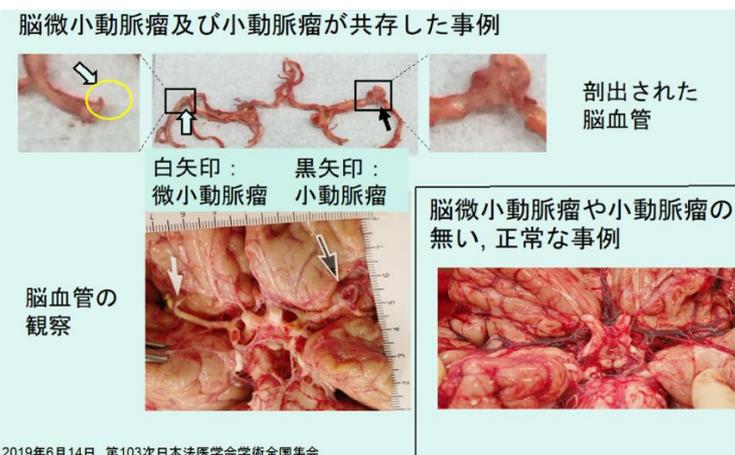
法医診断学と脳血管外科学において共通した対象である頭蓋内疾患に未破裂動脈瘤¹⁾、揺さぶられっ子症候群(shaken baby syndrome 以下 SBS と略)²⁾及び脳脊髄液減少症(癭)³⁾がある。1)は突然死や緊急手術対象の予備軍、2)は児童虐待例で、3)は2016年に保険適用後間もない為、いずれも国レベルの対応が急務にも拘わらず、基礎医学的な病態解析や法医実務対策が十分とは言い難い。また、頭蓋内環境を作る脳脊髄液(cerebrospinal fluid:以下 CSF と略)は、1日 500-600 mL 産生され常時 100-150 mL が存在することで中枢神経の周囲(脳室及びくも膜下腔)を満たすが、これもまた血液学的検査や血液生化学的検査と比較すると、未だ知られていない点が多い。

2. 研究の目的

脳動脈瘤の進展機序の解明は、異状死を含む突然死の予防に役立つと予想される。本研究の目的の一つ目は、血管内外の性質を脳血管壁の極性と捉えつつ、脳脊髄液の蛋白分解活性測定他、生化学的解析を通して、血管内圧とは異なり、脳血管外膜側即ち外部環境から血管壁全層に作用する瘤形成関与成分即ち責任分子種を同定し、二つ目は、脳脊髄液の計量及び神経組織破壊後の逸脱因子の検出に基づき、血管壁脆弱化の判定方法を脳脊髄全体に応用して、頭蓋内組織の脆弱性評価を確立する事である。

3. 研究の方法

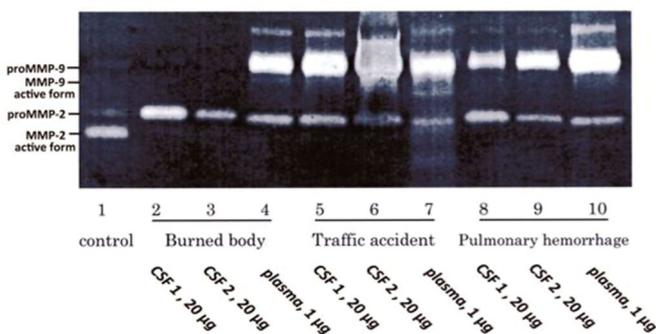
平成30年度～令和3年度の全ての期間に共通して、法医実務で採取可能な脳動脈について、隣接する正常血管の直径(外径)と比較して2倍程度以上に拡張した部位を”微小動脈瘤”と定義し、径2～10 mmの小動脈瘤と共に解析を進めた。未破裂かつ未治療の微小動脈瘤及び小動脈瘤の分布と頻度を記録し、生細胞の存在が確認可能な血管壁組織については免疫組織化学及び組織培養上清採取の上ウエスタンブロッティングによる責任分子種の同定と、各種ザイモグラフィーを行った。具体的には血清、CSF、脳血管組織及び脳脊髄実質神経組織が新鮮組織として採取され、対照である同一事例の大動脈、左右冠動脈及び左総頸動脈と同等に、総合的ゼラチナーゼ(プロテアーゼ)解析を行った。



4. 研究成果

<条件設定と脳動脈瘤の頻度・分布について>

ヒト材料を用いた解析の前提となる、新鮮材料と比較可能な対象の①死後経過時間②保存状態の目安を検討し、環境温 22℃、死後 1 日、遺体冷蔵 1 日強(併せて 2 日半)までを、蛋白分解活性評価可能期間の条件として設けることができた。ちなみに分子生物学的研究を行う場合、例えば miRNA であれば環境温 20℃、死後 1 日程度を目安にヒト材料を用いることができるとされている。以上の条件の下、法医解剖事例の死因、内因・外因のいずれに於いてもゼラチンザイモグラムで MMP-2(gelatinase A)及び MMP-9(gelatinase B)の陽性バンドを見出した。



法医解剖となった異状死体 129 事例中 45 事例(34.8%)に微小動脈瘤が認められ、実臨床で観察される頻度との解離が存在することから、多くが微小動脈瘤の状態に止まることが推定された。また、分布の上で左右中大脳動脈併せて 70%強を占め、前交通動脈+左右前大脳動脈を併せても 10%弱であり、これも実臨床との解離を埋める理由として、中期から後期にかけての脳動脈瘤の急成長が、前交通動脈と左右の前大脳動脈にこそ存在するものと思われる。因みに、脳底動脈においては 15%程度であった。

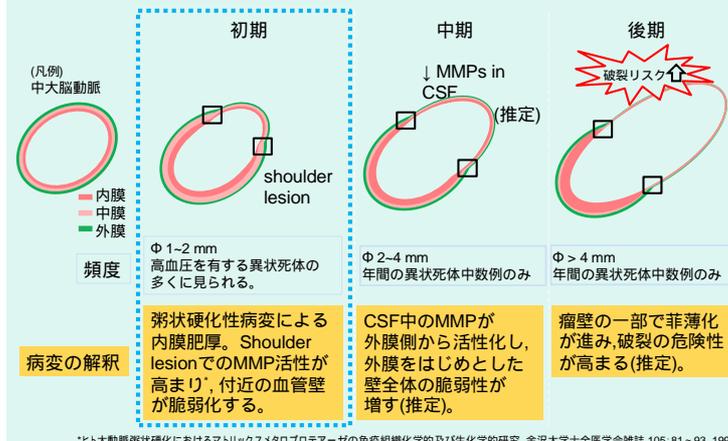
<プロテアーゼの活性化率と Ca を通した活性化メカニズム制御について>

脳槽 CSF(上図の CSF1)、側脳室 CSF(同図 CSF2) 及び血清中に各々 542~5,461 pg/mL、2,758~5,971 pg/mL 及び 600 ~5,556 pg/mL の α -Klotho 蛋白が検出された事実と併せて、頭蓋内カルシウム依存性プロテアーゼ、つまり各種ゼラチナーゼの活性化と脳動脈瘤初期病変との関係を統計学的に調べたが、現在のところ微小動脈瘤の発生頻度との有意な相関は認められなかった。

<病歴と動脈粥状硬化症について>

病歴が判明した事例で、高血圧と微小動脈瘤の合併率が、同じ動脈粥状硬化の危険因子である糖尿病や高脂血症と比較して、最も高かった。また動脈の粥状硬化性病変の辺縁つまり shoulder lesion に微小動脈瘤が合併している率も高く(20~30%)、脳動脈瘤進展初期に関して「(血管)壁自体の組織脆弱性と内腔側からの高血圧が主な要因であり、外側つまり外膜側からのプロテアーゼ活性の関与(影響)は少ない」

総括 我々が注目した初期の未破裂動脈瘤: 病期別



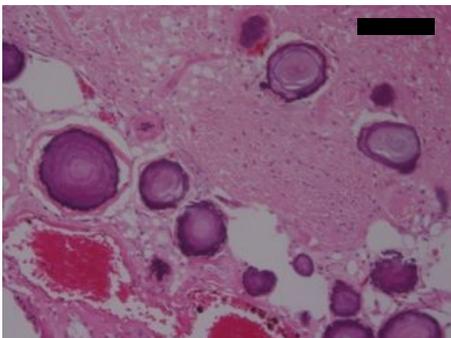
このように、血管の極性に着目し内外に分けた評価ができたことに、本研究課題の成果として大きな意義をもつものとする。

<反省点: 脳脊髄関門(blood brain barrier 以下 BBB と略)破綻と神経組織脆弱性について>
覚せい剤投与量の変化で生じるストレスが与える頭蓋冠内の神経組織脆弱性(Neurosci Lett 2018年)について検討した。

しかしながら、外因である頭部打撲の法医解剖事例を年間 10~15 例経験しながらも、5 mm 以上の未破裂動脈瘤の頻度が少なかったことや、BBB 破綻による頭蓋内出血を伴うが故に、外力が働くことが原因の神経組織脆弱性と血管壁組織脆弱性を、内因から明確に切り離して評価可能な事例に出会う機会に乏しかったために、頭蓋内組織の脆弱性を大きな括りで、つまり包括的に評価できなかったことが反省点に挙げられる。

<脳動脈瘤予防: 今後の展望について>

中期及び後期において、Ca を通した活性化メカニズム制御が介在している可能性が残っているため、全例の法医解剖事例の頭頂部で静脈洞付近の脳硬膜を採取して、局所のカルシウム貯蔵に関係する可能性がある、くも膜内の砂粒小体の定量を試みている(下図 HE 染色、中倍率 光学顕微鏡写真 Bar = 500 μm 論文準備中)。



以上のように、本研究の成果は未破裂動脈瘤の検討結果によるものが主体となったが、他にも、以下の結果を得た。

<血管壁透過性に関連した CSF の生化学的性状について>

溺死体の体腔液における元素追跡によって、溺水内の溶存態元素は胸腔液に最も反映されていた。腹腔液及び心嚢液をはさんで CSF においては溺水の成分が殆ど含まれなかった。この事実は、低酸素状態を始めとする急性期でも BBB は比較的保たれていることを支持していた。

< 動物実験モデルについて >

内因による血管壁組織脆弱性に関わる血管炎マウスモデル: IgG4 関連疾患
動脈粥状硬化症が血管内膜を主座に置く慢性炎症性疾患であるという視点から、遺伝子改変技術を利用した、血管壁脆弱性につながる実験動物モデルを検討して論文化した。

ポツリヌスの血管壁透過性

揺さぶられっ子症候群(SBS)に代表される児童虐待児の脳損傷は、生存例及び死亡例いずれもが研究期間内における事例数が少ないために、十分な検討ができなかった。そこで代替の法医解剖事例に、乳幼児突然死症候群(SIDS)を疑う法医解剖事例を対象として選び、食餌性ポツリヌス症をポツリヌス毒の消化管吸収及び血管壁透過性の検討にスピンドアウトさせ、動物実験まで行うことが出来た。

【参考】 研究期間内に脳脊髄液減少症(瘦)について、福島県立医科大学の橋本康弘らが優れた研究成果を挙げ、バイオマーカーの対象疾患を Alzheimer 病 (Metabolites 2021) や glioma(Neuro-oncology Advances 2020)にまで拡げることで、CSF を対象とした分子生物学的研究に弾みをつけている。

以上

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Waseda Y, Yamada K, Mizuguchi K, Ito K, Watanabe S, Zuka M, Ishizuka T, Malissen M, Malissen B, Kawano M, Matsui S.	4. 巻 16
2. 論文標題 The pronounced lung lesions developing in LATY136F knock-in mice mimic human IgG4-related lung disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0247173
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0247173.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 中田 理, 竹内敬久, 塚 正彦.	4. 巻 149
2. 論文標題 金沢東署管内最近10年間における浴槽内死亡の検案事例のまとめ.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本医師会雑誌	6. 最初と最後の頁 1086-1089
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takeichi T, Hori O, Hattori T, Kiryu K, Zuka M, Kitamura O.	4. 巻 703
2. 論文標題 Pre-administration of low-dose methamphetamine enhances movement and neural activity after high-dose methamphetamine administration in the striatum.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurosci Lett	6. 最初と最後の頁 119-124
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neulet.2019.03.023.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 濱野正嘉, 五十嵐義幸, 七條美里, 永江圭吾, 濱 隆昭, 松見泰輝, 清水 功, 美邊 暁, 青山 崇, 舟山一寿, 武市敏明, 高塚尚和, 塚 正彦.	4. 巻 62
2. 論文標題 石川県と新潟県における溺死体の傾向及び珪藻プランクトン検査結果の比較.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 法医学の実際と研究	6. 最初と最後の頁 129-137
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamada K, Zuka M, Ito K, Mizuguchi K, Kakuchi Y, Onoe T, Suzuki Y, Yamagishi M, Izui S, Malissen M, Malissen B, Kawano M.	4. 巻 13
2. 論文標題 LatY136F knock-in mouse model for human IgG4-related disease.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0198417
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0198417.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 塚 正彦, 美邊 暁, 濱野正嘉, 阿松 翔.
2. 発表標題 北陸の異なる場所で発見される水中死体を対象としたプランクトン検査の意義.
3. 学会等名 第104次日本法医学会学術全国集会.
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 塚 正彦, 阿松 翔, 美邊 暁
2. 発表標題 禁忌薬の使用により死亡したバーター症候群の一例.
3. 学会等名 第42回日本法医学会学術中部地方集会.
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 阿松 翔, 塚 正彦
2. 発表標題 ボツリヌス毒素複合体の無毒成分による細胞増殖促進機構の解析.
3. 学会等名 第104次日本法医学会学術全国集会.
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中田 理, 竹内敬久, 塚 正彦.
2. 発表標題 金沢東署管内最近10年間における浴槽内死亡の検案事例のまとめ.
3. 学会等名 令和元年度都道府県医師会「警察活動に協力する医師の部会(仮称)」学術大会.
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 塚 正彦, 武市敏明, 北廣雅絵.
2. 発表標題 未破裂動脈瘤における法医資料を用いたプロテアーゼ活性評価の試み.
3. 学会等名 第103次日本法医学会学術全国集会.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 濱野正嘉, 五十嵐義幸, 美邊 暁, 青山 崇, 舟山一寿, 武市敏明, 高塚尚和, 塚 正彦.
2. 発表標題 未破裂動脈瘤における法医資料を用いたプロテアーゼ活性評価の試み.
3. 学会等名 第103次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿松 翔, 塚 正彦.
2. 発表標題 乳児ボツリヌス症検索の試みとB型ボツリヌス毒素複合体ヘマグルチニン成分の解析.
3. 学会等名 第103次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塚 正彦, 阿松翔, 美邊 暁.
2. 発表標題 六月下旬に井戸の底で発見された 高齢女性の水中死体の一例.
3. 学会等名 第41回日本法医学会学術中部地方集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masae Kitahiro, Toshiaki Takeichi, Satoru Minabe, Masahiko Zuka.
2. 発表標題 Evaluation of proteinase activity of brain aneurysms using tissue culture media from forensic medicine sample.
3. 学会等名 24th Congress of the International Academy of Legal Medicine. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 阿松 翔, 塚 正彦.
2. 発表標題 糞便サンプルからのボツリヌス菌の検出方法の検討.
3. 学会等名 第105次日本法医学会学術全国集会.
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 栄田貴弘, 美邊 暁, 眞塩麻彩実, 村上貴哉, 長谷川浩, 塚 正彦.
2. 発表標題 プランクトン検査に代わる新規溺水マーカーの探索.
3. 学会等名 第43回日本法医学会学術中部地方集会.
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 塚 正彦, 阿松 翔, 栄田貴弘, 萩原早織, 三浦琴美, 美邇 暁.
2. 発表標題 真性多血症による脾破裂の一部検例.
3. 学会等名 第105次日本法医学会学術全国集会.
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masahiko Zuka, Toshiaki Takeichi, Satoru Minabe, Masae Kitahiro.
2. 発表標題 A case of unusual death due to stinging by Hymenoptera vespidae.
3. 学会等名 24th Congress of the International Academy of Legal Medicine. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toshiaki Takeichi, Masae Kitahiro, Satoru Minabe, Osamu Kitamura, Masahiko Zuka.
2. 発表標題 Expression of vesicular glutamine transporter 2 in the thalamus of depressive and non-depressive suicide victims.
3. 学会等名 24th Congress of the International Academy of Legal Medicine. (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>金沢大学医薬保健学域医学系 法医学 News http://legalmed.w3.kanazawa-u.ac.jp</p>

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
研究 分 担 者	武市 敏明 (TAKEICHI TOSHIAKI) (90460360)	杏林大学・医学部・助教 (32610)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関