

平成21年3月31日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号19390381
 研究課題名（和文） 脳動脈瘤形成におけるエストロゲンの作用とその分子生物学的機構
 研究課題名（英文） Role of estrogen deficiency in the formation and progression of cerebral aneurysms
 研究代表者 永廣 信治（NAGAIRO SHUNJI）
 徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授
 研究者番号：60145315

研究成果の概要：

頸動脈脈内膜剥離術の至適な施行時期を解析するため、発症後一週以内の急性期とそれ以後の慢性期に手術により摘出したプラークを免疫組織学的に安定性/不安定性プラークに分類した。さらにプラーク中の酸化LDLおよびマトリックスメタロプロテナーゼ-9（MMP-9）の含有量や活性を測定し、免疫組織学的にこれらの局在を調べた。頸動脈狭窄症例の発症早期に酸化LDL含量やMMP-9の活性が、慢性期に摘出したプラークに較べて上昇していることを明らかにした。さらに酸化LDLのマクロファージへの取り込みに関与するプロテオグリカン蛋白発現量およびその局在を評価している。従来頸動脈脈内膜剥離術は症状の安定を待って手術が施行されていた。しかし頸動脈狭窄症例では発症早期により強い酸化ストレスや炎症性変化があることを示した。本研究結果から、発症早期に手術を行うことが妥当であることを示唆した。この所見については Journal of Vascular Surgery に投稿し、受理された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	10,600,000	3,180,000	13,780,000
2008年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：脳動脈瘤、エストロゲン、高血圧、酸化ストレス、炎症

1. 研究開始当初の背景
 脳動脈瘤壁の構造や機能に関する組織

学的研究は国内外で広く行われてきたが、その治療や予防に関連づけた実験的研究

は少ない。実験脳動脈瘤モデルが日本で開発された(橋本のモデル)事もあり、実験的研究は主に日本国内で行われ、世界に向けて多くの情報を発信してきた。さらに卵巣摘出というエストロゲン欠乏状態下で脳動脈瘤の発生や内皮細胞機能、血管壁の不安定化機序などを検討する研究は我々のグループのオリジナルであり、国内外にも例はない。本研究により脳動脈瘤発生の分子生物学的な解明が進めば、脳動脈瘤の基礎的・臨床的研究だけでなく、治療や予防上にも飛躍的發展をもたらすと思われる。

脳動脈瘤の形成は多因子が関与し、その発生、増大、破裂に至るメカニズムはほとんど解明されていない。一旦発症すると50%が致死的な経過をたどるため動脈瘤形成のメカニズムを解明し、早期発見や破裂予防対策を構築することが求められる。そこで、くも膜下出血、脳動脈瘤が閉経後の女性に多いという疫学的事実から我々は卵巣摘出を加えた再現性よく高率に脳動脈瘤を発生するモデル動物(ラット)を開発した(J Neurosurg. 2005, 103: 1046-51)(Fig. 1A)。閉経、エストロゲン欠乏状態という生理現象を人工的に起こすことによって脳動脈瘤を誘発する我々のモデルはヒトの脳動脈瘤の発生、増大の自然経過により近いモデルといえる。このモデルを用いて血管の鋳型(vascular corrosion cast)を作製し、血管内皮の形態的变化から脳動脈瘤形成の過程をステージ分類した。さらにこの動物モデルに17 β -estradiolによるホルモン補充療法(HRT)をおこない動脈瘤形成が頻度およびサイズが抑制されることを確認し、動脈瘤形成におけるエストロゲンの関与とホルモン補充療法の治療効果を明らかにしている(J Neurosurg. 2005 103:1052-7)(Fig. 1B)。

2. 研究の目的

Estradiolの作用は多面的であり発癌性などの副作用の面から臨床使用には、さらに解決すべき課題があるが、これまでの実験結果からその血管保護作用、動脈瘤形成との関連は明らかである。よって脳動脈瘤形成の成因と抑制に関与するメカニズムを解明するためにエストロゲンの作用を中心に研究を進める。

本研究の特色は脳動脈瘤の成因と動脈瘤壁の不安定性機序について、我々が新しく開発した実験動物モデルにおいて検討する点である。特にエストロゲン欠乏状態という内分泌環境異常や血管機能修飾下の状態での検討は極めて独創的といえる。動脈瘤の増大機序や壁の不安定化とリモデリングについては従来から積極的に研究に取

り組んでおり、今回新しい実験動脈瘤モデルを用いることにより、脳動脈瘤の形成や増大機序がさらに明らかになり、脳動脈瘤の新治療をもたらす極めて意義のある研究と考えられる。

さらに、高脂血症改善薬である statin は抗炎症、抗酸化作用など血管保護作用を有するとされており、閉経期にエストロゲンとの併用効果が示唆されている。エストロゲンの副作用軽減と効果増強が可能かどうかについても評価する。

3. 研究の方法

1) エストロゲン欠乏による脳動脈瘤形成の分子機構と薬物治療

a) 脳動脈瘤形成・増大におけるエストロゲンの作用についての分子機構解明
我々が新たに確立した実験脳動脈瘤モデルを用いてエストロゲン欠乏状態が脳動脈瘤形成および増大におよぼす分子機構を明らかにする。これまでの実験結果より脳動脈瘤の発生は卵巣摘出後早い時期にまず血管内皮傷害が生じ、その後増大すると推察されるが、これまでに脳動脈瘤発生から増大までの経時変化についての実験的研究はなされていない。そこで異なる誘発期間 corrosion cast を作製し、各期間での血管壁の形態的变化を観察し比較・検討する。さらに脳動脈瘤形成の各ステージでの血管壁の組織学的変化、血管内皮機能評価(一酸化窒素系および活性酸素系の動態)、炎症細胞の浸潤、炎症関連分子や細胞増殖シグナル関連蛋白の発現を免疫組織染色や蛍光組織染色および定量 RT-PCR による mRNA 発現により評価する。

b) 脳動脈瘤形成における eNOS の関与

エストロゲンの血管に対する作用の一つとして内皮由来の NO 産生亢進が知られており、内皮由来の NO には血管弛緩作用、抗炎症作用、抗酸化作用などの血管保護作用がある。また我々のデータからも脳動脈瘤誘発ラットの頭蓋内血管では血管内皮 NO 産生酵素(eNOS)の mRNA が低下していることがわかっている(Fig. 2)。そこで eNOS knock out mouse を用いて動脈瘤モデルを作製しエストロゲンの一酸化窒素系を介した血管保護作用について検討する。

c) ヒト血管での検討

エストロゲンなど性ホルモンの血管に対する影響は全身の血管に起こっていると考えられ、ヒトの血管と脳動脈瘤壁の検討を行う。当施設で開頭術施行例のうちインフォームドコンセントが得られ、浅側頭動脈が採取可能な症例から血管組織を採取する。対

象症例の画像診断から動脈瘤群と非動脈瘤群に分け、血中 estradiol 濃度および血管組織のエストロゲンレセプター、eNOS の蛋白および mRNA 発現を免疫組織染色および定量 RT-PCR により評価し比較する。また脳動脈瘤壁が採取できた症例においては脳動脈瘤壁の検討を行う。

2) 薬物治療による脳動脈瘤形態変化の解析

我々は動物実験において 17β estradiol を用いた HRT の脳動脈瘤抑制効果を報告した (J Neurosurg, 2005 103:1052-7)。しかし HRT については重大な副作用が大規模臨床試験から報告されており、将来、臨床的に脳動脈瘤の予防に用いる際、治療開始時期や年齢、投与期間について詳細な検討が必要である。これまでの実験結果より脳動脈瘤の初期形成はエストロゲンが急激に低下する卵巣摘出後早期であると考えられる。そこで HRT の投与最適時期を検討するため卵巣摘出直後から 1ヶ月間 HRT を行い、これまでと同じ評価時期である 2ヶ月後に脳動脈瘤の発生頻度や大きさを評価する。②また降圧作用に加え血管保護作用のある angiotensin II type I receptor blocker (ARB) と③最近、心血管系疾患の予防効果が注目されている selective aldosterone receptor antagonist (SARA) の投与を行い、脳動脈瘤の頻度やサイズを評価し、脳動脈瘤の発生・予防の相乗効果について明らかにする。

4. 研究成果

脳動脈瘤壁の構造や機能に関する組織学的研究は国内外で広く行われてきたが、その治療や予防に関連づけた実験的研究は少ない。脳動脈瘤の形成は多因子が関与し、その発生、増大、破裂に至るメカニズムはほとんど解明されていない。エストロゲン欠乏、高血圧、血液動態変化を誘発した雌性ラットを用いて、脳動脈瘤の発生、増大にいたる機序としての内皮細胞機能異常、血管壁の不安定化に関わる分子機構について検討した。エストロゲンの血管に対する作用の一つとして内皮由来の NO 産生亢進が知られており、血管弛緩作用、抗炎症作用、抗酸化作用などの血管保護作用を示す。脳動脈瘤誘発ラットの頭蓋内血管では血管内皮 NO 産生酵素 (eNOS) の mRNA が低下しており、angiotensin II および NADPH oxidase subunit である NOX4 や p22^{phox} の上昇が免疫組織学的に認められたことから renin-angiotensin 活性化により、脳動脈瘤壁では血管機能低下や酸化ストレスを強く受けていることが推察された。さらにエストロゲン補充療法 (HRT) や angiotensin type I 受容体ブロッカー (ARB) を用いて脳動

脈瘤形成に対する抑制効果を調べ、HRT では血管内皮傷害が抑制され、ARB では脳動脈瘤形成が抑制されることを認めた。これらの結果から、脳動脈瘤形成には血管内皮機能異常や酸化ストレスによる血管内皮傷害に加えて、高血圧による脳動脈瘤増大作用が寄与すると考えられた。上記の知見に加えて脳動脈瘤壁の血管内皮細胞では angiotensin II やエストロゲンβ受容体の発現が上昇していたが、エストロゲンα受容体の発現が低下していることを認めた。そこで血管内皮細胞を用いてエストロゲン存在下と非存在下での angiotensin II 刺激による eNOS, angiotensin II type I 受容体 (AT1R), および type2 受容体 (AT2R) の発現を調べた。エストロゲン存在下では非存在下に較べて eNOS および AT2R 発現は高く、AT1R 発現は低かった。またこの作用は angiotensin II で刺激すると eNOS および AT2R 発現は低下し、AT1R 発現は増加した。またこれらの結果と関連して NOX4 や p22^{phox} の発現増加がみられた。さらにエストロゲンα受容体阻害剤を用いてこれらの作用がα受容体依存的であることを確認した。以上の所見から脳動脈瘤発現部位ではエストロゲンα受容体発現低下による eNOS 低下や AT1R の活性化から酸化ストレスが高まり、内皮傷害が生じ、そこに高血圧と血液動態変化による負荷がかかると脳動脈瘤が形成、増大すると考えられた。2年間の研究結果をまとめ Journal of hypertension に投稿し、2009年1月に受理された。なお eNOS ノックアウトマウスを用いての脳動脈瘤研究を現在検討しているところである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文) (計4件)

1. Yagi K, Kitazato KT, Uno M, Tada Y, Kinouchi T, Shimada K, Nagahiro S, Edaravone, a free radical scavenger, inhibits MMP-9-related brain hemorrhage in rats treated with tissue plasminogen activator, Stroke (査読有), 40: 626-631, 2009
2. Tamura T, Jamous MA, Kitazato KT, Yagi K, Tada Y, Uno M, Nagahiro S. Endothelial damage due to impaired NO bioavailability triggers cerebral aneurysm formation in female rats-Endothelial damage and cerebral aneurysm. J Hypertens (査読有) 掲載予定, 2009
3. Liu H, Kitazato KT, Uno M, Yagi K, Kanematsu Y, Tamura T, Tada Y, Kinouchi T, Nagahiro S, Protective mechanisms of

the angiotensin II type 1 receptor blocker candesartan against cerebral ischemia: in-vivo and in-vitro studies, Journal of Hypertension (査読有), 26(7): 1435-1445, 2008

4. Jamous MA, Nagahiro S, Kitazato KT, Tamura T, Aziz HA, Shono M, Satoh K, Endothelial injury and inflammatory response induced by hemodynamic changes preceding intracranial aneurysm formation: experimental study in rats, J. Neurosurg. (査読有), 107: 405-411, 2007

[学会発表] (計5件)

1. Tada Y, Yagi K, Kitazato KT, Tamura T, Kinouchi T, Nakajima N, Matsubara S, Uno M, Nagahiro S. Down-regulation of tight junction proteins triggers and promotes cerebral aneurysms formation in rats. 6th World Stroke Congress, 2008. 9. 24-27, Vienna, Austria
2. Nagahiro S, Tamura T, Yagi K, Tada Y, Jamous MA, Uno M, Nakajima N, Matsubara S, Kitazato KT. WHAT SHOULD WE DO TO PREVENT CEREBRAL ANEURYSM FORMATION AND PROGRESSION? 6th World Stroke Congress, 2008. 9. 24-27, Vienna, Austria
3. Yagi K, Kitazato KT, Tada Y, Tamura T, Nakajima N, Matsubara S, Nagahiro S. LEUKOCYTE ADHESION MOLECULES CONTRIBUTE TO THE DEVELOPMENT OF CEREBRAL ANEURYSMS IN RATS. 6th World Stroke Congress, 2008. 9. 24-27, Vienna, Austria
4. Kitazato KT, Uno M, Yagi K, Liu H, Tamura T, Tada Y, Kinouchi T, Shimada K, Nagahiro S. SYSTEMIC- AND FOCAL EFFECTS OF CANDESARTAN AGAINST CEREBRAL ISCHEMIA, 6th World Stroke Congress, 2008. 9. 24-27, Vienna, Austria
5. Tamura T, Kitazato K, Tada Y, Yagi K, Nagahiro S. Synergistic effect of hypertension and estrogen deficiency contribute to endothelial dysfunction and increase the risk for cerebral aneurysm formation in rats. 2007 Congress of Neurological Surgeons Annual Meeting, 2007.9.15-20, San Diego, USA

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

国際特許・PCT/JP2008/064639

国際公開番号 WO2009/022740 A1

発明の名称: イブジプラストを有効成分とする脳動脈瘤の予防、形成抑制又は治療剤
発明者: 永廣信治・徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授
権利者: 下河辺尚史・杏林製薬株式会社

○取得状況 (計0件)

[その他]

無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永廣 信治 (NAGAIRO SHINJI) ・徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授・研究者番号: 60145315

(2) 研究分担者

松原 俊二 (MATSUBARA SHUNJI) ・徳島大学・医学部・歯学部附属病院・講師・研究者番号: 60294675

西 京子 (NISHI KYOKO) ・徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・講師・研究者番号: 60335817

中嶋教夫 (NAKAJIMA NORIO) ・徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教・研究者番号: 00332817

(3) 連携研究者

無し