

平成21年 3月31日現在

研究種目：基盤研究 (C)	
研究期間：2007～2008年度	
課題番号 19561682	
研究課題名 (和文)	脳動脈瘤形成と破裂および抑制における炎症性因子関与について
研究課題名 (英文)	Contribution of inflammatory factors on cerebral aneurysm formation and rupture
研究代表者	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

## 研究成果の概要：

脳動脈瘤形成初期から炎症性マーカーを指標に脳動脈瘤形成と炎症との関係を調べ、血管壁の炎症性変化の抑制が脳動脈瘤形成抑制に寄与するかどうかを解析し、炎症性変化における白血球接着因子の役割を検討した。電子顕微鏡による内皮細胞形態と脳動脈瘤形成との関連性を解析し、また顕微鏡下で摘出した脳血管の血管壁障害に関わる白血球遊走・接着因子である MCP-1, P-selectin, E-selectin, cellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) および P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) や炎症関連分子である TNF- $\alpha$  の mRNA を定量 RT-PCR にて測定した。また免疫組織染色で P-selectin, E-selectin, ICAM-1, VCAM-1 や MMP-9 の発現分布を観察し、血管壁の炎症性変化の推移と脳動脈瘤形成の関連性を解析した。脳動脈形成初期から増大に相関して接着因子、炎症関連分子の発現が転写レベルから増加しており、脳動脈形成および増大において炎症性変化が大きく寄与することを明らかにし、この発現を抑制することにより脳動脈瘤形成が抑制できれば治療に有用と想われた。そこで白血球接着因子の発現抑制を示す可能性がある薬物として ibudilast を使用し、動脈瘤形成が抑制されるかどうか評価した。Ibudilast は非選択的に phosphodiesterase 4 (PDE4) 阻害作用を有しており、抗炎症作用を示すことが報告されている。免疫組織学的評価では動脈瘤壁では上記の炎症関連分子に加えて、PDE4 が強く発現することを確認した。Ibudilast 投与群では未治療群に較べて動脈瘤用変化の内皮傷害や動脈瘤形成頻度が低下した。この抑制効果と相関して動脈瘤好発部位血管壁での P-selectin, E-selectin, ICAM-1 や TNF- $\alpha$  の mRNA 発現が低下した。またこれらの分子は血管内皮細胞で発現がみられたことからさらに血管内皮細胞を用いて TNF- $\alpha$  刺激下での P-selectin, E-selectin, ICAM-1 発現が Ibudilast により抑制されることを明らかにした。これらの結果から動脈瘤形成には PDE4 活性化による炎症性変化も寄与していることが示唆された。以上の結果を国際学会 2008 stroke で発表後、英文誌に投稿中である。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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、炎症性サイトカイン、血管内皮、不安定性、接着因子

## 1. 研究開始当初の背景

### 国内外の関連する研究の中での位置づけ

卵巣摘出というエストロゲン欠乏状態で脳動脈瘤の発生や内皮細胞機能、壁の不安定化機序などを検討した研究は殆ど国内外にみられず、脳動脈瘤の基礎的・臨床的研究に飛躍的發展をもたらすと思われる。

### これまでの研究成果と発展させる内容

我々は中高年の女性に脳動脈瘤が多いことに注目し、雌ラットで腎動脈結紮・生理食塩水経口投与（高血圧誘発）と一側頸動脈結紮（血流ストレス誘発）後に両側卵巣を摘出し（橋本らのモデル）にエストロゲン欠乏状態をつくることを加味して脳動脈瘤を発生させる新しい動物モデルを開発した（J Neurosurg. 2005;103:1046-51.）。さらにこの動物モデルに  $17\beta$ -estradiol によるホルモン補充療法をおこない動脈瘤形成が抑制されることも確認し、動脈瘤形成におけるエストロゲンの関与を示した（J Neurosurg. 2005 Dec; 103(6): 1052-7）。脳動脈瘤が一度形成されると破裂予防のために確立された治療は現在のところ手術のみしかない。よって動脈瘤の発生予防または発生した動脈瘤増大の予防（サイズ依存性に破裂率が増すため）が重要であると思われる。脳動脈瘤の発生と増大・破裂は他のさまざまな因子が関与するが、血管壁の不安定化をもたらす炎症性因子に注目し、このエストロゲン欠乏モデルを用いて脳動脈瘤の成因と壁の不安定性の分子機序について研究を進める。

## 2. 研究の目的

動脈瘤症例の病巣および血液サンプルを解析した結果、炎症性細胞や炎症マーカーの変化が認められている。破裂あるいは未破裂動脈瘤を解析し、動脈瘤壁内の T リンパ球やマクロファージの存在を示し、これらの浸潤が平滑筋やコラーゲン繊維の傷害や減少と関係があるとされている。しかし、脳動脈瘤の初期変化から継時的に炎症性変化を調べた研究や、炎症を抑制した場合に動脈瘤の進展が抑制されたという証明はされていない。本研究では脳動脈瘤形成初期から炎症性マーカーを指標に脳動

脈瘤形成との関係を調べ、また抗炎症作用のあるとされる薬剤を用いて脳動脈瘤形成がどの段階で抑制されるかについて解析する。未破裂動脈瘤から破裂動脈瘤に至る過程を明らかにできれば、くも膜下出血を防ぐ治療へと発展する可能性がある。

## 3. 研究の方法

### 1) 動脈と動脈瘤壁の機能維持・不安定性に関わる分子機構の解明

当施設で開発した実験脳動脈瘤モデルにおいて、動脈と動脈瘤壁の機能維持および不安定化に関わる分子について明らかにする。電子顕微鏡による内皮細胞形態と動脈瘤の大きさを確認する（J Neurosurg. 2005 Mar;102(3):532-5.）。血管壁の炎症関連分子の発現を免疫組織染色、mRNA 量変化および血液バイオマーカーなどで調べる。

### 2) 薬物治療による脳動脈瘤形態変化の解析

当教室では両側後腎動脈結紮+右内頸動脈結紮+両側卵巣摘出+NaCl 経口負荷により脳動脈瘤の rat model を作製し（J Neurosurg. 2005;103:1046-51.）、動脈瘤形成に関与するさまざまな因子について検討を行い、初期変化として血管内皮の変化を認め、estrogen 補充療法により動脈瘤の形成を抑制できる可能性を示す結果を得ている（J Neurosurg. 2005 103: 1052-7）。

一方、脳動脈瘤の形成における初期変化として血管壁の炎症の関与が考えられ、これを抑制すれば動脈瘤形成および進展を防ぐ可能性がある。薬物治療により炎症性マーカーの変化と脳動脈瘤形成抑制との関連性を調べる。

### 3) ヒト血液の解析

ヒトにおいて脳動脈瘤出現・増大に関与する血管壁炎症のバイオマーカーを探究する。これにより、増大する不安定脳動脈瘤を血中バイオマーカーを指標に判別し、早期に積極的手術が必要となる患者をスクリーニング可能かどうか評価する。また脳動脈瘤に対する内科的治療のターゲットを発見し、治療の糸口を開く。

## 3. ヒト血液の解析

脳動脈瘤モデルラットでの結果から脳動脈瘤に形成および進展の指標となるバイオマーカーについてヒト脳動脈瘤患者の血液サンプルについても解析し、



血管壁障害と血中バイオマーカーが脳動脈瘤の発生、進展に関連しているか否か検証する。(佐藤、永廣、宇野)

#### 4. ヒトの脳動脈瘤患者からの血中バイオマーカーの解析

ヒトの脳動脈瘤患者で採血により検索する時は事前に十分なインフォームドコンセントを行い、同意書を得る。(永廣、西)。

(平成20年度以降)

#### 1. 薬物治療による脳動脈瘤形態変化の解析

前年に引き続き脳動脈瘤モデルラットにおいて、脳動脈瘤にお炎症関連分子の発現と変動について、各分子の抗体を用いた免疫組織染色や蛍光組織染色および mRNA 量変化などで調べる。特定の原因物質が発見できれば、ノックアウトマウスを用いて検証する。(佐藤、永廣、松原)

#### 2. ヒト脳動脈瘤における検討

前年度の研究を続ける。(宇野、西)

#### 3. 研究の総括と論文作成

新しい実験脳動脈瘤モデル動物とヒトにおける脳動脈瘤壁障害・炎症から、脳動脈瘤の成因や増大機序の解明に迫る。その成果は学会や誌上で発表する(佐藤、宇野、永廣)。

#### 4. 脳血管内皮細胞および平滑筋細胞におけるエストロゲン欠損下での炎症関連分子の変化

脳動脈瘤モデルラットでの研究結果を踏まえ、脳血管内皮細胞および平滑筋細胞系を用いて脳動脈瘤形成、進展に関与する炎症関連分子についてエストロゲン欠損下における影響を解析する(佐藤、宇野、永廣)。

#### 4. 研究成果

脳動脈瘤形成初期から炎症性マーカーを指標に脳動脈瘤形成と炎症との関係を調べ、血管壁の炎症性変化の抑制が脳動脈瘤形成抑制に寄与するかどうかを解析し、炎症性変化における白血球接着因子の役割を検討した。電子顕微鏡による内皮細胞形態と脳動脈瘤形成との関連性を解析し、また顕微鏡下で摘出した脳血管の血管壁障害に関わる白血球遊走・接着因子である MCP-1, P-selectin, E-selectin, cellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) および P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) や炎症関連分子である TNF- $\alpha$  の mRNA を定量 RT-PCR にて

測定した。また免疫組織染色で P-selectin, E-selectin, ICAM-1, VCAM-1 や MMP-9 の発現分布を観察し、血管壁の炎症性変化の推移と脳動脈瘤形成の関連性を解析した。脳動脈瘤形成初期から増大に相関して接着因子、炎症関連分子の発現が転写レベルから増加しており、脳動脈瘤形成および増大において炎症性変化が大きく寄与することを明らかにし、この発現を抑制することにより脳動脈瘤形成が抑制できれば治療に有用と想われた。そこで白血球接着因子の発現抑制を示す可能性がある薬物として ibudilast を使用し、動脈瘤形成が抑制されるかどうか評価した。Ibudilast は非選択的に phosphodiesterase 4 (PDE4) 阻害作用を有しており、抗炎症作用を示すことが報告されている。免疫組織学的評価では動脈瘤壁では上記の炎症関連分子に加えて、PDE4 が強く発現することを確認した。Ibudilast 投与群では未治療群に較べて動脈瘤用変化の内皮傷害や動脈瘤形成頻度が低下した。この抑制効果と相関して動脈瘤好発部位血管壁での P-selectin, E-selectin, ICAM-1 や TNF- $\alpha$  の mRNA 発現が低下した。またこれらの分子は血管内皮細胞で発現がみられたことからさらに血管内皮細胞を用いて TNF- $\alpha$  刺激下での P-selectin, E-selectin, ICAM-1 発現が Ibudilast により抑制されることを明らかにした。これらの結果から動脈瘤形成には PDE4 活性化による炎症性変化も寄与していることが示唆された。以上の結果を国際学会 2008 stroke で発表後、英文誌に投稿中である。

#### 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 1 件)

1. Uno M, Nagahiro S 他 3 名, Edaravone, a free radical scavenger, inhibits MMP-9 related brain hemorrhage in rats treated with tissue plasminogen activator, Xth International Symposium on Thrombolysis and Acute Stroke Therapy, Sep 21-23, 2008, Budapest, Hungary

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

永廣 信治(NAGAIHIRO 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

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

宇野 昌明(UNO MASAOKI)・徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授・研究者番号: 90232884

中畠 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