

平成 22 年 4 月 28 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19591705

研究課題名（和文） 脳動脈瘤の発生・増大機序の解明：脳動脈瘤モデルを用いて

研究課題名（英文） Mechanism of initiation and development of cerebral aneurysm:  
Using cerebral aneurysm model

研究代表者

糟谷 英俊（Kasuya Hidetoshi）

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：50169455

研究成果の概要（和文）：大型動物（イヌ）での脳動脈瘤モデルの確立を目的とした。メスのビーグル犬 11 頭用い、動脈瘤誘発のため実験的高血圧、頸動脈結紮、aminopropionitrile を行った。血管造影は、3 ヶ月ごとに 1 年 3 ヶ月。負荷群のうち一頭で、3 ヶ月後の血管造影にて、脳底動脈先端部に動脈瘤を認め、その後だんだんと動脈瘤は増大していった。病理組織学的所見において、壁は非常に薄くフィブリノイドの沈着を認め、内弾性板はひ薄化や断裂がみられた。中膜筋層は、筋細胞の配列の乱れや筋層の消失をみとめた。ヒト脳動脈瘤に極めて近いと考えられた。今後、さらに効率の良い方法を検討し、イヌ脳動脈瘤モデルを確立する。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to establish cerebral aneurysm model in dogs for the study of initiation and development of cerebral aneurysm. Cerebral aneurysms were induced by the treatment of ligation of the common carotid and renal artery, experimental hypertension and -aminopropionitrile feeding using eleven dogs. Cerebral angiography was performed every three months till 15 months. One animal in the treated group show saccular cerebral aneurysm visualized by cerebral angiography at basilar bifurcation at three months and gradually developed. Histologically, the aneurysm wall was very thin deposited with fibrinoid, internal elastic lamina became thinner and had splits, and number of smooth muscle cells decreased with disturbed arrangement. Thus, this cerebral aneurysm model is similar to that of human. We would like to continue this work for efficiently producing cerebral aneurysm model in large animal.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学脳

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：cerebral aneurysm, subarachnoid hemorrhage, canine, model, initiation, development, rupture

## 1. 研究開始当初の背景

### i 脳動脈瘤は成人の5%に存在する

脳動脈瘤はまれな疾患ではなく、成人の5%が有することが明らかとなってきた。また、脳ドックやMRIの普及で脳血管が簡単にスクリーニングされ、未破裂脳動脈瘤が発見されることが多くなってきている。破裂すると致死率の高い疾患だけに、その対応が問題となる。1998年と2003年に、未破裂脳動脈瘤国際共同研究 ISUIA (international study for unruptured intracranial aneurysm)は、これまで考えられていたほど未破裂脳動脈瘤の出血率が高くないことを報告している。特に、Willis輪前半に発症する7mm以下の未破裂脳動脈瘤の出血率はきわめて低かった。破裂は脳動脈瘤の大きさに関係することも明らかとなった(N Eng J Med 339:1725-1733, 1998, Lancet 362:103-10, 2003)。現在日本においても、未破裂脳動脈瘤の出血率について他施設共同研究が行われている。一方、くも膜下出血患者の破裂脳動脈瘤の多くは10mm以下であるために、偶然発見される未破裂脳動脈瘤と、破裂脳動脈瘤はその発生機序が異なるのではないとも考えられる。脳動脈瘤には、だんだん大きくなって破裂するタイプ、大きくならずにそのままのタイプ、出現して小さいまま出血するタイプなどが存在する可能性がある。脳動脈瘤の形成過程を解明することはきわめて重要な課題である。

### ii 未破裂脳動脈瘤の治療

未破裂脳動脈瘤の治療現在脳神経外科医を悩ませている大きな問題であり、最大の関心事といえる。まず、治療すべきかどうか？どのような症例に対して治療すべきか？開頭手術と血管内治療があるが、ともにリスクは少なからず存在し、できれば後者がよいというのが患者の本音である。出血しやすい脳動脈瘤を判別し、出血するリスクを下げ、治癒させることができるような薬を開発することが、本研究の最終目的である。この夢のようなストーリーはあながち夢ではない。昨年のNat Med 11:1330-8, 2005にラット大動脈瘤モデルにおいてc-Jun N-terminal kinaseを抑制することで、大動脈瘤の進行を遅らせるばかりか治癒に向かわせるとの報告があった。動脈瘤の構造や成因は異なるが、関連する疾患とも言える。

### iii 脳動脈瘤の成因：ゲノムからの解析

我々は世界に先駆けて、脳動脈瘤罹患同胞104対を用いてゲノム全域にわたり連鎖解析を行った。結果、第5番染色体(5q22-31)、第7番染色体(7q11)、第14番染色体(14q22)に疾患との連鎖を認めた。連鎖解析の結果に基づき、最も疾患との連鎖が強い第7番染色体にあるマーカー(D7S2472)近傍、4.6Mbに渡り、168カ所のSNP(single nucleotide polymorphism; 一塩基多型)を利用して関連解析およびハプロタイプ解析を行った。これにより、ELNの3' UTRからLIMK1全域にかけてのLD block内に疾患感受性領域があることが判明した。さらにELNの3' UTR内に疾患と有意に関連するSNP(G(+639)C)を同定できた。このSNPは、ELNとLIMK1の転写量に影響を及ぼす2カ所の機能的SNPを含むat-risk haplotypeのtag SNPであった(Am J Hum Genet 69:804-819, 2002, Hum Mol Genet 15:1722-1734, 2006)。現在、これらの結果を基に、脳動脈瘤の成因解明へ至るアプローチを検討している。

### iv 脳動脈瘤壁の病理とDNAマイクロアレイ解析

一方、これまで脳動脈瘤壁の病理学上の特徴は、マクロファージの血管壁への浸潤といえる(Stroke 30:1396-1401, 1999, Stroke 35:2287-2293, 2004)。我々は、平成17,18年度科学研究費補助金を用いて、手術で採取した脳動脈瘤壁の遺伝子発現の特徴を解析してきた。脳動脈瘤の壁を手術時採取しRNAを抽出、正常脳血管と比較すべく、DNAマイクロアレイにOntology、Pathway解析を行った。この結果は次のページに示したが、antigen presentation(7.3E-11)、integrin signaling、chemokine signalingなどが有意差のあるcanonical pathwayであった。これらのpathwayが脳動脈瘤の形成に関与している可能性が示唆された。破裂(発症後24時間以内に採取)と未破裂脳動脈瘤には遺伝子発現に大きな差はなかった。これらのヒトサンプルを用いた結果から、脳動脈瘤モデルによる研究に思い至った。ヒトサンプルでは、経時的な変化を検討できず、薬剤の効果の判定も難しい。脳動脈瘤の成因に最も関与する因子を解析するにはモデルを用いる方法が最適と判断した。

### v 脳動脈瘤モデル

京都大学でラット・マウスの脳動脈瘤モデル

が確立されてこれまで多くの研究がされてきた(Surg Neurol 10:3-8, 1978)。最近では、血管平滑筋細胞のアポトーシス、iNOS、IL-1betaなどが脳動脈瘤の形成に関与していると報告している(Stroke 37:900-5, 2006)。脳動脈瘤の形成には血行力学的な負荷(腎動脈後枝と頸動脈の結紮、食塩)と結合織の脆弱化のための薬剤(aminopropionitrile)を用いる。この薬剤はまさに我々がゲノムから導いた分子(エラスチン、コラゲン)を標的としている(今回はこちらに関して検討しない)。大型動物においては、いまだ脳動脈瘤モデルは確立されたとは言いがたい。現在パイロット研究としてモデルを作成中である。

## 2. 研究の目的

1 大型動物(イヌ)において脳動脈瘤モデルの確立。

2 脳動脈瘤壁における遺伝子発現の変化をゲノムワイドのDNAマイクロアレイを用いて検討し、標的となる分子を抽出する。

3 以上の結果から、脳動脈瘤の形成・発達に必須の分子機構(pathway)を構築し、これを阻害すると考えられる薬剤の効果を検討する。

## 3. 研究の方法

1 イヌ脳動脈瘤モデルの確立と経時的変化  
パイロットスタディは現在行っており、脳動脈瘤は以下の要領で行う(Surg Neurol 10:3-8, 1978)。16頭を4群に分け、コントロール、1ヵ月後、3ヵ月後、6ヵ月後にと殺し、開頭、脳血管、脳を摘出し、脳動脈瘤の有無を観察する(部位、大きさ、個数など)。部位毎に2つに分け、凍結保存、ホルマリン保存とする。

11 遺伝子発現の変化・DNAマイクロアレイによる解析

### RNA抽出

RNAの抽出は、凍結組織をTrizol reagent (Invitrogen)を用いて、氷上で2分間ホモジェナイズし、プロトコールに従って抽出を行う。RNA量を測定し、その質をAgilent Lab-on-a-Chip 2100 bioanalyzerで確認する。また、DNAの混入は、DNase I (Promega)を用いて除去する。

### ラベリングとハイブリダイゼーション

アフィメトリックス社が作成したイヌマイクロアレイを用いる。これは25merのオリゴヌクレオチドをプローブとし、11個の完全な相補的なプローブと中央部を一つだけ別の塩基に置き換えた mismatch プローブからなり、23836の遺伝子の発現を一度に調べることが可能である。イヌの一つの遺伝子に対

する全配列はGenBank, dbEST, LION バイオサイエンス社からの情報により作成されている。得られた総RNAはMEGAscript T7 Kit と Two-Cycle cDNA合成キットを用いて逆転写を行い、ビオチン化した相補的なRNAはIVTラベリングキットにて増幅し、オープンにて45、60回転で16時間ハイブリダイゼーションを行う。ハイブリダイゼーションされたアレイは洗浄後、ストレプトアビジン-フィコエリシンにて染色し、アフィメトリックス専用のスキャナーにてスキャンし、発現の程度を専用のソフトウェアにて定量化する。

DNAマイクロアレイ遺伝子情報の取り込みと解析

得られた遺伝子のリストを専用の解析ソフトであるGeneSpringにとりこみ、遺伝子の機能別の分類表を作成する。分類法は:  
<http://www.geneontology.org/> に記されている方法で分類する。また発現が上昇、減少している遺伝子をIngenuity softwareにとりこみ、Ingenuity Pathways Knowledge Baseにて関連する遺伝子のpathwayを解析する。なお、RNA抽出および質の確認は当大学総合研究所で行う。ハイブリダイゼーションオープン、スキャナーなどのDNAマイクロアレイに必要な機器は、すでに当大学総合研究所に配備されており、これらを利用する。解析ソフトはGeneSpring、Ingenuity社を利用予定であるが、使用料の一部を負担する。

## 4. 研究成果

実験開始から3ヵ月後の血管造影で、総頸動脈を結紮した1匹のイヌで、脳底動脈先端部に動脈瘤を認め、その後の脳血管撮影で動脈瘤の拡大を認めた。実験開始時の血管造影では、同部位には動脈瘤を認めなかった。その他のイヌでは、すべての犬で脳底動脈の拡張を認めていたが、血管撮影上明らかな脳動脈瘤の形成はなかった。動脈瘤のできた犬のみ頸動脈結紮直後の脳血管撮影で椎骨動脈から頸動脈への側副血行を認めなかった。実験開始時の11例の収縮期血圧は平均159.5mmHgであり、処置後3ヵ月での収縮期血圧は平均194.1mmHgであった。動脈瘤を形成した例では、開始時130mmHgで、3ヵ月後は220mmHgであった。また腎動脈結紮をした8症例では、開始時の平均収縮期血圧は161.3mmHg、3ヵ月後は平均203.1mmHgに対し腎動脈未結紮3例では、開始時の平均値は155mmHgで、3ヵ月後は170mmHgであった。病理組織学的所見において、動脈瘤は、脳底動脈の先端部に形成されていた。動脈瘤の壁は非常に薄かった。内弾性板は、ひ薄化や断裂がみられた。

中膜筋層においては、筋細胞の配列の乱れや筋層の消失をみとめた。また、壁にはフィブリノイドの沈着を認めた。-smooth muscle actin 染色(以下 ASMA)でも中膜筋層の明らかな断裂が確認された。脳血管撮影で脳動脈瘤が明らかでなかったものでも、血管のふくらみとなんらかの上記の病理学的な変化はあった。

#### 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 10 件)すべて査読あり

Ruigrok YM, Rinkel GJ, Wijmenga C, Kasuya H, Tajima A, Takahashi T, Hata A, Inoue I, Kirschek B: Association analysis of genes involved in the maintenance of the integrity of the extracellular matrix with intracranial aneurysms in a Japanese cohort. *Cerebrovasc Dis* 28:131-4, 2009

Pluta RM, Hansen-Schwartz J, Dreier J, Vajkoczy P, Macdonald RL, Nishizawa S, Kasuya H, Wellman G, Keller E, Zauner A, Dorsch N, Clark J, Ono S, Kiris T, Leroux P, Zhang JH: Cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage: time for a new world of thought. *Neurol Res* 31:151-8, 2009

Kirschek B, Kasuya H: Gene expression microarray studies of aneurysm walls lead to similar results. *Stroke* 40:e514-515, 2009

Barth M, Thome C, Schmiedek P, Weiss C, Kasuya H, Vajkoczy P: Characterization of functional and quality of life in patients following SAH with and without nicardipine prolonged release pellets *J Neurosurg* 110:955-960, 2009

Hagiwara S, Tanaka N, Tani S, Nakamura S, Ohbuchi H, Hirota K, Iwabuchi S, Kasuya H: Follow-up of large aneurysms treated with coil embolization at an acute stage in patients with poor-grade subarachnoid hemorrhage. *Interventional Neuroradiology* 15:45-51, 2009

Bilguvar K, Yasuno K, Niemelä M, Ruigrok YM, Fraunberg M, van Duijn CM, van den Berg LH, Mane S, Mason CE, Choi

M, Gaal E, Bayri Y, Kolb L, Arlier Z, Ravuri S, Ronkainen A, Tajima A, Laakso A, Hata A, Kasuya H, Breteler MMB, Wijmenga C, State MW, Rinkel GJE, Hernesniemi J, Jääskeläinen JE, Inoue I, Palotie A, Lifton RP, Günel M: Identification of susceptibility loci for intracranial aneurysm. *Nature Genet* 40:1472-1477, 2008

Kirschek B, Kasuya H, Tajima A, Sasaki T, Yoneyama T, Ujiie H, Kubo O, Takakura K, Hori T, Inoue I: Network-based gene expression analysis of intracranial aneurysm tissue reveals role of antigen presenting cells. *Neuroscience* 154:1398-1407, 2008

Sasahara A, Kasuya H, Kirschek B, Tajima A, Onda H, Sasaki T, Akagawa H, Hori T, Inoue I: Gene-expression in a canine basilar artery vasospasm model: a genome-wide network-based analysis. *Neurosurg Rev* 31:283-290, 2008

Kirschek B, Kasuya H, Onda H, Hori H: Clinical trial of nicardipine prolonged-release implants for preventing vasospasm: Analysis of 100 consecutive patients. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 47: 389-396, 2007

Akagawa H, Narita A, Yamada H, Tajima A, Kirschek B, Kasuya H, Hori T, Kubota M, Saeki N, Hata A, Mizutani T, Inoue I: Systematic screening of lysyl oxidase-like (LOXL) family genes demonstrates that LOXL2 is a susceptible gene to intracranial aneurysms. *Hum Genet* 121:377-387, 2007

[学会発表](計 6 件)

Kasuya H: Development of nicardipine prolonged release implants after clipping for preventing cerebral vasospasm. Shanghai-Tokyo Neurosurgical Forum, Shanghai, 2010/4/9-10

Kasuya H: Development of nicardipine prolonged release implants after clipping for preventing cerebral vasospasm: From laboratory to clinical trial 2<sup>nd</sup> International Conference on Drug Discovery and

Therapy Dubai 2010/2/1-4

Kasuya H: Clinical trial of nicardipine prolonged-release implants for preventing cerebral vasospasm: Multi-center cooperative study in Tokyo. 9<sup>th</sup> International Conference on Cerebrovascular Surgery, Nagoya, Japan 2009/11/11-13

Kasuya H: Clinical trial of nicardipine prolonged-release implants for preventing cerebral vasospasm: Multi-center cooperative study in Tokyo. 10<sup>th</sup> International Conference of Cerebral vasospasm, Chongqing, China, 2009/10/8-11

Kasuya H: Molecular genetic analysis of intracranial aneurysm. XIV World Congress of Neurological Surgery, Boston, 2009/8/30-9/4

Kasuya H, Ohbuchi H, Hagiwara S, Nakamura S, Tani S, Tanaka N: Clinical trial of nicardipine prolonged-release implants for preventing vasospasm. Russian-Japanese Neurosurgical Symposium. Saint Petersburg Russia 2008/4/30

[ 図書 ] ( 計 3 件 )

Kasuya H, Krischek B, Baba M: Anterior interhemispheric approach for anterior communicating artery aneurysms. Macdonald: Neurosurgical Operative Atlas, 2E: Vascular Neurosurgery. Thieme Medical Publishers, Inc. New York, Stuttgart. 2008 pp43-47

Kasuya H, Onda H, Krischek B, Hori T: Cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage is completely prevented by L-type calcium channel antagonist in humans. Kiris T, Zhang JH (eds): Cerebral vasospasm New strategies in research and treatment Springer Wien New York Acta Neurochir [Suppl] 104:109-114, 2008

Sasaki T, Kasuya H, Aihara Y, Hori T: Microarray analysis of hemolysate-induced differential gene expression in cultured human vascular smooth muscle cells (HVSMC). Kiris T, Zhang JH (eds): Cerebral vasospasm New strategies in research and treatment

Springer Wien New York Acta Neurochir [Suppl] 104:169-174, 2008

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

糟谷 英俊 (Kasuya Hidetoshi)  
東京女子医科大学・医学部・教授  
研究者番号 : 50169455

(2) 研究分担者

米山 琢 (Yoneyama Taku)  
東京女子医科大学・医学部・助教  
研究者番号 : 90318105

井上龍也 (Inoue Tatsuya)  
東京女子医科大学・医学部・助教  
研究者番号 : 70398808

赤川 浩之 (Akagawa Hiroyuki)  
東京女子医科大学・医学部・助教  
研究者番号 : 60398807