

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H04455

研究課題名(和文)血栓形成を分岐点とする血管リモデリングを考慮した脳動脈瘤の時間定量的成長予測

研究課題名(英文) Real-time quantitative prediction of cerebral-aneurysm growth with thrombosis-stratified vascular remodeling

研究代表者

八木 高伸 (yagi, takanobu)

早稲田大学・理工学術院・主任研究員(研究院准教授)

研究者番号：00468852

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：脳動脈瘤は菲薄壁と肥厚壁からなり、二種類の血管組織リモデリングが介在すると考えられるがその機構は解明されていない。本研究では、ヒト病理、動物実験、体外実験、生体計算より当該機構の解明およびモデル化を実施した。結果、瘤の成長とは、血圧による血管壁のひずみと関連しており、ひずみの増大による平滑筋細胞の集団的壊死を起点とした微小亀裂の発生によることを明らかにした。亀裂発生部では止血栓が形成され血管壁を修復しようとするが、止血栓の形成は環境依存性を有しており、血流の衝突やひずみの集中は止血栓の形成を阻害する因子であり、血栓形成を分岐点として菲薄化、肥厚化へリモデリングが分岐することを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳動脈瘤の病態は血流、血栓、炎症と関連すると考えられてきたが、これらは血管壁の修復に関連する因子であり、病態全体としては従属因子に相当し、瘤進展の支配因子は血管壁のひずみであることを発見した。本研究より「病理学と物理学の接点形成による血管病の病態解明と新医療技術の創成」という新学術領域への発展を期待できる。将来期待される技術の一つとしてはひずみ分析より菲薄化・肥厚化を非侵襲病理診断する技術である。瘤の破裂危険度は瘤のサイズにより診断されているが、非侵襲病理診断により診断精度を飛躍させられれば、患者QOLはもちろん、本邦のお家芸である人間ドックの海外展開などの新医療産業の芽生えに貢献できる。

研究成果の概要(英文)：Intracranial aneurysms consisted of a coexistence of thin and thick walls, suggesting that two distinct vascular remodeling are involved, but their mechanism has yet to be clarified. This research combined human pathology, in vivo, ex vivo, and in silico experiments, and thereby aimed at understanding and modeling the mechanism. As a result, an aneurysmal progression was found to be associated with vascular strain by blood pressure. The increased wall strain due to wall thinning was associated with massive death of smooth muscle cells, resulting in a formation of microscopic tear, through which the aneurysm is enlarged morphologically. The micro tear promoted thrombus formation as a repair of vascular tissues, but the formation of thrombus has a dependence on surrounding environment. Flow impingement and concentrated wall strain were preventive factors of thrombus formation, which has a role of bifurcating the vascular remodeling in either wall-thinning or -thickening direction.

研究分野：人間医工学

キーワード：血管 血流 培養 動脈瘤 力学 病理 ひずみ 疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳動脈瘤は国民の5%が罹患する疾患であるが病態解明が十分ではない。血流、血栓、炎症が関連する疾患だが (Frösen J et al., 2019, 2012, Aoki T et al., 2007), それらの因果関係が不明である。結果、診断治療技術の革新もこれからの課題である。破裂危険度はサイズで診断されるが、基準未満の小型瘤が破裂することが稀ではなく、破裂リスクの個別化診断法の確立が求められている (高橋ら, 脳外誌 25 巻 1 号 2016 年)。これまでの病態解明は破裂瘤と未破裂瘤の比較による破裂因子の抽出によるものだが、本研究は未破裂瘤を対象として菲薄壁と肥厚壁に着眼して、二種類の異なる血管組織リモデリングが介在するという仮説を立て、菲薄壁と肥厚壁の比較を始点として病態の全容解明を目指した。

2. 研究の目的

- (ア) 菲薄性・肥厚性リモデリングの機構解明
脳動脈瘤の菲薄壁・肥厚壁とは血栓形成の有無を起点とした二種類の異なる血管組織リモデリングが作用した結果であることを明らかにすること。
- (イ) 菲薄性・肥厚性リモデリングのモデル化
発症後の脳動脈瘤がいつ、どのように進展していくのかを説明できるレベルでのモデリングを行い、血管リモデリングシミュレータの基盤を開発すること。

3. 研究の方法

3.1 ヒト未破裂脳動脈瘤による検討

ヒト病理においては7症例7個の瘤を対象とし、透過型電子顕微鏡により菲薄壁・肥厚壁を分類し、それらの組織構造を層別分析し、数値流体力学 (CFD) による血流解析と照合した。得られた結果を、既有結果 (μ CT による三次元壁厚分析, 組織免疫染色, 走査型電子顕微鏡による内膜分析) (未破裂瘤 30 症例, 破裂瘤 5 症例) と比較して整合性を検討した。

3.2 ラット動脈瘤モデルによる検討

弾性線維分解酵素 (エラスターゼ) により腹部大動脈に動脈瘤を誘発させ、(1) 高解像度超音波ドップラーによる時間-形態分析 (2) 心拍動による血管壁の微視的表面ひずみ分析 (3) 透過電顕・組織免疫染色による病理分析を実施した。

3.3 体外実験による血管組織の疲労観察

ラット胸大動脈を最大 21 日間, 37 °C のもと PBS(-) または DMEM で培養した。PBS(-) では, 0 mmHg と 100 mmHg の 2 条件, DMEM では 100 mmHg の内圧負荷条件で比較した。3 日毎に容液を交換し、この際に 0-200 mmHg 範囲での内圧外径試験より血管組織剛性を評価した。培養完了後に一部の試料を組織観察した。

3.4 生体計算による動脈瘤発症・進展シミュレーション

力学的因子 (壁面せん断応力や血管壁ひずみなど) と生物学的因子 (細胞増殖や組織産生など) を関連付けた数理モデルを導入して、正常血管を初期形状として、数値流体力学計算 (弱連成) により動脈瘤の発症・進展過程をシミュレーションした。種々の動物実験結果との比較を行った。

4. 研究成果

4.1 ヒト未破裂脳動脈瘤による検討

菲薄壁は単層構造、肥厚壁は積層構造であることを見出した。具体的には菲薄壁は平滑筋細胞壊死による細胞欠損層からなり (図1)、肥厚壁は細胞欠損層の上位に平滑筋細胞の増殖層 (図2)、その上位に血球細胞が浸潤した平滑筋細胞の遊走層からなる (図3)。各層の構造を理解したうえで遊走層、増殖層 (初期・末期)、壊死層 (初期・末期) とラベリングして層別分析を行った。遊走層は粗面小胞体が発達した平滑筋細胞が散在する層で、基底膜の網目構造からなり、膠原線維や弾性線維は発達していない。増殖層は合成型の平滑筋細胞が集団として存在し、膠原線維や弾性線維が発達している。壊死層は細胞質溶解型もしくは濃縮型のいずれかで平滑筋細胞が壊死・欠損する層であり、高密な膠原線維から構成されていることを明らかにした。細胞外基質は遊走層、増殖層、壊死層で顕著に異なり、壊死層に至ると細胞壊死による血管壁内部の空洞化がみられ、層伸長とともに空洞が連結して解離腔を形成し、最終的に微小亀裂へと至ることを見出した。また、増殖層に比して壊死

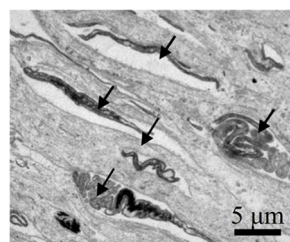


図1 壊死層
(濃縮型の壊死, 矢印)

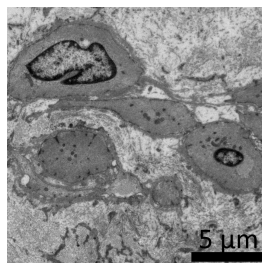


図2 増殖層

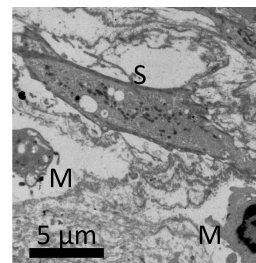


図3 遊走層 (S 平滑筋細胞, M マクロファージ)

層では細胞が一方向的に配向して伸長していることを見出した。細胞壊死のうち濃縮型のものは基底膜から細胞質が剥離することによるものと考えられた。菲薄壁は衝突流, 肥厚壁は非衝突流と一致していることを明らかにした。既存結果と比較すると, 菲薄壁や肥厚壁の厚みは壁厚分析結果と一致した。組織免疫染色との比較では, 炎症細胞は遊走層や一部の増殖層にみられるものの壊死層には本質的に存在しないことで一致した。走査電顕の内膜分析と比較すると内皮細胞は正常な活性を維持するものがほとんど存在せず, 大半は存在せず, 存在したとしても空胞変性等の障害を呈することを明らかにした。

4.2 ラット動脈瘤モデルによる検討

当該モデルは術後二週間で形態的増大が停止する。二週間後の組織構造はヒト脳動脈瘤の肥厚部と類似していた。血管壁が二層構造で一層目は遊走層, 二層目は増殖層であった。術後数日~1週間, 瘤発症前(壁膨隆前)において平滑筋細胞は周方向伸長から軸方向伸長へと配向を変え, 弾性板消失部と一致した(図4)。申請者らによる脳動脈瘤モデルでの結果とも整合した(Kataoka H, Yagi T, Nakamura M et al., 2020)。この時点において炎症細胞の浸潤はみられない。1週間程度で軸方向および周方向に伸長した平滑筋細胞が層を形成しており, 境界部において微小亀裂が発生することを明らかにした(図5)。モデルの作成方法を改良したところ, 恒常性を有するかの判断はこれからの課題であるが, ある時点において菲薄部および肥厚部の共存を再現できた。菲薄部はヒト同等の細胞欠損層で膠原線維組織であった。微視的表面ひずみを計測すると菲薄部と肥厚部の境界においてひずみが集中する性質があることを見出した(図6)。ひずみの集中により組織崩壊が加速し, 空間的に拡大していくことで瘤壁の二次的隆起が形成されることを明らかにした。申請者らによるヒト脳動脈瘤のプレブ分析結果(Satoh T, Yagi T et al., 2022)と整合性があり, ひずみの集中による細胞壊死が組織崩壊を加速させると考えられた。当該動脈瘤はside-wall型であり二次的隆起の場所は停滞流となると考えられる。にもかかわらず, 止血栓が形成されていないことを鑑みれば, 心拍動による血管壁の動的ひずみが止血栓の形成を抑制する因子であることを示唆した。

4.3 体外実験による血管組織の疲労観察

(PBS, 100 mmHg)での内圧外径曲線の経時変化を図7に示す。直後の曲線は下に凸のJカーブを示した。時間経過とともに, 外径が拡大し曲線が右にシフトしたが大きな変化がない時期がしばらく続いた。6日後に低圧領域の外径が大きく右にシフトした。このような大動脈の突然の剛性変化は1試料を除き5試料で見られた。この内圧外径曲線の高圧と低圧領域それぞれに直線をフィッティングし, 2直線の交点の圧力を遷移圧 P_{ref} とすると, P_{ref} が突然低下することを定量的に確認した。即ち, 血管組織の疲労は徐々に変化するのではなく, ある期間経過後に突然変化することが判った。また, 培養終了後の組織からは平滑筋細胞と弾性線維が欠落していた。低圧での力学特性は弾性線維が担うとされるため, 弾性線維による力学的支持機能が突然失われたと考えられる。ラット総頸動脈の動脈瘤は, 術後5日目まで変化がなく10日目にかけて急激に増加しており(Shimizu et al, 2020), 弾性線維の力学支持機能の突然の低下により, 大動脈瘤が急激に形成される可能性を示唆している。

(PBS, 0 mmHg)においても同様の結果を得た。ただし, P_{ref} が初めて50 mmHgを下回った培養

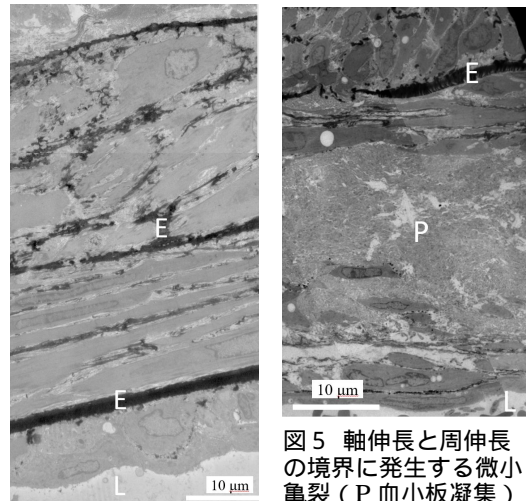


図4 平滑筋細胞(内膜直下は軸方向, 深部は周方向伸長, E弾性板, L内腔)

図5 軸伸長と周伸長の境界に発生する微小亀裂(P血小板凝集)

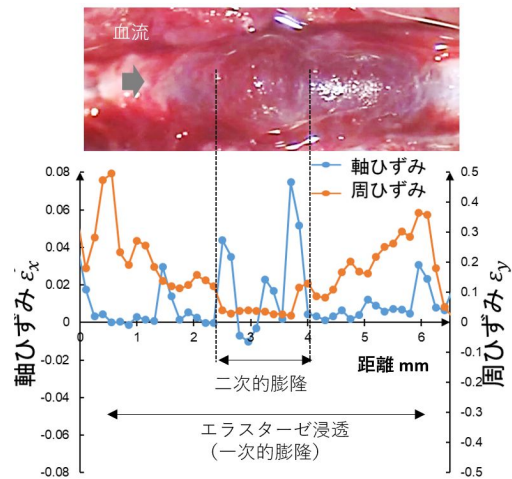


図6 ラット動脈瘤の微視的表面ひずみ

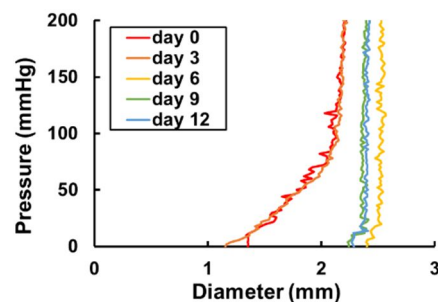


図7 100 mmHgの内圧負荷かつPBS(-)中で培養した大動脈の内圧外径曲線の経時変化例

図7 100 mmHgの内圧負荷かつPBS(-)中で培養した大動脈の内圧外径曲線の経時変化例

日数は、100 mmHg よりも 0 mmHg の方が低値の傾向となった。弾性線維が伸長を維持した環境（100 mmHg）では血管剛性が長期間維持されることが分かった。(DMEM, 100 mmHg)でも突然の剛性変化を確認し、より短期間で生じる傾向であった。ただし、培養液中で培養したにもかかわらず、細胞が生存していなかった。したがって、PBS(-)と培養液環境で剛性変化に要した日数に差がた要因については、明らかとはならなかった。

4.4 生体計算による動脈瘤発症・進展シミュレーション

まず、血流因子を起点とした血管壁リモデリングを検討した。図8の左列に示す6種類を考えた。因子が閾値を超えた場合、その場所で血管壁の菲薄化、脆弱化および血管組織の産生と増殖が生じるとした。具体的には、正常血管を初期状態とし、数値流体計算により血流動態を求め、そこから壁面せん断応力等を算出した。その値に基づいて、前述したリモデリングモデルにより、血管壁を構成する各面要素の厚さ、ヤング率、面積等の物性値を更新した。物性値を更新した後、血管壁内側から圧力をかけて血管壁の変形を計算し血管形状を更新した。この血管形状に対して、数値流体計算を行って血管壁の物性値を更新した。ラット頸動脈の動脈瘤モデル (Shimizu et al, 2021) に対してシミュレーションを行った結果を図8に示す。以下、(b)~(g)に対して各列番号を添え字として (bi) ~ (gi) と呼ぶ。瘤無モデル (ratNo.01-02) では、瘤が形成されない点において、(b1), (e1), (g1) が一致した。(c1), (f1) は分岐部、(d1) は分岐側面部に膨らみが確認されたため、動物実験と一致しなかった。瘤発症 (ratNo.01-08) では、(c2), (e2), (f2), (g2) で動物実験と一致した。(b2) は分岐部で膨らみが見られたものの2つの膨らみを確認した。瘤が進展した ratNo.01-05 では、計算結果は動物実験と一致しなかった。以上より、血流因子を起点としたリモデリングにより発症は再現できたが、進展は再現できなかった。ヒト病理や動物実験より、動脈瘤が進展するには亀裂-血栓のような大規模な血管組織破壊-修復反応が介在すると考えられるが、この生体反応を再現できていないことが分かった。

Kataoka, Yagi, Nakamuraら(2020)や4.2を鑑みれば、血管壁ひずみの変化により血管組織破壊反応が惹起されると考えられる。そこで、血管壁ひずみが閾値を超えた場合、血管壁細胞が増殖して血管組織産生によりひずみを正常値に戻すという数理モデルを追加した(または、その逆)。血管壁ひずみを制御した動物実験(ラット腹部大動脈拘束)を実施しその結果と比較した。図9は、シミュレーションの最終結果における平滑筋細胞とエラスチンの分布である。図より、拘束部にて平滑筋細胞とエラスチンが周囲より減少していることがわかる。動物実験ではエラスチンは減少していくが、平滑筋細胞は増加していた。動物実験と計算結果は、エラスチンの数量低下という点では一致するが、平滑筋細胞の数量という点では逆の結果となった。その理由は以下の通りである。本シミュレーションでは、ひずみによるリモデリングを考えたが、ひずみが閾値より小さければ、エラスチン等が分解されると同時に、細胞数が減少するという破壊性リモデリングの発生を想定していた。その結果として、上記の拘束部では、血流性リモデリングによりエラスチンが破壊されるということが生じて、血管変形が拘束されているためにひずみの増大が抑制されており、細胞増殖が起こらず、細胞量という点において動物実験とは異なる結果

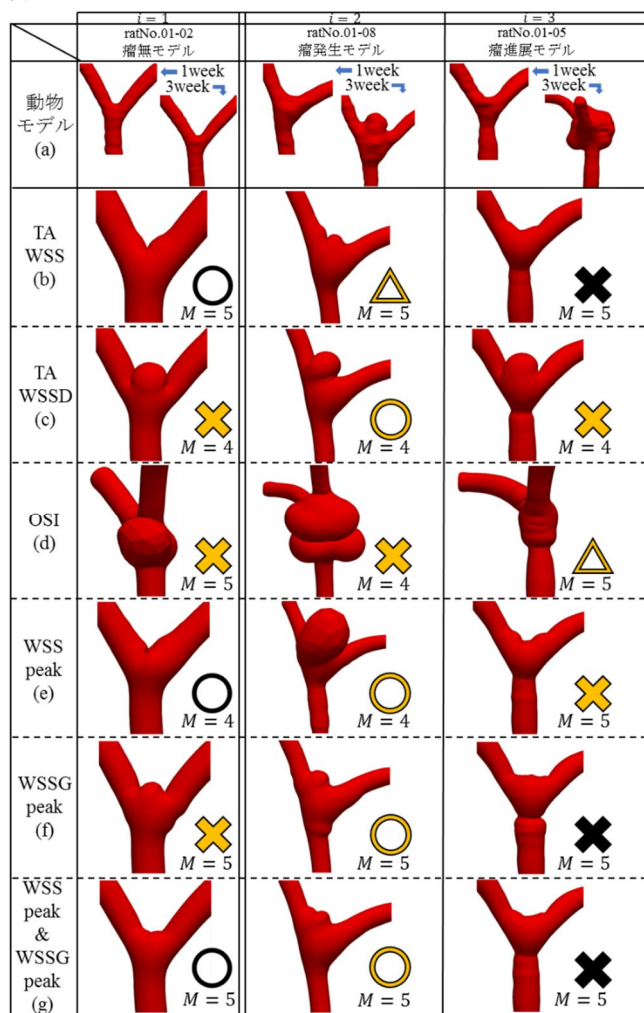


図8 最終形状結果比較, (a)動物実験(術後1週間と3週間), (b)~(g)はそれぞれの血流刺激に基づいた計算で得られた最終形状(○:術後3週間と瘤形成場所が一致, △:瘤形成場所が一部一致, ×:瘤形成場所が不一致, 橙色:計算による膨らみ有り, 黒色:計算による膨らみ無し, M:リモデリング回数)

となったと考えられる。本シミュレーションの問題点は、血管壁ひずみに対する血管壁リモデリングをいわば静的にとらえていた点にあり、「ひずみの増大と集団的細胞壊死」を起点とした亀裂・血栓のような動性の強いリモデリング反応を考慮しきれなかったことにある。さらに、ヒト病理や動物実験の結果より、血管組織は全く異なる層（壊死層や増殖層）が同一部位に積層して現れてくることがわかっており、血管壁の微視的層構造という概念を計算に導入する必要があると考えられた。血管損傷は血管ひずみの変化を起点とした血管組織リモデリングが適応不能となった状態であり、その本態は血管平滑筋細胞の微視的な細胞壊死の集積にあり、それらが突発的に顕在化し、それを修復すべく大規模な血栓性修復反応により周囲平滑筋細胞の遊走・増殖が惹起される。脳動脈瘤の進展を再現するには、血管組織の破壊と修復の相互累積反応をモデル化する必要がある、そのためには血管組織を微視的に表現していくことから始める必要があることが分かった。

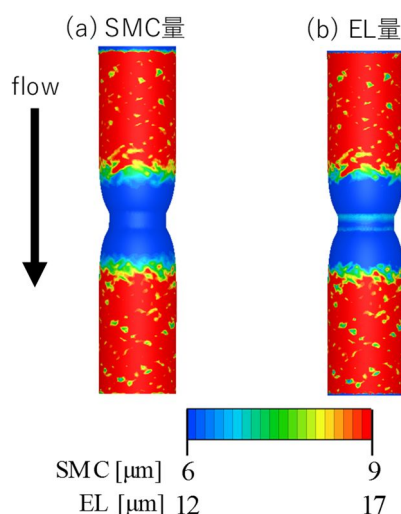


図9 ラット腹部大動脈拘束に対するシミュレーション結果 (a)平滑筋細胞量, (b)エラスチン量)

4.5 研究結果のまとめ

(ア) 菲薄性・肥厚性リモデリングの機構解明

瘤の進展とは、血圧による血管壁のひずみと関連しており、ひずみの増大による平滑筋細胞の集団的壊死を起点とした微小亀裂の発生によることを明らかにした。亀裂発生部では止血栓が形成され血管壁を修復しようとするが、止血栓の形成は環境依存性を有しており、血流の衝突やひずみの集中は止血栓の形成を阻害する因子であり、血栓形成を分岐点として菲薄化、肥厚化へリモデリングが分岐することを見出した。

(イ) 菲薄性・肥厚性リモデリングのモデル化

脳動脈瘤の基本的リモデリングは菲薄性である。菲薄性リモデリングが進展していき、ある時点で大規模な破壊（微小亀裂）を経験する。微小亀裂が起こった場合、その環境に応じて菲薄性を維持するか、肥厚性へと転じることができるかという血管壁の状態分岐がおこる。ここで肥厚性といっても当該血管の当該層が肥厚するのではなく、菲薄した層に積層する形で層が上位に形成されていくことで血管壁が肥厚する。このような観点から、進展を再現するにはまず菲薄性リモデリングを再現できることがその第一歩であり、そのためには血管壁の微視的力学場を定量していくことが必要であることが分かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takanobu Yagi, Fujimaro Ishida, Masaaki Shojima, Hitomi Anzai, Souichiro Fujimura, Takanori Sano, Shun Shinozaki, Yuuma Yamanaka, Yuuto Yamamoto, Yoshihiro Okamoto, Makoto Ohta, Masanori Nakamura, on behalf of the CFD-BIO study group	4. 巻 33(2)
2. 論文標題 Systematic review of hemodynamic discriminators for ruptured intracranial aneurysms	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biorheology	6. 最初と最後の頁 53-64
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.17106/jbr.33.53	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 -

1. 著者名 Hiroharu Kataoka, Takanobu Yagi, Taichi Ikedo, Hirohiko Imai, Koichi Kawamura, Kazumichi Yoshida, Masanori Nakamura, Tomohiro Aoki, Susumu Miyamoto	4. 巻 60(7)
2. 論文標題 Hemodynamic and histopathological changes in the early phase of the development of an intracranial aneurysm	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurologia medico-chirurgica	6. 最初と最後の頁 319 - 328
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Toru Satoh, Takanobu Yagi, Yoichi Sawada, Kenji Sugiu, Yu Sato, Isao Date	4. 巻 12(1)
2. 論文標題 Association of bleb formation with peri-aneurysmal contact in unruptured intracranial aneurysms	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 -
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 3件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Takanobu Yagi
2. 発表標題 Systematic review of hemodynamic discriminators for ruptured intracranial aneurysms (invited talk)
3. 学会等名 Interdisciplinary Cerebrovascular Symposium 2020（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takanobu Yagi, Wang Xinning, Koichi Kawamura, Taichi Ikedo, Kampei Shimizu, Tomohiro Aoki, Hirohiko Imai, Masanori Nakamura, Hiroharu Kataoka, Mitsuo Umezu
2. 発表標題 NEW INSIGHT INTO A TRIGGER OF INITIATING INTRACRANIAL ANEURYSMS USING A RAT MODEL
3. 学会等名 6th International Conference on Computational and Mathematical Biomedical Engineering CMBE2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 八木 高伸
2. 発表標題 医療に活かす数値流体力学1：現状と展望（招待講演）
3. 学会等名 日本脳循環代謝学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 八木 高伸
2. 発表標題 血管病のモデリング&シミュレーション：病理学×理工学（招待講演）
3. 学会等名 第9回計算力学シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小谷優太, 八木高伸, 岡田宜佳, 小山達也, 岩崎清隆
2. 発表標題 術中ステレオ粒子画像解析を用いた心拍動による血管分岐部の微視的ひずみに関する検討（受賞講演）
3. 学会等名 第32回バイオフロンティア講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡田宜佳, 八木高伸, 小谷優太, 小山達也, 岩崎清隆
2. 発表標題 In vivo 実験による力学場の変化を起点とした血管構造破壊反応に関する検討 (受賞講演)
3. 学会等名 第32回バイオフィロントニア講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村 匡徳
2. 発表標題 シミュレーションによる循環器予測医学への展開
3. 学会等名 第86回日本循環器学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木 孝祐, 高島 匡輝, 八木 高伸, 片岡 大治, 青木 友浩, 氏原 嘉洋, 杉田 修啓, 中村 匡徳
2. 発表標題 前大脳動脈/嗅覚動脈接合部における脳動脈瘤の発生機序解明を目的とした血管組織内力学場の定量解析 (受賞講演)
3. 学会等名 第32回バイオフィロントニア講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tanaka Y, Yamada T, Ujihara Y, Sugita S, and Nakamura M
2. 発表標題 Screening hemodynamics indices for the aneurysm evolution: A comparison between simulations and animal experiments
3. 学会等名 The 11th Asian-Pacific Conference on Biomechanics (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村 匡徳
2. 発表標題 循環器疾患の診断・治療にシミュレーションはどのように貢献できるか？
3. 学会等名 第33回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2021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
研究分担者	坂口 勝久 (sakaguchi katsuhisa) (70468867)	早稲田大学・理工学術院・准教授(任期付) (32689)	
研究分担者	杉田 修啓 (sugita syuukei) (20532104)	名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授 (13903)	
研究分担者	中村 匡徳 (nakamura masanori) (20448046)	名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・教授 (13903)	

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
---------	---------