

令和 4 年 4 月 18 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09479

研究課題名(和文) 分子ライブイメージングを用いた脳動脈瘤増大破裂機序の多面的解析と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Pathological and molecular analysis of cerebral aneurysms using live imaging

研究代表者

野崎 和彦 (Kazuhiko, Nozaki)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：90252452

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)：げっ歯類脳動脈瘤モデル動物を使用し病変部を対象としたライブイメージングに成功し、脳動脈瘤誘発部位における動脈壁の詳細な動きを画像化し、血流動態解析と脳動脈瘤発生の関連につき解析し、破裂に関わる組織学的および分子学的ターゲットの解析を進め、細胞浸潤を含め破裂に特有の所見を得ている。

カニクイザルの脳血管構築の知見について詳細に情報を収集しており論文として採用され、侵襲度の低い血管画像評価法である頭部MRI及び造影CTを用いて経時的に脳血管の描出を追跡し、脳動脈瘤誘発処置を行った7頭中6頭で1、2年後に脳動脈瘤発生を確認し、ヒトで見られる脳動脈瘤特有の病理所見とマクロファージ浸潤を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳動脈瘤破裂によるくも膜下出血は予後不良で脳動脈瘤の進展破裂機構の解明は不十分で有効な薬物治療もない。現行の外科治療のリスクも考慮すると脳動脈瘤破裂予防を目指した先制医療としての治療介入は未だ不十分である。げっ歯類での血行力学的および分子学的解析結果から得られた候補薬物をサルモデルで検証することで、新たな薬物治療薬の開発に資する成果と思われる。

研究成果の概要(英文)：Dynamic characteristic motions of cerebral arterial walls and aneurysmal walls were detected using live imaging in rat aneurysmal models, and mechanical factors which promote aneurysmal rupture were analyzed. On the same aneurysmal walls, histological and molecular analysis was performed using immunohistochemical methods.

The Cerebral Artery in Cynomolgus Monkeys (*Macaca fascicularis*) was investigated using MR and CT images, and formalin-fixed arterial specimens were collected and anatomical features were analyzed, and 7 monkeys received surgical procedures to induce cerebral aneurysms, and 6 animals showed cerebral aneurysms in 1 and 2 years after intervention.

研究分野：脳神経外科

キーワード：脳動脈瘤 動物モデル 炎症

## 1. 研究開始当初の背景

これまでに我々は脳動脈瘤の発生や増大が慢性炎症により制御されることを示してきた。また、脳動脈瘤の最も重要なイベントである破裂にも炎症反応が重要であることがスタチン製剤や NSAIDs の脳動脈瘤破裂抑制効果を示した臨床研究 (Yoshimura. J Stroke Cerebrovasc Dis 23:343, 2013; Hasan. Stroke 42:3156, 2011)から示唆される。この結果は、未だその機序が不明である脳動脈瘤破裂も発生や増大と同様に炎症反応により規定されていることを示唆するものである。一方で、現在までの数値流体解析を用いた検討から、脳動脈瘤の進展や破裂に乱流負荷や低ずり応力負荷などの力学的因子の関与が強く示唆される。例えば、脳動脈瘤発生部位には高い壁面剪断力 (WSS; wall shear stress)が負荷されるが (Shojima. Stroke 35:2500, 2004; Dolan. Ann Biomed Eng 41:1411, 2012)、脳動脈瘤の増大や破裂部位ではむしろ低い WSS が検出されるとともに、特に破裂点には乱流成分が存在することが報告されている (Tanoue. AJNR Am J Neuroradiol 32:1732, 2011; Fukazawa. World Neurosurg 83:80, 2015)。脳動脈瘤の進展破裂の病態には炎症反応といった生物学的な現象の制御が示唆される一方で血流による負荷といった力学的因子の関与も予想されるが、力学的因子と血管壁内で進行する炎症などの病態の2つの因子を融合して行われた解析は極めて予備的かつ限定的であり、両者の病変部やその周囲を含む微小環境内の相互作用・相互依存性そして両者を統合したときに果たしてどのように脳動脈瘤の進展破裂の病態が理解できるのかは未解明である。よって、血流による力学的負荷依存的疾患であり、かつ壁内の炎症プロセスが大きく関与する脳動脈瘤疾患の進展破裂機構を明らかにするためには、従来行ってきた病理組織標本や遺伝子組み換え技術を使用した検討のみではなく、それらをライブイメージングにより取得可能な病変部の力学的負荷による動的な変形の情報を新たに取得し融合して検討することが必須であり本研究計画の着想に至った。

## 2. 研究の目的

これまで報告されていた脳動脈瘤病態を制御する炎症関連因子等の病変部での病態形成進展過程における動的挙動や、脳動脈瘤の病態を修飾することが予想される力学的因子や血管壁の動態の影響などを検討することは不可能である。これらを踏まえ、我々は今回、脳動脈瘤ラットモデルに誘発した脳動脈瘤を標的としたライブイメージング解析を行い、脳動脈瘤壁の血流負荷に依存した動きや炎症関連因子等の病変部における挙動を動物生存下でリアルタイムに観察し、それらの情報を統合し脳動脈瘤病態を解明することを計画している。それにより、脳動脈瘤の進展破裂をもたらす力学的因子が何であり、それらがどのように瘤壁を変形させ微小環境内で炎症反応等を制御しているかの実態を明らかとすることを目的としている。この検討は時空間分解能の観点でヒト脳動脈瘤壁の動態を4D-CT angiographyを用いて検証した報告を凌駕しているのみでなく、動物モデルでの検討であることからより均一な条件で症例数を重ね再現性を得ることで、新規の知見を得ることができる。これまで脳動脈瘤における力学応答と炎症反応といった生物現象を融合した同様の研究は報告がないことから、本研究計画は新規性および独自性が高い。かつ今回の我々の研

究計画から得られた成果は、脳動脈瘤病態の解明に結びつくのみならず、これらの知見に基づき脳動脈瘤の進展破裂を予防するための新規薬物治療開発につながる可能性があり、未だ予後不良のくも膜下出血への先制医療の観点から社会的貢献も大きい。

### 3. 研究の方法

#### 脳動脈瘤壁の拍動と血管壁構成成分や炎症関連因子発現の相関の検討

我々が以前に確立したほぼ 100%の個体で前大脳動脈 嗅動脈分岐部に脳動脈瘤を発症するラット脳動脈瘤モデル動物 (Hashimoto. Surg Neurol 10:3, 1978)、及び自然破裂が高率に誘発できるモデル動物 (Korai. J Neuroinflammation 13:165, 2016)を用い、決して破裂しないことが判明している前大脳動脈 嗅動脈分岐部に発生した脳動脈瘤と後者のモデルに誘発される 50-60%程度が破裂するいわゆる rupture-prone aneurysm (前ないし後交通動脈に発生)の根本的に性質が異なる二種類の病変を解析対象とし、動物生存下でライブイメージング解析を行う。この解析では、脳動脈瘤壁の拍動の性状(動きの方向や程度、変形)の情報を、動脈瘤部位別(動脈瘤頂部・頸部、母血管)に取得する。一方で、同じ動物個体でライブイメージング後に作成した病理標本を用いて血管壁構成成分(内皮細胞、内弾性板や平滑筋層)や脳動脈瘤病態を制御する炎症関連因子(NF- $\kappa$ B、マクロファージ、遊走因子、種々のサイトカイン)、その他力学応答因子や病態関連因子の候補の動脈瘤壁・母血管における分布を免疫組織化学等で確認し、その多寡や病変内での分布の情報を得る。また、これらの情報と観察された4次元的な動脈瘤壁の拍動の相関を解析する。本解析過程で特に rupture-prone aneurysm と決して破裂しない部位の動脈瘤での差異を比較検討することで、破裂に関連する壁の動きとそれと関連した発現動態を示す炎症関連因子を同定することを試みる。

#### 脳動脈瘤病態制御候補因子の病変部における動態の検討

上記で破裂との相関が示唆される脳動脈瘤病変の動きと因子につき、病変部での動態をライブイメージング解析で確認し、その発現変動等と病変の動きとの実際の相関を明らかとする。本検討は、従来の病理組織での検討では不可能であった、病変部での経時的な生物現象を検出できることとそれらの因子の発現部位や程度の情報と壁の動きの情報を統合して解析できる利点がある。例えば、脳動脈瘤発生増大に寄与する主要な細胞種としてマクロファージが知られているが、蛍光色素(Dil)含有リポソームを使用しそれを貪食したマクロファージを可視化することで脳動脈瘤の発生、増大、破裂前の各段階でマクロファージの血管壁における動態を検討する。さらに、例えば脳動脈瘤病態を制御する炎症反応の主要な仲介因子で転写因子である NF- $\kappa$ B の活性化を蛍光蛋白質の発現としてモニターできる遺伝子改変ラットを作出し、NF- $\kappa$ B の活性化を炎症反応の指標としてその時空間的分布を検証する等、遺伝子組み換え技術を使用して種々の因子の脳動脈瘤病態との関連を検証する。

#### 脳動脈瘤破裂抑制のための薬物治療の開発

上記で得られた脳動脈瘤の破裂を制御することが示唆される因子のうち、創薬標的となり得る因子についてはそれらの因子を阻害する(ノックアウトラット、阻害薬)ないしは賦活する(刺激薬)ことで、げっ歯類のモデル動物におけるくも膜下出血の発症抑制効果や脳動脈瘤増大破裂抑制効果を検証する。

## 霊長類の脳動脈瘤モデルの改良と薬効評価

我々はカニクイザルにおいて脳動脈瘤誘発モデル (Hashimoto. J Neurosurg. 67:903, 1987)を報告したが再現性が低く改良すべき点がある。本研究では、血圧上昇、血行力学的負荷、エストロゲン低下の観点からこのサルモデルを改良することにより脳動脈瘤発生率を上げる試みを進めており、上記ラットモデルの検討から得られた因子を参考に、改良中のサル脳動脈瘤モデルから最終的には新規の自然破裂によるくも膜下出血モデルを確立することを試みる。侵襲度の低い血管画像評価法として頭部 MRI 及び造影 CT を用い脳血管の描出を行う。ラットの検討から脳動脈瘤病態進展破裂制御因子を創薬標的とした新規薬物治療法開発の可能性が見出されれば、これらの霊長類脳動脈瘤モデルにそれらの治療薬候補薬剤を投与し薬効を確認し臨床応用への橋渡し研究へ発展させる。

## 4. 研究成果

### 脳動脈瘤壁の拍動と血管壁構成成分や炎症関連因子発現の相関の検討

我々が以前に確立したほぼ 100%の個体で前大脳動脈 嗅動脈分岐部に脳動脈瘤を発症するラット脳動脈瘤モデルにおいて、破裂しないモデル動物 (Hashimoto. Surg Neurol 10:3, 1978)、及び自然破裂が高率に誘発できるモデル動物 (Korai. J Neuroinflammation 13:165, 2016)を用い、決して破裂しないことが判明している前大脳動脈 嗅動脈分岐部に発生した脳動脈瘤と後者のモデルに誘発される 50-60%程度が破裂するいわゆる rupture-prone aneurysm (前ないし後交通動脈 に発生) の根本的に性質が異なる二種類の病変を解析対象とし、動物生存下でライブイメージング解析を進め、脳動脈瘤誘発部位における動脈壁の詳細な動きを画像化し、2つの異なる脳動脈瘤において壁の拍動の違いを観察し、mechanical stretch の関与についての知見を得た。また、各病型の発現遺伝子解析を蛋白および 遺伝子レベルで組織学的に行い、発現の違いを見出した。

### 脳動脈瘤病態制御候補因子の病変部における動態の検討

血流動態解析と脳動脈瘤発生の関連につき解析し、破裂に関わる組織学および分子学的ターゲットの解析を進め、細胞浸潤を含め破裂に特有の所見を得ている。解析のターゲットとしては、過去に報告した炎症関連因子に加え、血管壁に浸潤する細胞群、血管壁を構成する各層の構築などを挙げ、解析を進めた。また、破裂との相関が示唆される脳動脈瘤病変の動きと因子につき、病変部での動態をライブイメージング解析で確認し、その発現変動等と病変の動きとの実際の相関について解析を行った。

### 脳動脈瘤破裂抑制のための薬物治療の開発

創薬ターゲットとなりうる複数の候補因子を見出し、げっ歯類のモデル動物を用いた検証実験の計画を行っている。

## 霊長類の脳動脈瘤モデルの改良と薬効評価

現在までの知見から脳動脈瘤が脳血管壁の慢性炎症により制御される疾患と理解され、同時に数値流体解析結果から血流による力学的負荷により病態が修飾されることも示唆され

ているが、炎症という生物現象と力学的因子という二つの要素がどのように融合し脳動脈瘤発生増大、特に破裂を惹起するのかが不明である。本研究では、まず正常サルカニクイザルの脳血管構築の知見について詳細に情報を収集し、本動物の特有の脳動脈構造について複数の知見を得ており、一部論文として採用された。また、脳動脈瘤誘発のための介入因子について検討を行い、侵襲度の低い血管画像評価法である頭部MRI及び造影CTを用いて経時的に脳血管の描出を追跡し、脳動脈瘤誘発処置を行った7頭中6頭で1, 2年後に脳動脈の特有の場所に脳動脈瘤発生を確認した。また、組織学的検討においてヒトで見られる脳動脈瘤特有の病理所見とマクロファージ浸潤を確認した。本モデルで高い確率で脳動脈瘤誘発が確認されており、今後の薬物検証実験に使用可能であると判断している。また、同時に、多発性嚢胞腎に関連する遺伝子につき、サルで遺伝子改変に成功しており、改変マウス・ラットおよびサルにおける組織学的解析を計画中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 野崎和彦、宮田悠、青木友浩	4. 巻 29
2. 論文標題 脳動脈瘤治療の未来像	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 脳神経外科ジャーナル	6. 最初と最後の頁 101-108
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 Oka M, Shimo S, Ohno N, Imai H, Abekura Y, Koseki H, Miyata H, Shimizu K, Kushamae M, Ono I, Nozaki K, Kawashima A, Kawamata T, Aoki T	4. 巻 10
2. 論文標題 Dedifferentiation of smooth muscle cells in intracranial aneurysms and its potential contribution to the pathogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8330
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-65361-x	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 Kushamae M, Miyata H, Shirai M, Shimizu K, Oka M, Koseki H, Abekura Y, Ono I, Nozaki K, Mizutani T, Aoki T	4. 巻 10
2. 論文標題 Involvement of neutrophils in machineries underlying the rupture of intracranial aneurysms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20004
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-74594-9	査読の有無 無
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 Miyata H, Shimizu K, Koseki H, Abekura Y, Kataoka H, Miyamoto S, Nozaki K, Narumiya S, Aoki T	4. 巻 59
2. 論文標題 Real-time imaging of an experimental intracranial aneurysm in rats.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurol Med Chir (Tokyo)	6. 最初と最後の頁 19-26
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 Koseki H, Miyata H, Shimo S, Ohno N, Mifune K, Shimano K, Yamamoto K, Nozaki K, Kasuya H, Narumiya S, Aoki T	4. 巻 0
2. 論文標題 Two diverse hemodynamic forces, a mechanical stretch and a high wall shear stress, determine intracranial aneurysm formation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Transl Stroke Res	6. 最初と最後の頁 00-00
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12975-019-0690-y	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 Tsuji K, Nakamura S, Aoki T, Nozaki K	4. 巻 in press
2. 論文標題 Anatomy and Morphology of the Cerebral Artery in Cynomolgus Monkeys (Macaca fascicularis)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Experimental Animals	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3件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 野崎和彦
2. 発表標題 脳動脈瘤壁情報の画像化と破裂に関わる因子の解析
3. 学会等名 第29回日本脳ドック学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野崎和彦
2. 発表標題 脳動脈瘤治療の未来像
3. 学会等名 第39回日本脳神経外科コンgres総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野崎和彦
2. 発表標題 病理・病態に立ち返って脳血管障害の治療を考察する
3. 学会等名 第59回近畿脳神経血管内手術法ワークショップ(招待講演)
4. 発表年 2019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	青木 友浩 (Aoki Tomohiro) (40633144)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長  (84404)	
研究分担者	椎野 顯彦 (Shiino Akihiko) (50215935)	滋賀医科大学・神経難病研究センター・准教授  (14202)	
研究分担者	中村 紳一郎 (Nakamura Shinichiro) (50307980)	滋賀医科大学・動物生命科学センター・准教授  (14202)	
研究分担者	辻 敬一 (Tsuji Keiichi) (80838045)	滋賀医科大学・医学部・助教  (14202)	

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