

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09503

研究課題名（和文）血管奇形に対する分子標的治療の基礎的研究

研究課題名（英文）Molecular targeted therapy for arteriovenous malformations

研究代表者

金丸 和也（Kanemaru, Kazuya）

山梨大学・大学院総合研究部・医学研究員

研究者番号：80402080

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）：ラットAVMモデルを作成しナイダス様の組織を確認した。MEK inhibitor U0126 の慢性投与によりERK1/2の抑制が認められた。しかしながら、TGF- $\beta$ 、VEGF、IL-6、MMP-9、MMP-3等の、それ以降のカスケードの変化では、有意差が認められなかった。脳AVMの分子機序解明に適したモデルと考えられ、実験系の調整により有用な知見が得られることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の実験系は、脳動静脈奇形の発生分子機序と、それに基づいた治療ストラテジーの研究に適していることが明らかとなった。薬剤投与量や期間の調整により、さらなる分子機序の究明につながることを示唆された。

研究成果の概要（英文）：Rat AVM model was made. MEK inhibitor U0126 inhibited ERK1/2 expression comparing sham operated control group. Cascade such as TGF- $\beta$ 、VEGF、IL-6、MMP-9、MMP-3 did not show significant changes. By the optimization of treatment dose and period, this model would be useful to investigate basic pathology and treatment strategy of cerebral arteriovenous malformations.

研究分野：脳神経外科

キーワード：cerebral AVM molecular target therapy MAPK/ERK pathway MEK inhibitor U0126 rat model

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

脳動静脈奇形 (arteriovenous malformation ; AVM) は、脳表あるいは脳実質内にある動脈と静脈が、毛細血管を介さずに短絡する病変であり、流入動脈と短絡の本体である異常血管の塊 (ナイダス) および導出静脈から構成される。高流量であるため、しばしば動脈瘤や静脈瘤が形成され、その破綻による出血や周囲脳組織に虚血を生じて発症する。いったん発症すると、後遺症を残す場合や死亡する場合も多く、外科治療や血管内治療さらに定位的放射線治療を取り入れた集学的な根治治療が行われるが、重篤な治療合併症を生じることもまれではなく、安全で確実な治療法が確立されていないのが現状である。したがって、AVM の発生メカニズムに基づいた分子をターゲットとした治療法が確立され、従来の侵襲性の高い治療からの移行が期待されている。

AVM の発生メカニズムは完全には解明されていないものの、胎生 3 週頃の血管系 (原始動脈、毛細血管および静脈) の発生異常で生じると考えられている。孤発例の頻度が圧倒的に高いが、遺伝性出血性毛細血管拡張症、Wyburn-Mason 症候群のように遺伝性疾患にも合併することが知られている。遺伝性出血性毛細血管拡張症は、多臓器 (脳、肺、肝) の AVM を合併する常染色体優性遺伝疾患である。その原因遺伝子が同定され、Endoglin、ALK-1、SMAD4 遺伝子の異常により 3 つのサブタイプに分かれることが知られている。いずれも TGF- $\beta$  シグナル伝達系に関連し、その機能である組織修復、血管新生、血管構造維持に支障をきたし AVM の発症に関与しているものと考えられている。一方、大多数の孤発例においても、関連遺伝子の研究が進められている。AVM では、860 以上の遺伝子が upregulate または、downregulate されていることが知られている。Single nucleotide polymorphisms (SNPs) による AVM の疾患関連遺伝子の検索では、血管新生因子関連の ALK、IL-1、rs11672433 near ANGPTL4 や、炎症関連遺伝子 IL-6、MMP-3 の遺伝子多型が AVM の疾患感受性 (発症) と関連する可能性が報告されている。一方、AVM に関連するバイオマーカーとしては、血管新生に関連する TGF- $\beta$  や angiopoietin-like 4 (ANGPTL4)、vascular endothelial growth factor (VEGF)、神経細胞の生存や機能に関連する brain-derived neurotrophic factor (BDNF)、血管壁の不安定性を惹起する interleukin-6 (IL-6)、matrix metalloproteinase (MMP)-9 や MMP-3 が関連するとの報告がある。しかしながら、ゲノムワイド関連解析においては、前述の遺伝子多型と AVM の疾患感受性との関連は確認されなかった。

最近になり孤発例の AVM 組織を用いた研究にて、KRAS の活性型変異が認められ、AVM の培養内皮細胞系で、ERK が活性化し、血管新生関連遺伝子発現と Notch シグナルの亢進が認められ、細胞遊走能も亢進していることが明らかとなった。さらに、MEK inhibitor U0126 を用いた MAPK-ERK シグナル伝達系の抑制により、これらの変化が抑制されたと報告された。また、MAPK-ERK シグナル伝達系を活性化する VEGF 受容体に対する inhibitor のペバシズマブにより遺伝性出血性毛細血管拡張症の臨床例での臨床症状の改善が認められたとの報告が散見されるようになった。これらの知見より、AVM の発生には血管新生の分子メカニズムが強く関連していることが推測され、この解明が AVM の分子標的治療の確立に寄与することは論を待たない。

## 2. 研究の目的

本研究では、MAPK-ERK シグナル伝達系の抑制薬である MEK inhibitor U0126 を用いて、この抑制による AVM 治療効果を明らかにすることを目的とする。脳動静脈奇形のラットモデルに MEK inhibitor U0126 を投与する。MEK inhibitor U0126 は、MEK1 と MEK2 の双方を選択的に阻害し、それぞれ ERK1 と ERK2 の活性化を抑制し、その下流のカスケードを阻害する。MAPK-ERK シグナル伝達系およびその関連バイオマーカーの変化を測定する。また、形態学的な治療効果も測定し、治療効果機序を明らかにする。

## 3. 研究の方法

脳 AVM モデルの作成： Sprague-Dawley ラット (200g) を用いる。全身麻酔下に頸部皮膚切開を行い、左外頸静脈の中枢端を結紮切断する。次いで末梢側を左総頸動脈へ単側吻合し動静脈瘻を作成する。閉創し手術を終了する。その後 6 週間飼育すると外頸静脈末梢部に AVM ナイダス様の血管構造が作成される。7 週間後より、MEK inhibitor U0126 の投与を開始する。U0126 (Promega 社) 100 mg/kg または vehicle (0.4% dimethyl sulfoxide 加 0.1M PBS) を 1 週間毎に 4 回腹腔内投与する。最終投与の 1 週間後に麻酔下に灌流固定し、AVM の組織を採取し、以下の解析を行う。形態学的検討： U0126 投与群とコントロール群のそれぞれに HE 染色ならびに EVG 染色を行い、ナイダスの形態学的変化を確認する。

組織学的検討： U0126 投与群とコントロール群の効果判定を行う。MAPK-ERK シグナル伝達系ならびに関連バイオマーカーの局在とその変化を確認するため各種免疫染色 (ERK1、ERK2、TGF- $\beta$ 、VEGF、IL-6、MMP-9、MMP-3) を行う。また、これらのマーカーについて western blot を用いて定量する。共焦点レーザー顕微鏡を用いて多重染色による血管新生マーカーの局在の観察を行う。

総合解析： 得られたデータを統計解析し、U0126 の AVM 組織における治療効果について明らか

にする。

#### 4 . 研究成果

ラットの外頸静脈と総頸動脈の吻合による動静脈瘻を作成し、6週間後に外頸静脈末梢部にナイダス様の組織を確認した。次に、同様のラット AVM モデルを作成し、7週間後より、osmotic minipump を用いて MEK inhibitor U0126 (Promega 社) 15 mg/kg/day または vehicle (0.4% dimethyl sulfoxide 加 0.1M PBS) を 14 日間投与した後、灌流固定し、AVM の組織を採取した。これらを U0126 投与群 (n=10) とコントロール群 (n=10) 作成した。形態学的に HE 染色ならびに EVG 染色を行いナイダスの形態学的観察を行い、各種マーカー (ERK1/2、TGF- $\beta$ 、VEGF、IL-6、MMP-9、MMP-3) の免疫染色や western blot を行った。2 群で形態学的変化については確認されなかった。免疫組織学的には、U0126 投与群では、コントロール群に比し ERK1/2 の抑制が認められた。しかしながら、TGF- $\beta$ 、VEGF、IL-6、MMP-9、MMP-3 においては有意な変化は認められなかった。今回の研究においては、U0126 の効果については、ERK1/2 の変化は見られたものの、それ以降のカスケードの変化では、有意差が認められなかった。実験系の最適化が不十分であった可能性があり、薬剤投与量とその期間、ならびに AVM 作成期間や観察までの期間などに今後調整を予定している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	仙北谷 伸朗  (Senbokuya Nobuo)  (70535567)	山梨大学・大学院総合研究部・医学研究員   (13501)	
研究分担者	舘岡 達  (Tateoka Toru)  (40824595)	山梨大学・大学院総合研究部・助教   (13501)	

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