

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 5日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～ 2011

課題番号：22791347

研究課題名（和文） 脳動脈瘤形成時における TGF- β の役割の解明と新しい脳動脈瘤治療法の開発研究課題名（英文） The role of TGF- β and approaches of new pharmacological treatments on cerebral aneurysm formation

研究代表者

兼松 康久 (KANEMATSU YASUHISA)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：90363142

研究成果の概要（和文）：

細胞増殖・分化の制御、細胞死に關与するサイトカインの一種である Transforming growth factor-beta (TGF- β)は大動脈瘤の進展および破裂に深く關与し、新たな治療のターゲットとして期待されているが、詳細な役割は不明である。そこで脳動脈瘤における TGF- β による薬物療法の可能性を検討した。脳動脈瘤血管壁でも発現の増加がみられ、薬物治療群ではさらに増加し、血管障害に対して生体防御反動的に発現誘導されると考えられた。発現誘導の機序についてさらに検討を要する。

研究成果の概要（英文）：

Transforming growth factor-beta (TGF- β) is a kind of cytokines. It is associated with the growth and rupture of aortic artery aneurysms (AAA). TGF- β is thought to be as a promising therapeutic target against AAA, however its role on cerebral aneurysms remains obscure. Using our aneurismal model, we observed the up-regulation of TGF- β in the aneurismal wall and the enhancement of it by pharmacological treatment, suggesting that TGF- β may be a promising therapeutic target on cerebral aneurysms

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 2011年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 900,000 | 3,900,000 |

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、TGF- β

1. 研究開始当初の背景

脳動脈瘤に関してヒトの脳動脈瘤壁を用いた遺伝子および免疫組織学的解析により、TGF- β の発現が家族性脳動脈瘤の発生や脳動

脈瘤の破裂と関連する可能性が示唆されている (Santiago-Sim, Stroke. 2009; 40: 1604-11, Frosen, Neurosurgery. 2006; 58: 534-41)。しかしこれらの報告だけでは TGF- β

が脳動脈瘤壁に対し修復的に作用するのか破壊的に作用するのかを説明するには不十分であり、動物モデル等を用いた TGF-β の脳動脈瘤壁に対する作用とその機序の解明が急がれる。近年申請者らは脳動脈瘤と発生機序において多くの共通点を持つ大動脈瘤の基礎研究において、マウス大動脈瘤モデルに TGF-β 中和抗体及び TGF-β レセプター (ALK5) 阻害薬を全身投与し、TGF-β 活性を抑制することにより大動脈瘤の発生及び破裂率が増加することを認めた。よって TGF-β は大動脈では動脈瘤形成に関し抑制的に働くと考えられる。

2. 研究の目的

(I) 申請者が既に大動脈瘤モデルにおいて確認した TGF-β 活性抑制による大動脈瘤形成・破裂促進効果が、脳動脈瘤モデルにおいても認めるか否かを調べる概念実証的研究 (proof of concept) である。

(II) ラット脳動脈瘤モデルの脳血管に TGF-β の発現が増加しているかどうか観察する。また angiotensin II receptor type I antagonist を経口投与することで TGF-β 発現がどう変化するかを調べる。

(III) 研究 (I)、(II) で用いた方法を、TGF-β シグナル下流にあり、動脈瘤壁に対し何らかの作用を持つと予想される種々の因子のノックアウトマウスに施し、脳動脈瘤形成に関与する TGF-β シグナリングの解明を行う。具体的な因子として TGF-β 活性に相関して発現し、大動脈瘤形成に抑制的に働くと報告されている PAI-1 (Qian, Gene Ther.

2008;15:224-32)、対照的に大動脈瘤形成に促進的に働くとされる各種 MMPs (Jones, J Vasc Res. 2009;46:119-37) のノックアウトマウスを用いる。以上のような研究にて TGF-β の脳動脈瘤壁に対する作用とその機序を解明し、脳動脈瘤の新しい予防法及び治療法の開発を目指すことが本研究の目的である。

3. 研究の方法

対象： ラット脳動脈瘤モデル

方法：

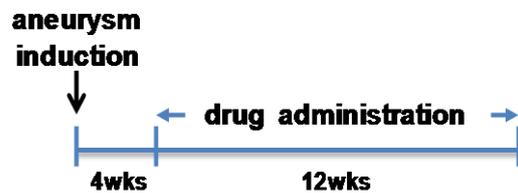
脳動脈瘤発生、増大における TGF-β の役割について検討する。

群構成 (使用動物 ; SD 雌性ラット)

SD 雌性ラットを 13 週齢にて卵巣摘出 (OVX) /

右総頸動脈結紮 (CAL) を行い、高食塩食 (8%) 負荷 (HSD) を開始 15 週齢にて両側後腎動脈結紮 (RL) により動脈瘤を誘発する。(下図)

Protocol



その 4 週間後より以下の群構成で薬物を連日強制経口投与し、12 週間投与後に脳動脈瘤の発生・増大に対する治療効果を評価する。

群構成

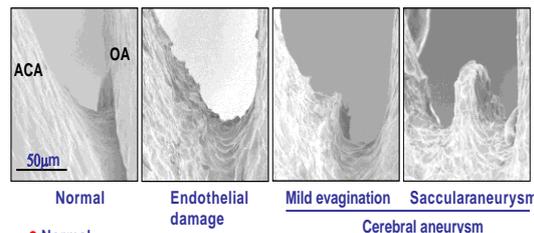
vehicle control 群

olmesartan 0.3 mg/kg 投与群

olmesartan 3.0 mg/kg 投与群

評価項目

i) vascular corrosion cast (下図) による動脈瘤形成頻度、増大程度の形態変化の観察比較を行う。



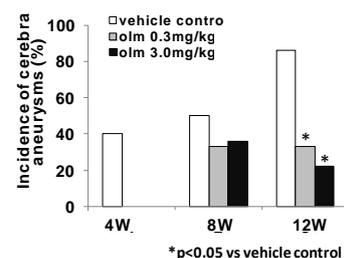
- Normal
There is neither arterial dilation nor are there irregular cell shapes.
- Endothelial damage
The endothelial surface is rough and irregular without marked luminal dilation.
- Cerebral aneurysm
There is evidence of changes such as moderate outward evagination or an obvious saccular aneurysm.

ii) 動脈瘤壁の定量 real time-PCR による TGF-β および TNF-α の mRNA 量の測定を行う。
iii) 上記分子の動脈瘤壁における発現を免疫染色で観察する。

4. 研究成果

① 動脈瘤形成頻度は時間経過とともに増加した (右図)

② オルメサルタン投与により



この頻度は有意に低下した。(下図)

- ③ 動脈瘤発生頻度の増加に伴い、TGF \cdot および炎症性マーカーである TNF \cdot がともに増加した(前ページ下図)。一方、olmesartan 投与群では溶媒投与群に比べて TGF \cdot はさらに増加したが、逆に TNF \cdot は有意に低下した。これらの結果から TGF \cdot は脳動脈瘤壁においても血管保護的に作用している可能性が示唆された。これらの結果について論文作成中である。

2. TGF- β のレセプターである ALK5およびこれと拮抗的作用を持つと示唆されている ALK1 についての解析を行う計画である。

3. これらの成果を踏まえて新たに確立しているラットおよびマウス動脈瘤破裂モデルを用いて TGF- β 賦活の有効性を検討する予定である。

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. Tada Y, Kanematsu Y, Kanematsu M, Nuki Y, Liang EI, Wada K, Makino H, Hashimoto T. A mouse model of intracranial aneurysm: technical considerations. Acta Neurochir Suppl. 2011; 111: 31-5 査読有 DOI: 10.1007/978-3-7091-0693-8_6
2. Kanematsu Y, Kanematsu M, Kurihara C, Tada Y, Tsou TL, van Rooijen N, Lawton MT, Young WL, Liang EI, Nuki Y, Hashimoto T. Critical roles of macrophages in the formation of intracranial aneurysm. Stroke. 2011;42:173-8 査読有 DOI: 10.1161/STROKEAHA.110.590976
3. Tada Y, Kitazato KT, Yagi K, Shimada K, Matsushita N, Kinouchi T, Kanematsu Y, Satomi J, Kageji T,

Nagahiro S. Statins promote the growth of experimentally induced cerebral aneurysms in estrogen-deficient rats. Stroke. 2011; 42: 2286-93 査読有 DOI: 10.1161/STROKEAHA.110.608034

4. Kanematsu Y, Kanematsu M, Kurihara C, Tsou TL, Nuki Y, Liang EI, Makino H, Hashimoto T. Pharmacologically induced thoracic and abdominal aortic aneurysms in mice. Hypertension. 2010; 55: 1267-74. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.140558

[学会発表] (計 4 件)

1. Kohrai M, Kitazato KT, Kinouchi T, Shimada K, Sumiyoshi M, Matsushita N, Kanematsu Y, Satomi J, Kageji T, Nagahiro S. ACTIVATION OF NUCLEAR RECEPTORS ON NEUROPROTECTION AFTER EXPERIMENTAL CEREBRAL ISCHEMIA IN FEMALE RATS, 80thAANS, 2012 4.14-18, Miami, Florida
2. Sumiyoshi M, Kinouchi T, Tsutsumi T, Kitazato K, Shimada K, Matsushita N, Kanematsu Y, Satomi J, Nagahiro S. Excessive salt-intake exacerbates ischemic brain damage independent of blood pressure, 80thAANS, 2012 4.14-18, Miami, Florida
3. Matsushita N, Kitazato K, Shimada K, Kinouchi T, Kanematsu Y, Satomi J, Nagahiro S. Influence of sodium retention on the formation of cerebral aneurysm 80thAANS, 2012 4.14-18, Miami, Florida
4. Sumiyoshi M, Kitazato KT, Kinouchi T, Tsutsumi T, Shimada K, Matsushita N, Kanematsu Y, Satomi J., Nagahiro S. High salt-intake under hypoestrogenicity exacerbates ischemic brain damage without affecting the blood pressure Brain & Pet 2011 5.25-28, Barcelona, Spain

6. 研究組織

(1) 研究代表者

兼松康久 (KANEMATSU YASUHISA)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：90363142