

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592131

研究課題名(和文) 脳動脈瘤形成増大における体内塩分貯留の意義と分子機序

研究課題名(英文) Water-free Na accumulation facilitates the formation of cerebral aneurysm through down-regulation of sodium excretion pump in ovariectomized rats

研究代表者

里見 淳一郎 (SATOMI, Junichiro)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：10304510

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：動脈瘤形成に關するメカニズムとしてエストロゲン欠乏状態では水分とは独立して体内に貯留されるwater-free Naの蓄積が關係することを新たに見出し、さらにその分子機序についても明らかにし、論文をHypertensionに投稿、受理された(Hypertension. 2012;60:1309-15)。男性では体内Na貯留の増加は血圧の上昇に反映されるが、女性では血圧の上昇は見られなくても、閉経期以後には組織内Naの蓄積が増加し、これが血管や脳組織障害に影響する可能性が示唆された。本結果を論文化し、現在revision中である。

研究成果の概要(英文)：Hypertension is thought to be associated with a high incidence of stroke. However, not all patients with unruptured cerebral aneurysms are hypertensive. We hypothesized that in oophorectomized rats fed a high salt diet (HSD), body water-free Na⁺ accumulation may be increased, leading to the formation of cerebral aneurysms. Compared to HSD rats, the incidence of cerebral aneurysms and the body Na⁺-to-water ratio were significantly higher in HSD/OVX- and HSD/OVX/renal hypertensive (RL) rats independent of hypertension. In their aneurysmal wall, ATP1², a subtype of Na⁺/K⁺-ATPase were down-regulated and renin-angiotensin system- and inflammation related molecules were up-regulated. A reduction in the vascular Na efflux pump in ovariectomized rats may be associated with the increase in water-free Na⁺ accumulation directing to cerebral aneurysm formation.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：脳・神経 脳血管病 エストロゲン 高塩分摂取 高血圧

1. 研究開始当初の背景

現在臨床において脳動脈瘤の外科的治療は行われているが、有効な薬物治療法はない。脳動脈瘤壁の構造や機能に関する組織学的研究は国内外で広く行われてきたが、その予防や薬物治療に関連づけた実験的研究は少ない。申請者らは疫学調査を基に独自に卵巣摘出というエストロゲン欠乏状態での脳動脈瘤モデルを確立し、実験的な脳動脈瘤における内皮細胞機能異常(下左図、正常)や、血管壁の不安定化機序などを検討し多くの情報を発信してきた(Neurosurg. 2005, 103: 1052-7, J Neurosurg. 2007, 107: 405-411)。また炎症との関係については動脈瘤壁へのマクロファージ浸潤に tight junction 蛋白の減少が関与しており(J Hypertension, 2010)、動脈瘤壁局所での酸化ストレス上昇や MMP-9 発現増加および renin-angiotensin system(RAS)の活性化が血管壁の脆弱化に関与していることを報告している(Neurosurgery, 2009, J Hypertension, 2009)。さらに近年 mineralcorticoid receptor 阻害剤(MRA)が血圧に非依存的に抗酸化作用や抗炎症作用を介して動脈瘤の形成・増大を抑制することを示した。興味深いことにこの予防効果に関連して、MRA で治療したラットでは塩分摂取量が低下し、逆に deoxycorticosterone acetate (DOCA)を背部に埋め込み、塩分を負荷した DOCA-salt ラットでは塩分摂取量の増加が認められた。また血圧上昇は軽度にも関わらず、動脈瘤形成が高頻度に認められ、体内塩分量の増加が脳動脈瘤の形成に関与している可能性が示唆された。これまでに脳動脈瘤と血圧の関連性は示唆されているが、血圧と独立して体内塩分貯留の増加と脳動脈瘤の関連性やエストロゲン欠乏による体内塩分貯留への影響についての検討はほとんど行われていない。これらの関係を明らかにし、その分子機構を解

明することで奏効する治療のターゲットを明らかにできる可能性がある。また本研究の知見から脳動脈瘤治療に対して新たな観点から臨床への応用が可能となり、医療上大いに貢献することが期待される。

雌ラットにおいて脳動脈瘤形成早期の血管内皮障害にエストロゲン欠損が関与し、脳動脈瘤増大には高血圧が重要であることや(J Hypertension 2005, 2007, 2008)、動脈瘤の形成・増大過程における血管内皮の tight junction 蛋白の occludin や ZO-1 の低下がマクロファージの血管壁への浸潤を亢進し、酸化ストレスや炎症関連分子によって血管壁が崩壊することで脳動脈瘤形成にいたる可能性を示唆している(J Hypertension, 2010)。さらに炎症細胞による脳動脈瘤壁の退行性変化が動脈瘤形成に寄与することを調べるために抗炎症、抗酸化あるいは血管内皮保護作用を示す可能性のある薬剤(エストロゲン補充療法、angiotensin II type 1 receptor, phosphodiesterase 4 inhibitor)をラット脳動脈瘤モデルに投薬し、脳動脈瘤の形成・増大抑制果、脳動脈瘤の形成・増大に炎症や酸化ストレスが強く影響することが判明した(Neurosurgery, 2009, J Hypertension, 2009)。また動脈瘤壁局所の RAS 活性化の抑制が有効であると思われた。さらに新たに特異的な mineralcorticoid receptor 阻害剤(MRA)として登場した降圧剤を用いて治療すると血圧非依的に動脈瘤を抑制することや、塩分摂取量が低下することを認めた。逆に MR agonist である DOCA を食塩と一緒に投与した DOCA-salt ラットでは塩分摂取量の増加が認められ、軽度の血圧増加にもかかわらず高血圧ラットと同頻度の動脈瘤形成を認めた。脳動脈瘤抑制には RAS に加えて aldosterone の抑制が重要であり、かつ動脈瘤形成がエストロゲン欠乏状態では血圧

より体内塩分量によって強い影響を受ける可能性が示唆された。通常概念として塩分摂取と血圧は一体化して考えられており、塩分摂取が多いと血圧が上昇し、その結果脳血管障害が生じると考えられている。しかし我々の研究結果から血圧とは独立して塩分負荷による体内塩分貯留の増加が血管障害に直接結びつく可能性が考えられた。これまでに血圧と独立して塩分と脳血管障害との関連を調べた報告はほとんど無いことから、脳動脈瘤と体内塩分貯留の増加との関連性やこの現象がエストロゲン欠乏状態によって増強されるかどうかに着目して研究を行うことにした。

従来の脳動脈瘤モデルは雄ラットを用いて、コラーゲンおよびエラスチンの生成、成熟（架橋結合）過程に架橋結合を阻害する β -aminopropionitrile(BAPN)を投与して動脈瘤を誘発している。本研究の特色はBAPNを使用せず、エストロゲン欠乏状態という、よりヒト脳動脈瘤に近い内分泌環境や血管機能修飾下の状態で動脈瘤を誘発することである。一般的には血圧と塩分摂取とは一体化して考えられており、DOCA-salt ラットや SHR ラットなどの自然発症高血圧ラットが用いられて検討されているが、本研究では特に血圧とは独立して塩分過剰摂取により、体内の Na 貯留上昇が脳血管障害誘発に関連するかどうかを検討するため、野生型の正常血圧ラットを用いて卵巣摘出状態で高塩分負荷した場合の血圧への影響や動脈瘤形成との関連性を解析するため極めて独創的といえる。従来から積極的にエストロゲン欠乏状態で高血圧を誘発したモデルでの基礎研究に取り組んできたが、今回、新たにエストロゲン欠乏状態での塩分負荷の影響に着目して解析することにより、脳動脈瘤の形成や増

大機序に Na 貯留がどのように関わるかの関連性を明らかにする。さらに薬物を用いて Na 貯留を抑制すると、動脈瘤形成・増大の抑制が可能かどうかの治療効果を評価し、その詳細なメカニズムの解明により、新たな治療の標的分子を同定する可能性がある。またこれらの基礎研究から得た知見を基に臨床研究へと発展させる可能性もあり、極めて意義ある研究と考えられる。

2. 研究の目的

脳動脈瘤は多因子が関与するため成因については不明の点が多い。申請者らはエストロゲン欠乏状態、高血圧、血行力学的なストレスを負荷したラットに塩分を供与することで新しい再現性のある脳動脈瘤モデルを確立し、病態解析や薬物治療についての報告をしている。この研究の過程で、エストロゲン欠乏雌ラットでは、血圧より体内塩分貯留がより重要である知見を得た。本研究では、新たに体内塩分貯留、特に脳動脈血管壁内の塩分貯留に関わると推定される分子に着目して脳動脈瘤との関連性を解析する。

脳動脈瘤の病態解析と同時に薬効評価と分子機構を解明し、薬物治療の臨床応用を目指す。

- (1) 脳動脈瘤と体内 Na 貯留量の増加との関連性をしらべる。さらにエストロゲン欠乏による血管障害の増悪作用について血管壁での塩分貯留関連分子 NKCC1, NHE1, NCX1, Na/K-ATPase (下図)の変動を調べる。
- (2) 薬物治療による薬効を基に治療の標的分子を明確にする。

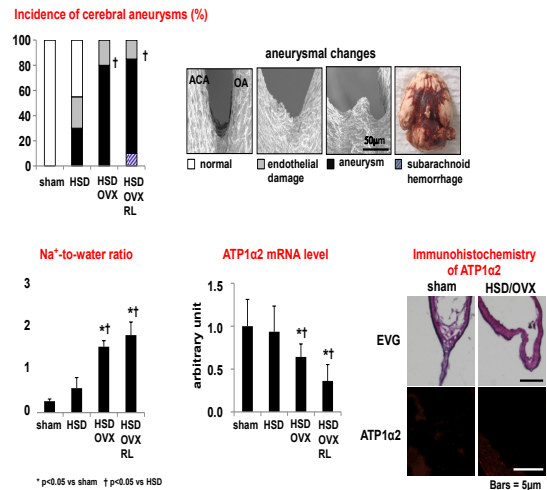
有効性のある承認薬を選択し、臨床試験を進める。

3. 研究の方法

脳動脈瘤形成・増大・破裂に及ぼす分子機序の解明と、薬物治療による脳動脈瘤壁の安定化の可能性を検討するため、ラット脳動脈瘤モデルを用い、新たに脳動脈瘤形成・増大と体内塩分貯留の増加との関連性やこれらがエストロゲン欠乏によって増強されるかどうか、また脳動脈瘤増大と破裂それぞれの発生部位の違いや、その発生メカニズムについての詳細な解析を行う。また薬物治療効果の評価を行い、脈瘤形成抑制に寄与する分子機構を明らかにすると共に臨床治験への足がかりを構築する

4. 研究成果

脳動脈瘤は破裂するとくも膜下出血をきたし、約50%が重篤となり致死的な経過をたどるか重い後遺症を残す。日本は欧米諸国に比べ脳動脈瘤破裂によるくも膜下出血の罹患率が高く、また未破裂脳動脈瘤は脳ドックなどの普及により比較的良好に発見される(成人の約4-5%の頻度)。その背景に日本人の食塩の過剰摂取による高血圧の存在が示唆されている。しかし脳動脈瘤の増大や破裂を予防する有効な薬物治療はいまだ確立されていない。脳動脈瘤が男性に比べて女性に多く発症し、特に閉経期以後に多く発見されるという疫学的データに基づいて、我々は独自にエストロゲン欠損・血行力学的負荷・高血圧誘導・食塩負荷による雌ラットの実験脳動脈瘤モデルを確立した。このモデルを用いていくつかのタイプの異なる薬剤による基礎的な治療研究を行った結果、アルドステロン抑制により体内の余分なナトリウム排泄作用を示す選択的“ミネラルコルチコイド受容体阻害剤(MRB)”が最も脳動脈瘤形成・増大を抑制することが明らかとなった。そこで本研究では、血行力学的負荷、エストロゲン欠損状態の雌性ラットを用いて、高血圧誘導も



しくは食塩負荷による脳動脈瘤形成における影響を検討した。卵巣摘出の雌性ラットにおいては塩分負荷によって、血圧に影響なく、動脈瘤形成頻度が上昇することを見出した。これに対し、Na利尿作用を有することが判明している angiotensin type 1 受容体阻害剤であるルサルタンを用いて治療すると動脈瘤形成が抑制された。動脈瘤形成に関与するメカニズムとしてエストロゲン欠乏状態では水分とは独立して体内に貯留される water-free Na の蓄積が関係することを新たに見出している。さらにその分子機序についても明らかにし、論文を Hypertension に投稿、受理された (Hypertension. 2012;60:1309-15)。

さらに脳組織内への Na 貯留が高食塩摂取によって増加するかどうかを検討し、雄性ラットと比較した。雌性ラットにおいては塩分負荷によって体内 Na と同時に体内水分量が増加し、血圧の上昇が認められた。一方、雌性ラットでは体内 Na 貯留量の増加にもかかわらず、体内水分量に変化は見られず、血圧の上昇も認められなかった。また卵巣摘出した雌性ラットにおいては体内 Na 貯留量がさらに増加するにもかかわらず、尿量の排泄量が増加しており、体内水分量に変化は見られず、血圧の上昇も認められなかった。

脳組織内 Na 濃度が卵巣摘出をした場合

には血圧に影響なく増加しており、これに高塩分食を負荷するとさらに Na 蓄積が増強された。先に卵巣摘出ラットでは脳血管壁の Na 排泄ポンプの発現が低下していることを報告しており、この発現低下が血管壁での Na 貯留と関係する可能性が示唆された。

これらの結果から、男性では体内 Na 貯留の増加は血圧の上昇に反映されるが、女性では血圧の上昇は見られなくても、閉経期以後には組織内 Na の蓄積が増加し、これが血管や脳組織障害に影響する可能性が示唆された。本結果を論文化し、現在 revision 中である。

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 5 件)

- 1) Nakajima N, Nagahiro S, Satomi J, Tada Y, Nakajima K, Sogabe S, Hanaoka M, Matsubara S, Uno M, Satoh K. Prevention of Retrograde Blood Flow Into Large or Giant Internal Carotid Artery Aneurysms by Endovascular Coil Embolization with High-Flow Bypass: Surgical Technique and Long-Term Results. World Neurosurg. 2015 Feb 11 in press 査読あり
- 2) Yamamoto N, Satomi J, Tada Y, Harada M, Izumi Y, Nagahiro S, Kaji R. Two-layered susceptibility vessel sign on 3-tesla T2*-weighted imaging is a predictive biomarker of stroke subtype. Stroke. 2015; 46: 269-271 査読あり
- 3) Terasawa Y, Yamamoto N, Morigaki R, Fujita K, Izumi Y, Satomi J, Harada M, Nagahiro S, Kaji R. Brush sign on 3-T T2*-weighted MRI as a potential predictor of hemorrhagic transf-

ormation after tissue plasminogen activator therapy. Stroke. 2014; 45: 274-276. 査読あり

- 4) Yamamoto N, Satomi J, Harada M, Izumi Y, Nagahiro S, Kaji R. Is the Susceptibility Vessel Sign on 3-Tesla Magnetic Resonance T2*-Weighted Imaging a Useful Tool to Predict Recanalization in Intravenous Tissue Plasminogen Activator? Clin Neuroradiol. 2014 Dec 18. 査読あり
- 5) Tada Y, Satomi J, Abe T, Kuwayama K, Sogabe S, Fujita K, Yamamoto N, Kaji R, Harada M, Nagahiro S. Intra-arterial signal on arterial spin labeling perfusion MRI to identify the presence of acute middle cerebral artery occlusion. Cerebrovasc Dis. 2014; 38: 191-196. 査読あり

[学会発表] (計 5 件)

- 1) Korai M, Kitazato KT, Miyamoto T, Shimada K, Yagi K, Tada Y, Kurashiki Y, Kuwayama K, Satomi J, Nagahiro S, 2015 Role of hyperhomocysteinemia in the development of intracranial aneurysms. International Stroke Conference, February 10-12, 2015 in Nashville, USA
- 2) Miyamoto T, David K. Kung, Korai M, Kitazato KT, Shimada K, Yagi K, Tada Y, Kurashiki Y, Kuwayama K, Satomi J, Nagahiro S, Hemodynamic change elicits the formation and rupture of experimental cerebral aneurysms, 2015 International Stroke Conference, February 10-12, 2015 in Nashville, USA

- 3) Kurashiki Y, Kitazato K, Uto Y, Yagi K, Shimada K, Miyamoto T, Sumiyoshi M, Tada Y, Kuwayama K, Satomi J, Nagahiro S. Is the regulation of M1 macrophage activation beneficial in the acute phase of post cerebral ischemia? 2015 International Stroke Conference, February 10-12, 2015 in Nashville, USA
- 4) Kurashiki Y, Kitazato K¹, Uto Y, Yagi K, Shimada K, Miyamoto T¹, Sumiyoshi M, Tada Y, Kuwayama K, Satomi J, Nagahiro S. Activation of M2 macrophage in the late phase after cerebral ischemia promotes the expression of neurogenesis related molecules. 9th World Stroke Congress, October 22 - 25 2014, Istanbul, Turkey,
- 5) Miyamoto T, David K. Kung, Korai M, Kitazato KT, Shimada K, Yagi K, Tada Y, Kurashiki Y, Kuwayama K, Satomi J, Nagahiro S, Hemodynamic changes may elicit the formation and rupture of experimental cerebral aneurysms. 9th World Stroke Congress, October 22 - 25 2014, Istanbul, Turkey

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

受賞

日本脳神経外科学会, 大阪、2013. 10. 奨励賞 松下展久

6. 研究組織

(1) 研究代表者

里見 淳一郎 (SATOMI, Junichiro)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・准教授
研究者番号：10304510

(2) 研究分担者

永廣 信治 (NAGAIRO, Shinji)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・教授
研究者番号：60145315

多田 恵曜 (TADA, Yoshiteru)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・助教
研究者番号：30547964
(平成25年度より分担者)

兼松 康久 (KANEMATSU, Yasuhisa)
徳島大学・病院・助教
研究者番号：90363142
(平成25年度削除)

(3) 連携研究者

()

研究者番号：