

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462224

研究課題名(和文) 脳動脈瘤の発生、破裂に関する慢性炎症の関与とその薬物療法開発に関する基礎研究

研究課題名(英文) The basic research for the relationship of chronic inflammation and pathogenesis of cerebral aneurysm

研究代表者

河野 隆幸 (Kawano, Takayuki)

熊本大学・生命科学研究部・助教

研究者番号：50448536

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：動脈瘤の発生、増大の機序として、血管壁へのM₁浸潤が関与していると考えられた。また近年我々はAngpt12が慢性炎症に関する重要な因子のひとつであることを明らかにした。そのため、動脈瘤の成因と慢性炎症の関与を検討するために、Angpt12を検討した。Angpt12欠損マウスを用いた実験で、動脈瘤の発生にWTと変化がなく、Angpt12は動脈瘤の発生に関与していない可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Our study shows the expression of macrophage in the cerebral aneurysm (CA) wall and suggests that is involved in CA pathogenesis. Chronic inflammation due to Angpt12 expression is thought to be the main cause of CA rupture. But our study does not suggests the correlation between Angpt12 expression and CA incidence in mouse aneurysm model.

研究分野：脳血管障害

キーワード：慢性炎症 動脈瘤 angpt12

1. 研究開始当初の背景

脳動脈瘤の発生、増大の機序には様々な要因が挙げられているが、現時点では明らかにされていない。しかし近年 interleukin (IL) - 1、腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor ; TNF) - α 、NF- κ B などの関与が報告され、動脈瘤壁へのマクロファージの浸潤、慢性炎症反応がその一因となっていると考えられている(1)(2)(3)。

これまで、我々は脳虚血の病態・治療の研究を行ってきた(4)(5)(6)(7)(8)(9)。特に代表研究者は脳虚血モデルで、脳に炎症を惹起するプロスタグランジン E₂、EP1 受容体が神経細胞死に関与していること、虚血耐性発現にペルオキシナイトライトが関与していること等を明らかにしてきた(9)(10)。これらの経験をもとに慢性炎症と脳動脈瘤の病態に関しての研究を着想した。

慢性炎症では、長期にわたるストレス応答のため、不可逆的な組織のリモデリングが生じる。この応答機構の変調や破綻が動脈硬化性疾患の発症や進展の原因として近年注目されている(11)。今回我々はその慢性炎症の鍵因子としてアンジオポエチン様タンパク質 2 (angiopoietin-like protein 2 ; Angptl2)に着目し研究を立案した。

Angptl ファミリーは、血管新生因子アンジオポエチンの構造上の特徴であるコイルドコイルドメインとフィブリノゲン様ドメインをもつ分泌タンパク質である(12)。Angptl ファミリー分子はヒトで7種類同定されており、生物学的機能としてはその多くが血管新生制御に何らかの作用を示すことが明らかとなっている(12)。近年我々は Angptl2 が慢性炎症に関与する重要な因子のひとつであることを明らかにした(13)(14)。

ヒト血中 Angptl2 濃度は、肥満指数や炎症の指標となる C-reactive protein 値と正の相関を示し(13)、Angptl2 ノックアウトマウス (Angptl2 KO) では野生型マウス (WT) に比べて、脂肪組織へのマクロファージの浸潤や IL-6 や TNF- α といった炎症性サイトカインの発現量が減少していることが報告されている。逆に、Angptl2 を持続的に高発現するトランスジェニックマウスでは、通常肥満病態でみられる脂肪組織におけるマクロファージの浸潤や、血管壁に接着した白血球の増加、IL-6、TNF- α 、IL-1 などの炎症性サイトカインの発現の上昇が認められ、慢性炎症が惹起されている。Angptl2 による慢性炎症誘導の分子メカニズムとしては、Angptl2 が血管内皮細胞に作用し、Rac を活性化することで細胞の遊走を促進すること、NF- κ B のサブユニットの核内移行を促進することで炎症経路を活性化させること、単球細胞の遊走能を促進することなどが明らかにされている。

我々はマウス腹部大動脈瘤病態モデルで解析を行い、動脈瘤に浸潤したマクロファージに Angptl2 が強く発現していること、

MMP-9 の発現が上昇していることを示した。WT に比し Angptl2 KO では大動脈瘤の発生が抑制されることを見出した。腹部動脈瘤の病態には、浸潤したマクロファージより分泌された Angptl2 が MMP-9 の発現を介してその発生に関与していることを報告した(15)。以上のように血管における局所的な Angptl2 の発現が血管炎症を惹起し、病態形成および進展に関与していると考えられる。そのため動脈硬化性疾患としての脳動脈瘤の発生、増大、破裂の病態に慢性炎症、特に Angptl2 が関与していることが強く推測される。その関与が明らかにされれば、Angptl2 が脳動脈瘤の治療標的になる可能性があると考えられる。

2. 研究の目的

研究の最終的な目標は、脳神経外科領域で重要な疾患のひとつである、くも膜下出血を予防することである。本研究の具体的な目標は、くも膜下出血の原因である脳動脈瘤の発生、増大、破裂の分子メカニズムを明らかにすることである。

- 1) ヒト脳動脈瘤組織に、Angptl2 の存在を証明する。
- 2) マウス脳動脈瘤モデルで、Angptl2 の存在を証明する。
- 3) Angptl2 を抑制することにより、脳動脈瘤の発生、増大が抑えられるかを明らかにする。
- 4) 未破裂動脈瘤の経過と血中 Angptl2 値との相関を検討する。
- 5) 脳動脈瘤の発生、増大、破裂を薬物で予防する可能性を検討する。

3. 研究の方法

臨床脳動脈瘤サンプルおよびマウス脳動脈瘤モデルを用いて、脳動脈瘤の病態と Angptl2 の関連を明らかにする。Angptl2 を抑制することにより、脳動脈瘤の発生、増大、破裂を予防することができるかを明らかにする。

当科には既に 20 例以上の破裂、未破裂脳動脈瘤のサンプルが保存してある。また、免疫染色を施行し、脳動脈瘤にはマクロファージが浸潤していることを確認している。破裂、未破裂脳動脈瘤のサンプルを免疫染色の手法を用いて Angptl2 の発現、局在の比較検討を行う。マクロファージのマーカー等との二重染色を行い、レーザー共焦点顕微鏡を用いて観察し、Angptl2 の局在を明らかにする。コントロールとして、浅側頭動脈、頭蓋内動脈のサンプルも同様に検討する。脳動脈瘤サンプルを用いて、quantitative RT-PCR の手法を用い、Angptl2、TNF- α 、IL-1、IL-6、MMP-9 などの発現を確認する。

マウスを用いて、実験的脳動脈瘤を作成する。このモデルは既に確立されており、当科でも作成し、実験を行っている。上記(1)と同様の免疫染色、RT-PCRを行い、ヒト脳動脈瘤と比較し、モデルの正当性を確認する。Wt マウス、Angpt12 KO マウスを用いて、脳動脈瘤モデルを作成する。脳動脈瘤サンプルにおいて、Angpt12、TNF、IL-1、IL-6、MMP-9 などの発現を免疫染色、RT-PCR の手法を用いて比較検討する。

WT マウス及び Angpt12 KO マウスで脳動脈瘤モデルを作成し脳動脈瘤の発生・増大・破裂の病態に両群で違いがあるのかを検討する。まず、両群での発生率の差を検討する。発生率に変化がない場合は、その増大率、破裂率を検討する。

WT マウス及び Angpt12 KO マウスに対し放射線照射を行うことにより、血液幹細胞を死滅させ、その照射マウスに対して WT または Angpt12 KO マウスから抽出した骨髄を投与して骨髄移植マウスを作成する。これらのマウスを用いて、脳動脈瘤を作成する。

ドナー	骨髄移植	レシピエント
I	WT	WT
II	Angpt12 ^{-/-}	WT
III	WT	Angpt12 ^{-/-}
IV	Angpt12 ^{-/-}	Angpt12 ^{-/-}

これらの4群で動脈瘤の発生、増大率等を検討し、動脈瘤に浸潤したマクロファージと Angpt12 の関与を検討する。

4. 研究成果

(1) 未破裂脳動脈瘤7例、破裂脳動脈瘤8例の計15例の動脈瘤サンプルを免疫染色に供した。

(2) また、6例の浅側頭動脈、3例の中大脳動脈、2例の前大脳動脈も同様の免疫染色に供し正常コントロールとした。

(3) 未破裂脳動脈瘤群、破裂脳動脈瘤群、コントロール群それぞれで年齢、BMI、動脈瘤のサイズに有意差を認めなかった。

(4) 動脈瘤14例中12例にMの浸潤を認めた。全体的に未破裂脳動脈瘤ではCD68の染色性は低く、浸潤がない2例は未破裂脳動脈瘤であった。

以上の結果をふまえ、マウス脳動脈瘤モデルを作成したが、WT マウスと Angpt12 ノックアウトマウスでの動脈瘤の発生頻度、形態、出血の頻度に有意差を認めなかった。

ここで、実験系の再考を行い、脳虚血との関連を検討することとした。

8-10週令 C57Bl/6 マウスを用い、局所脳虚血再還流モデルを作製。通常脳内では脈絡叢のみで発現が見られる Angpt12 が虚血巣において高発現していることがわかった(図1)。そこで野生型マウスと Angpt12 ノックアウトマウスを用い、局所脳虚血再還流モデルを作製。Angpt12 ノックアウトマウスにおいて神経学的機能の悪化が抑制され、脳梗

塞の体積が抑えられることが確認された(図2)。

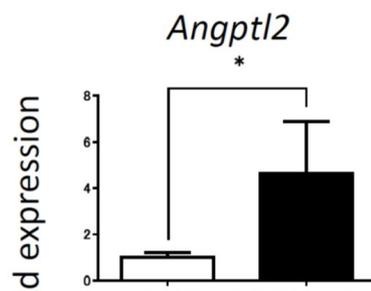


図1

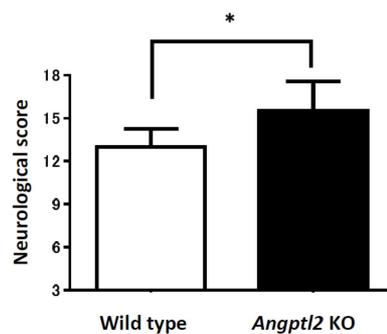
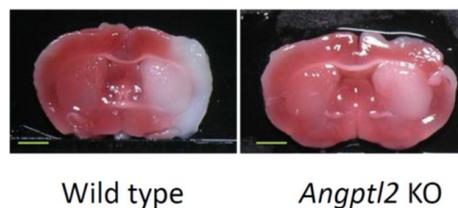


図2



この神経保護効果の機序を検討すると、Angpt12 ノックアウトマウスの脳梗塞巣では野生型に比べ proinflammatory cytokine である Il-1、Tnf- の発現が抑制されていることがわかった(図3)。

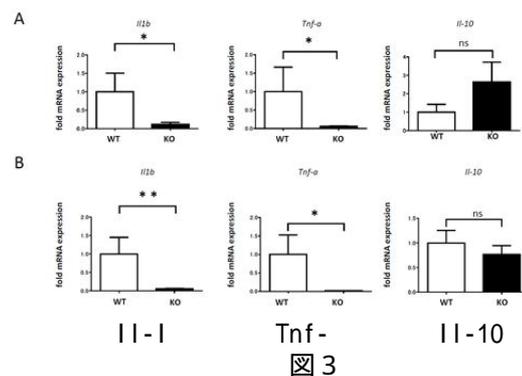


図3

骨髄移植を用いた実験では Angpt12 ノックアウトマウスの骨髄を移植したマウスで脳梗塞が軽度となることがわかった(図4)。また、これまでの報告で骨髄由来細胞のうちマクロファージから Angpt12 が分泌されていることが知られている。そこでマクロファージ細胞株である RAW264.7 にリコンビナント Angpt12 を添加したところ、Il-1、Tnf-

が高発現することがわかった(図5)。以上の結果からマウス局所脳虚血再還流モデルにおいて骨髄由来マクロファージから分泌されるAngpt12がオートクリンとして働き、炎症性サイトカインを増加させて脳梗塞急性期における炎症を悪化させているものと考えられた。

以上の研究成果を現在国際学術誌に投稿中である。

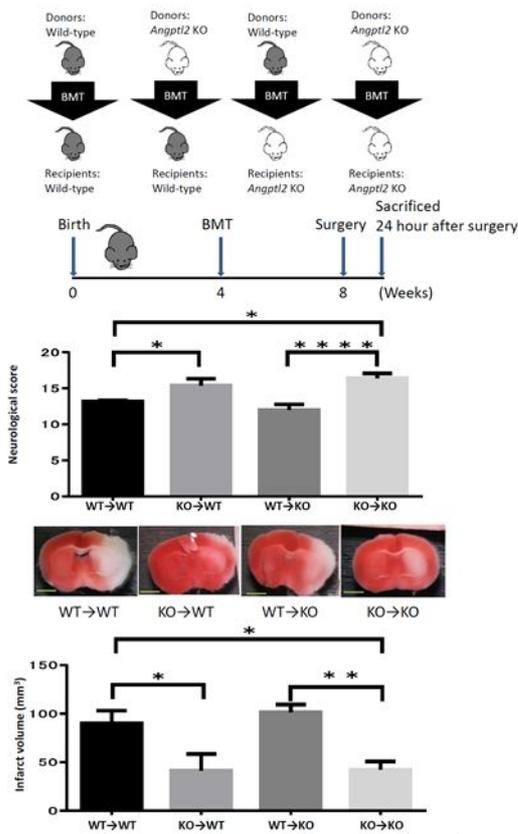


図4

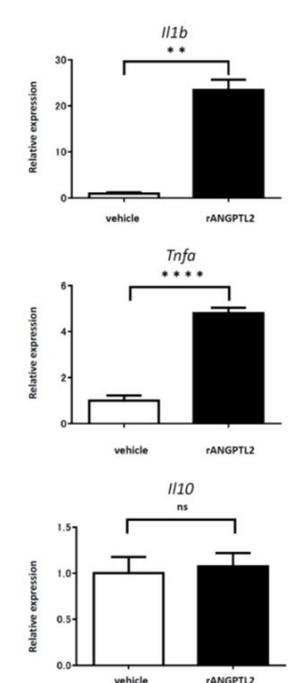


図5

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 0件)

[学会発表](計 0件)

[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:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

河野 隆幸 (KAWANO, Takayuki)
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号: 50448536

(2)研究分担者

倉津 純一 (KURATSU, Junichi)
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号: 20145296

大森 雄樹 (OHMORI, Yuki)
熊本大学・医学部附属病院・特任助教
研究者番号: 60599116

宮田 敬士 (MIYATA, Keishi)
熊本大学・大学院生命科学研究部・特任准
教授

研究者番号: 50398228

(3)連携研究者

尾池 雄一 (OIKE, Yuichi)
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号: 90312321