

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 11 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460874

研究課題名(和文) 脳脊髄液の性状が脳動脈壁組織脆弱性に与える影響についての検討

研究課題名(英文) Analysis of vascular tissue fragility of cerebral arteries affected by cerebrospinal fluid.

研究代表者

塚 正彦 (Zuka, Masahiko)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：00272956

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)：法医解剖事例における小型の未破裂脳動脈瘤の頻度と分布を、脳脊髄液(CSF)の生化学的性状と併せて解析した結果、CSF中のゼラチナーゼ(galatinase A及びgalatinase B)活性が脳動脈瘤早期病変の鋭敏な指標となりうる($p<0.001$)事が分かった。また、CSF中のゼラチン分解活性は、局所におけるCa調節を司る α -Klotho蛋白の部位別測定値(脳槽CSF、側脳室CSF及び血清中に各々542～5,461 pg/mL、2,758～5,971 pg/mL及び600～5,556 pg/mL)とも連動しており、病理組織学的解析と併せてCa濃度依存性の脳動脈瘤進展のメカニズムが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The frequency and distribution of unruptured cerebral aneurysms of minimal size in forensic autopsy cases were analyzed, measuring the activities of galatinases in cerebrospinal fluid(CSF). The results showed that gelatinolytic activities of CSF generated from galatinase A and B can serve as good markers of early-stage cerebral aneurysm ($p<0.001$). Moreover the gelatinolytic activities of CSF demonstrated parallels with the concentration of α -Klotho protein by which Ca deposition is controlled locally in the body. Therefore, combined with the microscopic findings, these Ca-dependent biochemical values of CSF can help to predict the development of cerebral aneurysms.

研究分野：法医学

キーワード：脳動脈瘤 プロテアーゼ 脳脊髄液 カルシウム α -Klotho蛋白

1. 研究開始当初の背景

脳脊髄液は1日500-600 mL産生され、常時100-150 mLが中枢神経の周囲(脳室及びくも膜下腔)を満たす。その役割は1)物理的な緩衝作用2)生化学的に恒常性を保つ(ホメオスタシス)ことが予想されるが、近年、脳脊髄液中のアミロイドの脂質化レベルが認知機能低下に関連する(Hanson AJ, JAMA Neurology 70,972-80,2013)等、測定技術の進歩に伴い、生化学的性状がある疾患の病態に応じて変化することが知られるようになってきた。一方、脳表面における脳動脈の外膜は、心冠動脈及び大動脈等とは異なり、液体成分である脳脊髄液に浮かぶ様にして直接曝露するという体内で特殊な環境におかれている。

2. 研究の目的

脳脊髄液はその性状を調べる事により、検死段階において頭蓋内出血の指標として定着しており、解剖で開頭を行う場合には、血液や尿と並んで身近に取り扱われる検体である。一方、内因性急死事例全体の1割以上を脳血管異常が占め、更に脳神経外科領域における医療訴訟の数は未破裂脳動脈瘤に続き破裂脳動脈瘤に関するものが多く、合計した脳動脈瘤関連例の割合は約40%を占める(『脳動脈瘤とくも膜下出血』医学書院2013年)。本研究の目的は、脳血管壁組織の脆さに基づく予測不能な死のメカニズムを病的形態及び脳脊髄液の生化学的性状に着目して検討し、頭蓋内出血に対する法医診断の精度を向上させると共に、予防医学的側面から臨床医学との連携を深め突然死の減少を図る事である。

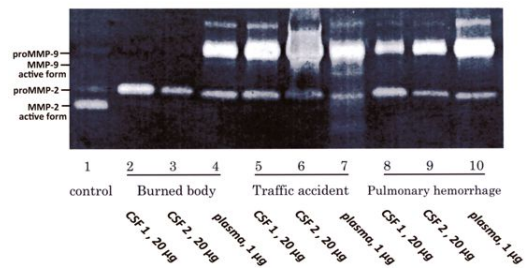
3. 研究の方法

<平成26年度>初年度はヒト脳脊髄液・組織材料採取及び検査法の精度向上に勤めた。ヒト脳血管(動脈)組織は、内因性急死例を中心に対照としての冠動脈と共に採取された。<平成27年度>ヒトCSF及び組織材料採取、及び検査法そのものの精度向上に努めた。ヒト脳血管(動脈)組織は複数の場所を定め(前後交通動脈、左右中大脳動脈及び脳底動脈)、内因性急死例を中心に対照としての冠動脈、大動脈及び総頸動脈と共に採取された。<平成28年度>生化学的解析では、ゼラチンゼイモグラフィ及びEIA(Enzyme Immuno Assay) サンドイッチ法による α -Klotho 蛋白を行った。

4. 研究成果

<平成26年度>ヒト脳脊髄液及び脳動脈材料の採取及び検査法の精度向上が本研究の重要な基礎となる。1)検査の質即ち感受性及び特異性の向上を図った。本来高感度であるゼラチンゼイモグラフィは脳血管を含む様々な血管試料に対応しうるが乾燥重量等でその標準化に努めた。26年度脳脊髄液のプロテアーゼ活性の概要をヒト材料で確認することに重点を置いた。タンパク量30microgramを試料に用いたゼラチンゼイモグラフィでは、正常ヒト脳脊髄液のプロテアーゼ活性は検出下限程度であることが判明した。2)検査法汎用化の一環として、検査コスト削減の可能性を探った。組織材料の集中化を法医解剖事例の病理組織学的検索で試み、tissue array的手法で血管組織を含む平均15検体をマイクロカセット3個程度で収めることに成功している。ゼラチンゼイモグラフィでは界面活性剤や基質に用いるゼラチンの代替品の使用が可能であるかを検討した。初年度はヒト脳脊髄液・組織材料採取及び検査法の精度向上に勤めた。ヒト脳血管(動脈)組織は、内因性急死例を中心に対照としての冠動脈と共に採取された。1)虚血性心疾患が年間5例、死因の責任病変とならない不完全狭窄病変は年間100病変を越えた採取及び検索がなされたため、当初予定していた50病変を大きく上回った。2)脳動脈瘤破裂5例、脳動脈瘤を死因としない未破裂の脳動脈瘤は年間20事例で確認され、複数の病変を有する事例が含まれるため延べ約30病変が予想されたが、26年度の統計ではほぼ見込み通りであった。また、慢性疾患の脳血管(動脈)組織についても対照としての冠動脈と共に採取された。3)脳血管性認知症が年間5~10例見込まれ、粥腫性動脈硬化性病変は複数の病変を有する事例が多く含まれるため延べ約100病変以上が見込まれた。対照として大動脈及び左総頸動脈については全例場所を決めて採取するため年間50検体が見込まれた。以上の見積もりにより、形態学的観察及び生化学的解析に必要な組織量が本研究において不足する事はないと予想されたが、無事達成できた。このように、法医解剖における死因検索のための採材は期待通りに行う事ができた。<平成27年度>ヒト脳脊髄液(cerebrospinal fluid 以下CSF)及び脳動脈組織材料の採取、及び検査法の精度向上を基礎として本研究が成り立つ。1)平成26年度に試みた、検査の質即ち感受性及び特異性向上の実績を受け継続して行ったところ、タンパク質量にして30microgramが正常ヒトCSFを用いた場合のプロテアーゼ活性検出下限とみられていたが、精度向上に励んだ結果、事例・臓器別に量的な比較検討が可能にまで検出感度を上げることに成功した。2)検査法汎用化に向けて検査コストを抑える試みは不可避であるが、平成26年度に法医解

剖事例の病理組織学的検索で「組織材料の集中化」を図り、tissue array 的手法で剖検 1 体あたり血管組織を含む平均して約 15 臓器・組織に及ぶ検体をマイクロカセット 3 個程度に収めることに成功した他、ゼラチンゼイモグラフィーでは界面活性剤や基質に用いるゼラチンの代替品、さらには平成 27 年度には既製品であるプレキャストゲルとの比較検討も行った。3) 遺伝子改変マウスを用いた解析は、26-27 年度にヒト組織材料から得られたプロテアーゼ活性の知見を元に、血管組織、血清及び CSF をヒト材料に準じた条件においてデータ蓄積を試みた。使用可能な遺伝子改変マウスは LAT mutant (自己免疫疾患モデルマウスとして共同研究、IgG4 関連疾患の解析の一環として検討中) などがあるが、遺伝子改変を行うことなく血小板活性をマウスの体内外で制御することが可能で、血液中の因子である血小板の有無を CSF と血清との間の大きな違いの一つとして捉えるならば、論文発表に至った Thrombosis Research (Zuka M 筆頭著者同等 2016 年) の実績は大きな成果といえる。2 年目は日常業務としての法医解剖事例数が前年度の約 1.4 倍に達し、死因・病変の内訳もほぼ同様 (虚血性心疾患年間 5 例; 脳動脈瘤破裂同 5 例; 血管性認知症同 5~10 例) であったため、形態学的観察及び生化学的解析に必要な組織 (CSF と共に) 量が本研究に不足する事はない事が再確認され、引き続きこれらの HE (ヘマトキシリン・エオジン) 染色を中心とした標本作製ならびに観察を行った。生化学的解析では、ゼラチンゼイモグラフィーの手技及び精度が一定の達したとみて、小動脈瘤の分布ならびに中枢神経が関わる器質性疾患の有無との対応付けを行った。<平成 27-28 年度> その結果、小動脈瘤の発生頻度及び一事 (症) 例内での分布に CSF 中にゼラチン分解活性が鋭敏に対応し ($p < 0.001$)、内因及び外因別の事例にも安定した傾向を示した (下図)。また、脳槽 CSF、側脳室 CSF 及び血清中に各々 542~5461 pg/mL、2758~5971 pg/mL 及び 600~5556 pg/mL の α -Klotho 蛋白が検出された事実と併せて、頭蓋内カルシウム依存性プロテアーゼの活性化と脳動脈瘤初期病変との相関、あるいは死因となり得るレベルでは、外因の影響が予想された。



図：異状死体の脳脊髄液及び血清のゼイモグラム。0.1%ゼラチン基質を用いたゼイモグラフィーにおいて、脳脊髄液 (CSF) 及び血清から MMP-2 (プロテナーゼ、活性化型) 及び MMP-9 (プロテナーゼ、活性化型) が検出された。CSF1 及び CSF2 は、各々の異状死事例 (左から焼死、交通事故死及び急性肺出血) 毎に、頭蓋内の直接的損傷部位以外の定点 (橋槽; 側脳室) から採取された脳脊髄液である。

既に脳脈絡叢における α -Klotho 蛋白の発現が確認されており、カルシウムの供給とプロテナーゼ活性の局在との関係を各々内因及び外因に対応させることで、新規の MMP 活性化のメカニズムを証明する準備が整った (論文準備中)。

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3件)

Weber MR*, Zuka M*, Lorger M, Tschan M, Torbett BE, Zijlstra A, Quigley JP, Staflin K, Eliceiri BP, Krueger JS, Marchese P, Ruggeri ZM, Felding BH. Activated tumor cell integrin α 3 cooperates with platelets to promote extravasation and metastasis from the blood stream. Thromb Res. 2016; 140: Suppl 1. * equally contributed. 査読有

美邊暁, 七條美里, 永江圭吾, 大島徹, 塚正彦. 水中死体から採取する体腔液を用いたプランクトン検査. 法医学の実際と研究. 2014; 57: 59-67. 査読有

塚正彦, 大島 徹. 法医学と予防医学. 日本予防医学会雑誌. 2014; 9: 111-115. 査読有

[学会発表](計10件)

岡田真治, 武市敏明, 美邊暁, 橋田真之介, 塚正彦. 血管病変進展におけるマクロファージの役割 - 川崎病冠動脈瘤で認めた動脈粥状硬化性病変より -. 第38回日本法医学会学術中部地方集会, 2016年10月15日, 福井.

五十嵐義幸, 武市敏明, 小幡泰晴, 美邊暁, 青山崇, 舟山一寿, 高塚尚和, 塚正彦. 石川県及び新潟県における2014年溺死体の水中死体プランクトン検査結果の比較検討. 第100次日本法医学会学術全国集会, 2016年6月17日, 東京.

武市敏明, 北村修, 王路, 塚正彦. Methamphetamine 反復投与における線条体のストレス応答についての基礎的検討. 第100次日本法医学会学術全国集会, 2016年6月16日, 東京.

岡田真治, 武市敏明, 五十嵐義幸, 美邊暁, 川島靖正, 石黒太郎, 山本悟, 石山皓一, 塚正彦. 冠動脈瘤を有する8歳女児川崎病突然死の一例. 第105回日本病理学会総会, 2016年5月14日, 仙台.

山田和徳, 塚正彦, 伊藤清亮, 鈴木康倫, 覚知泰志, 小野江為人, 川野充弘. IgG4 関連疾患モデルマウスの確立とその応用 ~ IgG4 関連疾患における APRIL の関与 ~. 第8回 IgG4 研究会, 2015年3月21日, 福岡.

塚正彦, 武市敏明, 美邊 暁. 脳内出血を伴う自動二輪運転中の交通事故の一例. 第37回日本法医学会学術中部地方集会, 2015年10月16日, 甲府.

塚正彦, 武市敏明, 北村 修, 大島 徹, 美邊 暁. 水中死体の体腔液を対象としたプランクトン検査の意義. 第99次日本法医学会学術全国集会, 2015年6月12日, 高知.

Yamada K, Zuka M, Ito K, Suzuki Y, Kakuchi Y, Onoe T, Yamagishi M, Kawano M. Inhibition of APRIL suppresses disease progression: Analysis from a novel mouse model for IgG4-related disease. The 2nd International Symposium on IgG4-RD & Associate Conditions, 2014年2月18日, Honolulu, USA.

塚正彦, 大島徹. スクリュー損傷に基づく外傷性ショックで死亡した1事例. 第36回日本法医学会学術中部地方集会, 2014年10月18日, 豊岡.

塚正彦, 大島徹. 異状死体で発見されたスズメバチ刺症の1事例. 第98次日本法医学会学術全国集会, 2014年6月19日, 福岡.

[図書](計1件)

1. 山田和徳, 塚正彦, 川野充弘. IgG4 関連疾患のモデル動物. IgG4 関連疾患実践的臨床から病因へ - IgG4 研究会モノグラフ - (前田書店) ISBN:9784944121236. 2015; 198-202.

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

塚正彦 (Zuka Masahiko)
金沢大学・医学系・講師
研究者番号: 00272956

(2)研究分担者

(3)連携研究者

()

(4)研究協力者

()