

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861145

研究課題名(和文) 血行力学的ストレス負荷に注目した脳動脈瘤増大機構の解析

研究課題名(英文) The mechanisms underlying the enlargement of intracranial aneurysm focused on hemodynamic stress loading

研究代表者

青木 友浩(TOMOHIRO, AOKI)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40633144

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：くも膜下出血の原因疾患である脳動脈瘤の増大や破裂が低い血行力学的ストレス負荷状態や乱流と関連することが示唆される。本検討ではその分子機序を検証した。その結果、培養血管内皮細胞では低い血行力学的ストレス負荷および乱流負荷のもとでは炎症細胞の接着や遊走を制御する遺伝子群(MCP-1など)の有意な上昇が認められた。続いて、脳動脈瘤モデルラットを使用した検討ではMCP-1は脳動脈瘤形成とともに脳動脈瘤病変部の内皮細胞で発現誘導が生じその発現が脳動脈瘤の進展過程でも維持された。すなわち上記の圧負荷状態が炎症細胞浸潤を維持させている事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Intracranial aneurysm (IA) is a socially important disease as a major cause of subarachnoid hemorrhage. We have, recently, clarified contribution of MCP-1-mediated macrophage infiltration and macrophage-evoked inflammatory responses to the pathogenesis of IA. In the other point of view, hemodynamic status surrounding IA lesion is dramatically changed during IA progression, high wall shear stress in formation and low walls shear stress with concomitant turbulent flow in progression. Based on these findings, we have analyzed the causative relationship between hemodynamic stress and MCP-1 expression in these cells of IA walls. We found that both high wall and low shear stress with concomitant turbulent flow induced MCP-1 expression in culture endothelial cells and that, in rat model of IAs, MCP-1 expression was sustained once after induced at the early stage. These results suggest that, independence of dramatically changes in hemodynamic status, MCP-1 expression is sustained.

研究分野：脳神経外科

キーワード：脳動脈瘤 血流 内皮細胞 マクロファージ MCP-1 乱流 ずり応力

1. 研究開始当初の背景

脳卒中の中で最も重篤な疾患であるくも膜下出血は、脳血管分岐部に形成される嚢状病変である脳動脈瘤の破裂により発症する死亡率が50%に至り後遺症率も高い疾患である。加えて脳動脈瘤は、人口の数%に存在する頻度の高い疾患である事からも社会的に重要な疾患である。さらに現在、脳動脈瘤の破裂すなわち致命的なくも膜下出血の発症を予防するための薬物治療法が存在しないため外科的加療の適応とならない非常に多くの症例で無治療である事が社会的問題である。この現状を打破し新規の薬物治療法を開発を通じ結果的にくも膜下出血による社会的損失や破裂の不安により社会活動の低下を低減させるためには、脳動脈瘤の発生、増大そして破裂の機構を明らかとし創薬のための標的因子を同定することが必須である。

近年の疫学的検討により脳動脈瘤の増大に伴い瘤の年間破裂率が有意に増加する事が明らかとなった事 (Morita ら, N. Engl. J. Med. 2012) から、脳動脈瘤の薬物治療は脳動脈瘤の破裂の予防のみでなく増大を抑制する事が目標となる。今日までの申請者らの検討より、脳動脈瘤が脳血管分岐部に負荷される高い血行力学的ストレスにより誘発される脳血管の慢性炎症疾患である事が明らかとなってきた (Aoki ら, Trends Pharmacol. Sci. 2012, Aoki ら, Br. J. Pharmacol. 2011, Aoki ら, Stroke 2009, Aoki ら, Circulation 2007)。しかし、脳動脈瘤がなぜ増大や破裂するかについての分子機構は現在に至るまで明らかでなく、そのため脳動脈瘤増大および破裂抑制のための薬物治療戦略や創薬標的が存在しない。ここで、主にヒト脳動脈瘤臨床症例の画像情報を使用したコンピューターシミュレーションによる血行力学的検討から、脳動脈瘤発生増大は血行力学的ストレスと密接に関係し、一旦

形成され増大過程にある脳動脈瘤や破裂した脳動脈瘤ではその内部は脳動脈瘤誘発時に認められる高い血行力学的ストレスとは異なり低い血行力学的ストレス負荷状態にある事が示されている (Fukazawa ら, World Neurol. 2013, Omodaka ら, Cardiovasc. Dis. 2012 Tanoue ら, Am. J. Neuroradiol. 2011, Bousset ら, Stroke 2008)。また、増大や破裂を来す脳動脈瘤内部では血流ストレスは通常の血管に負荷される長軸方向の層流ではなく乱流である事も明らかとなっている (Fukazawa ら, World Neurol. 2013, Omodaka ら, Cardiovasc. Dis. 2012 Tanoue ら)。これらの事から、脳動脈瘤増大や破裂は脳動脈瘤発生と全く異なり低くかつ乱流である血行力学的ストレス負荷下で生じる事が推測される。

しかし、これらの血行力学的条件下で内皮細胞にどのような反応が生じるか、特に高い血行力学的ストレス下でみられたような炎症反応が生じるかについては明らかでない。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、本研究では脳血管壁への血行力学的ストレス負荷に注目し、研究期間内に以下の二点につき明らかとすることを目的とする。まず、脳動脈瘤増大時に生じる低くかつ乱流である血行力学的ストレス負荷を臨床画像に基づくコンピューターシミュレーションで計算した後、その圧を *in vitro* の系で培養血管内皮細胞に培地の還流により負荷しストレス負荷下で誘導される遺伝子発現変化を網羅的に検討する。そして、引き続き *in vitro* の系から抽出された発現変動を来し脳動脈瘤増大へ関与することが推測される遺伝子およびその産物につき脳動脈瘤増大への寄与を動物モデルを使用し明らかとする。以上の *in vitro* と *in vivo* の検討を融合させる事により、脳動脈瘤に対

する新規薬物治療法開発のための創薬標的因子を同定する事を目的とする。

3. 研究の方法

以下項目につき順次検討を進める。

(1) ヒト未破裂脳動脈瘤の臨床画像を使用したコンピューター3Dシミュレーションによる血流解析に基づく正常血管、脳動脈瘤内部での各々の血行力学的ストレス負荷状態(壁面せん断応力; ずり応力)の数値化。

(2) 単層培養した初代培養ヒト頸動脈内皮細胞を使用し前項1)にて数値化された壁面せん断応力を培地の還流等により負荷。また、ずり応力を発生させる層流は平板式流れ負荷装置で、乱流は回転盤式流れ負荷装置(Ohura, Yamamotoら, J. Atheroscler. Thromb, 2003)で負荷。

(3) ストレス負荷後の内皮細胞を回収しRNAを抽出。抽出したRNAを使用し、次世代シーケンサによりRNAシーケンスを行い網羅的に発現遺伝子プロファイル情報を取得。その後、取得された発現遺伝子情報から正常血管と脳動脈瘤内部の各力学的条件の差異による発現変動遺伝子群を同定。

(4) 同定された各変動遺伝子の産物につきモデル動物に誘発した脳動脈瘤での発現状況および脳動脈瘤進展につれたその推移を免疫組織化学で確認。

4. 研究成果

くも膜下出血の原因疾患である脳動脈瘤の増大や破裂が低い血行力学的ストレス負荷状態や乱流と関連することが示唆される。本検討ではその分子機序を検証した。

ヒト脳動脈瘤病変3例の血流動態解析により脳動脈瘤内部ではすべての症例において母血管に比較した著明に低いずり応力状態であることを確認した(3例の平均ずり応力

値、内部; 0.017 Pa、母血管; 3.0 Pa)。引き続き、初代培養ヒト頸動脈内皮細胞を使用し上記の圧状況を模倣して平板式流れ負荷装置をもちいて3.0 Paおよび0.05 Paのずり応力を24時間負荷した。合わせて、回転盤式流れ負荷装置により乱流を負荷する群も作成した。負荷後の細胞からRNAを抽出しRNAシーケンス法によりこれらの圧条件下での変動遺伝子につきそのプロファイルを取得した。RNAシーケンスでは各条件で各々解析に十分なリード数を獲得した。その結果、培養血管内皮細胞では低い血行力学的ストレス負荷および乱流負荷のもとでは炎症細胞の接着や遊走を制御する遺伝子群(MCP-1, CX3CL1等)の有意な上昇が認められた。また、これら遺伝子の発現は、低いずり応力と乱流の双方で誘導されるがその両者が加わることで相加的に増加した。さらに、乱流負荷のもとでは細胞増殖・分裂関連遺伝子群(Cdk等)の発現誘導を認めた。Gene Ontology解析では、正常血管の3.0 Paと病変内の0.05 Paに乱流を負荷した群を比較検討すると実際に、'nucleosome', 'mitotic cell cycle', 'DNA replication'といったtermが0.05 Paに乱流を負荷した群で亢進しているものとして同定された。一方で、炎症細胞浸潤の経路はGene Ontology解析では抽出できなかった。しかし、定量的RT-PCR法ではRNAシーケンスでの解析結果と一致して、0.05 Paに乱流を負荷した群において3.0 Paの負荷群に比較してMCP-1, CX3CL1等の遺伝子発現が有意に亢進していた。

続いて、これらの遺伝子発現上昇が実際のin vivoの病態伸展に寄与しているかを検討するために脳動脈瘤モデルラットを使用した検討を行った。本モデルでは、オス7週齢SDラットを使用し左総頸動脈結紮と全身的高血圧誘導(高塩分食負荷、片側腎動脈結紮)により閉塞側と対側の脳血管分岐部に脳動脈瘤が誘導される。この脳動脈瘤モデルラッ

トを使用した検討ではMCP-1は脳動脈瘤形成とともに脳動脈瘤病変部の内皮細胞で発現誘導が生じその発現が脳動脈瘤の進展過程でも維持された。一方で、CX3CL1の発現は脳動脈瘤形成細時点でもすでに発現しており、脳動脈瘤病変誘導によってもその発現に明らかな変動は認めなかった。引き続き、脳動脈瘤病変内での細胞増殖をBrdU誘導体EdUの投与により検討したが病変部の内皮細胞での細胞増殖の所見(EdU取り込み細胞の存在)は明らかでなかった。

これらの検討から、脳動脈瘤形成時に高い血流ストレス負荷のもとで脳血管分岐部に発現誘導されたMCP-1が脳動脈瘤形成後の伸展段階でたとえ内部の圧条件が低い血流ストレス負荷と乱流に変化しても維持されることが明らかとなった。これらの結果は、脳動脈瘤病変部では圧条件の著明な変容にもかかわらず炎症細胞浸潤が維持され結果としてマクロファージ依存的な炎症反応が持続するという従来知られている知見に対し、その機構の一端を明らかにするものである。また、乱流の負荷による内皮細胞での炎症細胞の接着や遊走を制御するMCP-1などの遺伝子群の発現誘導は、脳動脈瘤破裂部位では乱流が認められるという血流動態解析の結果とも考えあわせると、病変内での乱流成分の発生により炎症細胞浸潤が亢進した結果炎症反応が増強しそれが脳動脈瘤破裂に結びつくという事を示唆すると思われた。よって、脳動脈瘤の破裂予防すなわちくも膜下出血発症予防を考えるとこれらMCP-1等本検討から見いだされた因子が破裂予防のための創薬標的となり得ることが示唆された。

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 1 件)

Tomohiro Aoki, Kimiko Yamamoto, Miyuki

Fukuda, Yuji Shimogonya, Shunichi Fukuda, Shuh Narumiya. Sustained expression of MCP-1 by low wall shear stress loading concomitant with turbulent flow on endothelial cells of intracranial aneurysm. Acta Neuropathologica Communications, 査読, 4(1), 2016, 48
<http://actaneurocomms.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40478-016-0318-3/D01> : 10.1186/s40478-016-0318-3. in press

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) Tomohiro Aoki Cerebral aneurysm as a hemodynamic stress-regulated inflammatory disease. ICS2015 (Interdisciplinary Cerebrovascular Symposium / Intracranial Stent Meeting), 2015・11・13, Gold Coast, Australia

(2) Tomohiro Aoki, Kimiko Yamamoto, Miyuki Fukuda, Shuh Narumiya. Sustained expression of MCP-1 regardless changes in hemodynamic status during intracranial aneurysm formation/progression. 第 88 回日本薬理学会年会 2016・3・11 神奈川

〔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

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青木 友浩 (AOKI, TOMOHIRO)
京都大学・医学研究科・特定准教授
研究者番号：40633144

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし