

家族性モヤモヤ病原因遺伝子のポジショナルクローニング

吉本高志、 池田秀敏

はじめに

我々は、平成9年度の研究報告書にて、家族性モヤモヤ病の原因遺伝子解明のため、家族性モヤモヤ病の3家系を用い、Positional cloningの解析を行った結果、第3染色体の3P24-25の付近でLod scoreが上昇したことを報告した。今回は、家族性モヤモヤ病に共通の遺伝的因子(=モヤモヤ病の疾患原因遺伝子)を探るべく、さらに家系を13増やし、この領域を中心に解析を行ったので報告する。

対象

先に検討した、東北大学脳神経外科の家族性モヤモヤ病3家系の検討結果に加え、九州大学脳神経外科、及び、「モヤモヤ病の患者と家族の会」の協力により得られたモヤモヤ病の家族発生家系13例を検討した。この家系の内訳は、兄弟発症13家系、親子発症2家系である(図1)。これらの家族構成員のうち、新たに54名からの採血が加えられた。

方法

1、DNAの抽出

採取した末梢血10mlより、白血球成分を分離し、Proteinase KとSDSにてdigestionを行い、これより、Phenol/chloroformを用いて、DNAの抽出を型の如く行った。

2、polymorphic DNA locusの選定

検討したマーカーは、前回候補染色体として上がった、第3、10、12、13染色体のうち、Lod scoreが1以上であったlocusを中心に行った。既に確定されているDNA多型マーカーの合計24 Locusについて検討した。

多型解析には、この24個の遺伝子部位につき、それぞれ、プライマーを作製した[未知の遺伝子疾患のスクリーニング用のキット (Human Linkage Screening Set. Ver. 6)として、平均11.8 cMの間隔の334個の遺伝子マーカーが売られている(Research Genetics社)のでこれを用いた]。

3、PCR条件の選択

24対のプライマーとコントロールのGenomic DNAを用い、PCR (polymerase chain reaction)の反応を行った。PCRは、既に検討確定した、この反応を行うための、Buffer (MgCl₂, pH), annealing temperatureの至適条件を用いて、それぞれの遺伝子座につきPrimer pairを6pmol ずつ、10 xのamplification buffer (1.0-2.5mM MgCl₂, 20mM Tris [pH8.4 or 8.6], 50mM KCl)を1.5 μ l、200 μ MのdNTPsを

1.5 μ l, Taq polymeraseを1 unit, template DNAを100ng, そして、distilled waterを加えて、総量で15 μ lとなるように混合した。これを、PCR (ASTEPC-800)を用いて遺伝子の増幅を行った。PCRの条件は、Long denaturationを94 $^{\circ}$ C、を5分間行った後、Annealing; 52-62 $^{\circ}$ C、1分30秒、Polymerization; 71 $^{\circ}$ C、2分間、Denaturation; 94 $^{\circ}$ C、1分15秒のステップを35回繰り返すというプログラムで行った。

4、ポリアクリルアミドゲル電気泳動

抽出した血液DNAを用い、32 P-dCTPを用い、先に決定した至適PCRの条件下でPCRを行った。このPCR産物を用いて、6%ポリアクリルアミドゲル電気泳動(80W, 2-3時間)を行った。この際、10 base 毎にLadderの現れるDNA size marker (SequaMark, Research Genetics, Inc.)を使用した。これをオートラジオグラフィーによりFilmに感光(2時間-4日)させ、多型のパターンを判断した。今回は、4つの染色体の24 locusについて検討した。

5、多型の解析、連鎖の検定

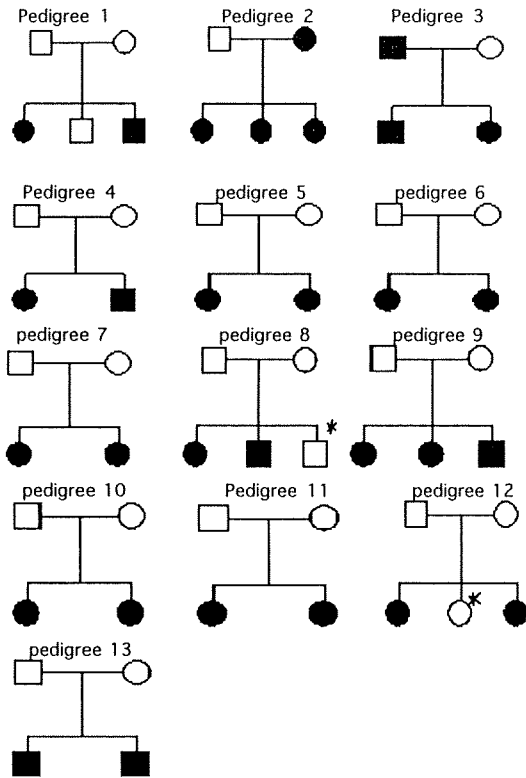
家系ごとに、個々のDNA多型のパターンと、発症者であるか否かの突き合わせを行い、連鎖ありと連鎖なしの場合に、マーカーと疾患遺伝子の間の様々な遺伝的距離に対し、それぞれの事象が観察される確率の比の常用対数を取り、LOD SCOREとして計算した。実際にLOD SCOREを算出するためには、コロンビア大学のJ. Ott博士より譲与されたLinkage analysisのプログラム(LINKAGE)を使用し、遺伝形式をAutosomal recessiveあるいは、Autosomal dominant (incomplete penetrance)と仮定し、Lod scoreの算出を行った(1)。また、家族性モヤモヤ病の遺伝形式が未だ不明である点を考え、最近開発された、遺伝形式によらないModel freeの解析法である、Gene-Hunter programme (2)を用いて解析を行った。

結果

第10、12、13染色体については、家系を増やすにつれ、Lod scoreが低下し、最終的には、これらのlocusでは、Lod scoreが1以下となった。しかし、前回最も高いLod scoreを出した第3染色体では、Autosomal recessive traitsと仮定した場合、最高4.705の有意に高いLod scoreが得られた(表1)。

また、Non-parametric法で検討すると、やはり、同様のLocusで、有意に高いNPL score (=3.46)が得られた(表2)。

Fig 1. Pedigrees of additional 13 moyamoya disease families



考察

家族発症のモヤモヤ病症例の報告が増加してきており、モヤモヤ病の発症のKeyとなる遺伝子異常を探ることが急務となってきた(3)。平成8,9年度の研究報告において、モヤモヤ3家系についての、全ての染色体につき検討を終了した。その結果、候補遺伝子座として、第3, 10, 12, 13が有力であるとの見通しを得ることができた(4,5)。昨年報告した、家族性モヤモヤ病を検討したなかで、最も高い Σ (Lod Score)を呈した遺伝子座の3P24.2-p26が、家系を13増やして解析した結果においても、Parametric法でも、またnon-parametric法でも、双方において有意なLod score, NPL scoreが得られた。従って、家族性モヤモヤ病の原因遺伝子座は、第3染色体、3p24.2-p26が有力であると考えられた(6)。骨格と心血管系の結合織の異常を呈するMarfan症候群の責任遺伝子座(3P24.2-p25)が、今回家族性モヤモヤ病を検討したなかで、最も高い Σ (Lod Score)を呈した遺伝子座の3P24.2-p26と奇しくも同じであった(7)のは極めて興味深い事実である。さらに、責任遺伝子座を絞り込み、責任遺伝子が同定されることを期待したい。

結論

家族性モヤモヤ病の原因遺伝子座の候補として、第3染色体、3p24.2-p26が有力であると考えられた。

Table 1: Two point lod scores between moyamoya disease locus and 3p markers.

Locus	distance* (cM)	families	θ						
			0.01	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	
D3S2387	0	16	-3.861703	0.325089	1.459219	1.528117	0.891455	0.259141	
D3S3050	7.7	16	4.705292	4.671007	4.063576	1.528117	1.194339	0.355979	
D3S1560	5.3	16	-1.162022	1.648959	1.863404	1.648888	0.94512	0.269781	
D3S1304	3.6	16	-4.191855	-0.35464	-0.286478	0.042153	0.139525	0.057313	
D3S2403	15	8	-4.274045	-1.713565	-0.820597	-0.200922	-0.033593	-0.001203	
D3S3038	12	8	-4.0410087	-1.510774	-0.634793	-0.074689	0.052344	0.017018	
D3S2432	12	8	-9.581857	-4.33339	-2.30448	-1.623162	-0.235512	-0.029427	
D3S2409	15	8	-4.134559	-1.62519	-0.78634	0.58642	-0.071958	-0.014876	
D3S1766	7	8	-6.70866	-3.31464	-1.816913	-0.704732	-0.246861	-0.053265	
D3S1285	13	8	-4.642996	-2.007613	-1.022168	-0.28926	-0.19204	-0.00669	
D3S2406	12	8	-8.332468	-3.736455	-2.540023	-0.60327	-0.15962	-0.02547	
D3S2459	18	8	-9.321409	-4.557408	-2.657616	-1.04988	-0.374853	-0.08217	
D3S3045	7	8	-9.088634	-3.337855	-2.46903	-1.60149	-0.32041	-0.06839	

*Distance between adjacent markers

参考文献

- (1) Terwilliger JD and Ott J. Handbook of human genetic linkage. The Jonews Hopkins University Press. Baltimore, 1994
- (2) Lander E, Kruglyak L. Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nature Genetics* 11:241-247, 1995
- (3) 吉本高志、池田秀敏、藤原 悟、清水宏明. ウィルス動脈輪閉塞症調査研究班、平成6年度研究報告書、pp56-59. 1995
- (4) 吉本高志、池田秀敏、志田直樹、佐々木徹、家族性モヤモヤ病原因遺伝子のポジショナルクローニング。-中間報告- ウィルス動脈輪閉塞症調査研究班、平成8年度研究報告書、pp39-42. 1997
- (5) 池田秀敏、佐々木徹、吉本高志、家族性モヤモヤ病原因遺伝子のポジショナルクローニング。 ウィルス動脈輪閉塞症調査研究班、平成9年度研究報告書、pp40-42. 1998
- (6) Ikeda H, Sasaki T, Yoshimoto T, Fukui M, Arinami T. Mapping of a familial moyamoya disease gene to chromosome 3p24.2-p26. *Am J Hum Genet.* 64: 533-537, 1999
- (7) Collod G, Babron MC, Jondeau G, Coulon M, Weissenbach J, Dubourg O, Bourdarias JP, Pellie CB, Junier C, Boileau C. A second locus for Marfan syndrome maps to chromosome 3p24.2-p25. *Nature Genetics* 8:264-268,1994

Table 2. NPL scores obtained by non-parametric linkage analysis at 3p24.2-p25 .

Locus	Distance*(cM)	NPL score	p-value	Information content
D3S2387	0.00	2.79470	0.002527	0.887136
	1.67	2.89951	0.001819	0.758705
	3.34	3.01797	0.001225	0.708900
	5.02	3.15065	0.000745	0.702517
D3S3050	6.69	3.29816	0.000459	0.739142
	8.36	3.46119	0.000238	0.850934
	9.48	3.35205	0.000360	0.752518
	10.60	3.24986	0.000527	0.717286
D3S1560	11.72	3.15447	0.000738	0.716760
	12.84	3.06571	0.001049	0.750260
	13.96	2.98345	0.001345	0.842207
	14.71	2.77165	0.002805	0.745647
D3S1304	15.46	2.57414	0.004968	0.701351
	16.21	2.39063	0.008511	0.686057
	16.95	2.22085	0.013161	0.699786
	17.70	2.06458	0.019914	0.765910

* distance from top of chromosome 3

ABSTRACT

Positional cloning of familial Moya-Moya disease

by

Takashi Yoshimoto, Hidetoshi Ikeda

From

Department of Neurosurgery, Tohoku University School of Medicine

To identify the location of any familial moyamoya disease gene, we performed a total genome search with genotypes of microsatellite polymorphic markers in 3 families. And we picked up 4 locus (on chromosome 3,10,12,13) suggestive of linkage. In this study, 13 more families were included to analyze the region of interest with 24 polymorphic DNA locus. DNAs extracted from 54 members of 13 families were used for PCR amplification and 6% polyacrylamide gel electrophoresis. Two-point lod scores were calculated, assuming an autosomal recessive or autosomal dominant (incomplete inheritance) model, non-parametric analysis used the GENEHUNTER program was also employed, because non-parametric analysis provides a robust significance of linkage irrespective of the mode of inheritance. The maximum two-point lod score of 4.71 was obtained at $\theta = 0.01$ with the marker D3S3050, and significant linkage at this marker was also obtained non-parametrically (NPL score = 3.46, information content = 0.851). Thus, a significant linkage was found between the disease and markers located at 3p24.2-26. This is the first genetic locus found to be involved in the molecular pathogenesis of familial moyamoya disease.

Key words; moyamoya disease, linkage analysis, chromosome 3, genetic analysis, NPL score

もやもや病の病因におけるTGF- β 1関与の可能性の検討

京都大学医学部脳神経外科

橋本信夫 北条雅人 宮本享

分担研究報告書

I 研究要旨

本研究の目的は、TGF- β 1が、もやもや病の病態・病因に関与する可能性を示すことである。浅側頭動脈片より培養した血管平滑筋細胞におけるTGF- β 1発現量、及び血清中のTGF- β 1濃度を測定した。結果として、いずれも、もやもや病患者で有意に上昇していた。このことから、TGF- β 1は、何らかの形で本疾患に関与すると考えられた。

II 研究目的

もやもや病は、頭蓋内主幹動脈の内膜肥厚による閉塞、及び豊富な血管新生を特徴とするが、その病因は未だ不明である。TGF- β 1は、細胞の増殖・分化の制御、細胞外マトリックスの誘導など、多彩な機能を持った増殖因子であり、様々な疾患への関与が報告されている(1)。血管病変への関与も多数報告されているが、もやもや病の病因への関与は知られていない(2)。TGF- β 1が、もやもや病の病態・病因に関与することを示すことが、本研究の目的である。

III 研究方法

バイパス手術時に得られた浅側頭動脈片より培養した血管平滑筋細胞について、bFGFおよびTGF- β 1の発現量をRT-PCR法にて検討した。また、血清中のTGF- β 1濃度をELISA法にて測定した。もやもや病患者6例、動脈硬化性疾患患者4例から、バイパス手術時に浅側頭動脈片を採取し、血管平滑筋細胞を primary culture した。この培養平滑筋細胞から total RNA を抽出し、RT-PCR法にてTGF- β 1 mRNA および bFGF mRNA を半定量した。なお、RT-PCR の反応条件を最適化し、GAPDH mRNA との比をとることにより定量性を確保した。さらに、もやもや病患者14例、健常者10例の血清を採取し、TGF- β 1濃度をELISA法で測定した。

IV 結果と考察

浅側頭動脈から培養した血管平滑筋細胞は、典型的な平滑筋細胞の形態を呈しており、もやもや病患者・動脈

硬化性疾患患者いずれにおいても違いは認められなかった。bFGFの発現量は、もやもや病患者において、動脈硬化性疾患患者に比べて有意に上昇していた($p < 0.05$)。

TGF- β 1の発現量も、もやもや病患者において、動脈硬化性疾患患者に比べて有意に上昇していた($p < 0.05$)。血清中のTGF- β 1濃度の平均値は、もやもや病患者で31ng/mL、健常人で11ng/mLであり、もやもや病患者において有意に上昇していた($p < 0.0005$)。

本研究では、手術時に得られる限られた量の血管片から解析のための十分な量を得るために培養という手段をとっており、このことによる影響は無視しがたい。しかしながら、以前、我々は、もやもや病患者の浅側頭動脈においてbFGFの発現が増加していることを免疫組織法によって示しており、本研究におけるbFGFに関する結果は、これに一致する(3,9)。結果の解釈には十分な注意を要するものの、培養という手段の妥当性を示唆するものと考えられた。

TGF- β 1は、細胞外マトリックスを誘導する働きが知られており、TGF- β 1を正常血管に強制発現させることによって、細胞外マトリックスの増生をともなった内・中膜肥厚を誘導し得たという報告がある(5,6)。本研究では、もやもや病患者の血管平滑筋細胞でTGF- β 1の発現が増加していることを示したが、このことは、本疾患に特徴的な線維性内膜肥厚にTGF- β 1が関与している可能性を示唆するものと考えられた。一方、TGF- β 1は、強力な angiogenic factor でもあり、ある種の腫瘍性病変では、その血管新生の程度と血清 TGF- β 1 濃度との相関が報告されている(4,7,8,10)。本研究では、もやもや病患者の血清TGF- β 1濃度の上昇を示したが、このことは、TGF- β 1が、本疾患の特徴的な側面である豊富な血管新生に何らかの関連があることを示唆するものと考えられた。

もやもや病の主病変ではない浅側頭動脈を今回の解析の対象としたという理由から、また、今回の結果が本疾患の原因の直接証明ではないという理由から、因果関係についてはなお慎重な検討を必要とする。しかし、もやもや病の内膜肥厚と血管新生という大きな二つの特徴を説明できるTGF- β 1が、本研究で、もやもや病の成因に関連していることを示唆できたものと考えられる。

V 結論

もやもや病患者では、浅側頭動脈からの培養血管平滑筋細胞におけるTGF- β 1発現量、および血清中のTGF- β 1濃度のいずれもが上昇していた。この結果は、もやもや病の特徴である平滑筋細胞の増生をともなった内膜肥厚と豊富な血管新生にTGF- β 1が関与する可能性を示唆するものと考えられる。

VI 参考文献

1. Folkman J, Klagsbrun M: Angiogenic factors. *Science* 235: 442-447, 1987
2. Grainger DJ, Kemp PR, Metcalfe JC, et al: The serum concentration of active transforming growth factor- β is severely depressed in advanced atherosclerosis. *Nat Med* 1: 74-79, 1995
3. Hoshimaru M, Takahashi JA, Kikuchi H, et al: Possible roles of basic fibroblast growth factor in the pathogenesis of moyamoya disease: an immunohistochemical study. *J Neurosurg* 75: 267-270, 1991
4. Ito N, Kawata S, Tamura S, et al: Positive correlation of plasma transforming growth factor- β 1 levels with tumor vascularity in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 89: 45-48, 1995
5. Lawrence R, Hartmann DJ, Sonenshein GE: Transforming growth factor β 1 stimulates type V collagen expression in bovine vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 269: 9603-9609, 1994
6. Nabel EG, Shum L, Pompili VJ, et al: Direct transfer of transforming growth factor β 1 gene into arteries stimulates fibrocellular hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 10759-10763, 1993
7. Shirai Y, Kawata S, Tamura S, et al: Plasma transforming growth factor- β 1 in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer* 73: 2275-2279, 1994
8. Stiles JD, Ostrow PT, Balos LL, et al: Correlation of endothelin-1 and transforming growth factor β 1 with malignancy and vascularity in human gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 56: 435-439, 1997
9. Suzui H, Hoshimaru M, Takahashi JA, et al: Immunohistochemical reactions for fibroblast growth factor receptor in arteries of patients with moyamoya disease. *Neurosurgery* 35: 20-25, 1994
10. Ueki N, Nakazato M, Ohkawa T, et al: Excessive production of transforming growth-

factor β 1 can play an important role in the development of tumorigenesis by its action for angiogenesis: validity of neutralizing antibodies to block tumor growth. *Biochem Biophys Acta* 1132: 189-196, 1992

モヤモヤ病患者由来培養血管平滑筋細胞の炎症性 cytokine に対する反応性異常

松島善治¹、青柳 傑¹、山本満里²、深井直実²、山本清高²

I. 緒言

私どもは、これまで浅側頭動脈より血管平滑筋細胞(SMC)を培養し、モヤモヤ病患者由来 SMC は血清特に PDGF に対し増殖反応性が低下していることを報告し、モヤモヤ病血管では内膜傷害の修復機構に異常があると考えてきた(1-3)。しかし、Reidy ら(4)は、内膜肥厚形成にさいし、PDGF による SMC への効果は、増殖刺激よりも遊走刺激効果が重要であることを示唆している。また、増殖因子だけでなく炎症性 cytokine も血管内膜肥厚に関与することが、最近示されている。こうした背景から、本研究では SMC の増殖および遊走反応性について、血管内膜肥厚に関与すると考えられる種々の増殖因子、cytokines について検討した(5)。

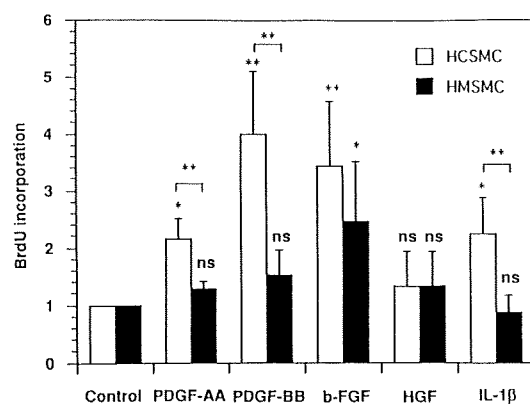
II. 対象・方法

モヤモヤ病患者由来培養血管平滑筋細胞 12 株、対照 SMC 6 株について比較検討を行った。SMC の増殖、遊走反応性について、PDGF-AA, PDGF-BB, basic FGF, EGF, HGF, TGF- β 1, IL-1 β ,

IL-6, TNF- α , INF- γ について検討した。増殖反応性は BrdU の取り込みによる DNA 合成刺激により、また遊走刺激は 96 well Micro Chemotaxis Assembly (Neuro Probe) を使用し、8mm の polycarbonate membrane を通して遊走してくる細胞数を count することにより評価した。培養上清中の NO を nitrate/nitrite assay kit を用いて定量した。

III. 結果および考察

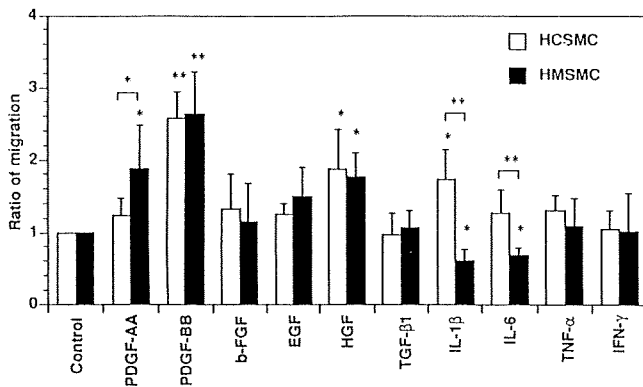
DNA 合成刺激はモヤモヤ SMC では、これまで報告した如くどの因子についても低反応性であり、対照 SMC との差は PDGF-AA, -BB, IL-1 β で有意であった (図 1)。



¹ 東京医科歯科大学 脳神経外科

² 東京都老人総合研究所 細胞生物部門

遊走刺激について検討すると、PDGF-BB、-AA ともにモヤモヤ SMC で有意に刺激効果が認められた。PDGF-BB では対照 SMC とほぼ同等であり、PDGF-AA では対照 SMC よりも遊走刺激効果は良好であった。一方、IL-1、IL-6 では有意の低反応性を示した。特に、IL-1 にたいする反応性は対照 SMC とは顕著な違いが認められた(図 2)。



対照、モヤモヤ SMC の各々の細胞株の IL-1 にたいする遊走効果をみると、対照 SMC では IL-1 はすべて遊走刺激効果をしめすのに対し、モヤモヤ SMC のすべての細胞株で抑制効果を示しており、モヤモヤ SMC に共通の特異的な反応性であることがわかる。

IL-1 は、多機能性の cytokine であり、細胞に作用し、PDGF-AA や TGF-β を分泌させる。また、細胞の NO 合成を刺激し、NO は SMC の増殖遊走に抑制的に作用する。そこで、SMC の IL-1 刺激による NO 合成を検討した。0.5% FBS 添加培養 SMC を IL-1 で 24 時間刺激したのち培養液中の NO をグリース法で測定した。対照、モヤモヤ SMC とも IL-1 により NO 産生は有意に刺激され、両者で差はなく、ともに NOS の inhibitor で抑制された。したがって、モヤモヤ SMC の特異的な反応性は NO とは関係ないと考えられた。

本研究では、これまで報告した PDGF に対する増殖低反応性に加え、IL-1b に対する反応性が対照 SMC と顕著に異なることが明らかとなった。IL-1b は増殖、遊走反応性とも対照 SMC では刺激性であるのに対し、モヤモヤ SMC では、いずれも抑制的に作用した。この結果は、モヤモヤ SMC に、IL-1b に関連する細胞内 signal、あるいは、下流の分子の異常が存在する可能性を示唆している。IL-1 の機能、また細胞内 signaling cascade は最近になりようやく明らかになってきた。現在、モヤモヤ SMC の IL-1 に対する特異的な反応性の詳細をこうした観点から検討中である。

図の説明

図 1. BrdU incorporation into cellular DNA in moyamoya and control SMC. Cells were incubated in MEM containing 0.5% FBS, test mitogens (10ng/ml growth factors, except for 50 ng/ml HGF, and 500 U/ml IL-1), and BrdU for 48 hours. The results are given as multiplications of the labeling indices of cultures without test mitogens. Columns show the means and SDs for moyamoya and control SMC. * P<0.02, ** P<0.004 compared with cells without test mitogens and with cells from control subjects by unpaired t test.

図 2. Migration of moyamoya and control SMC. Migrating SMC were quantified by visual determination in five or more randomly selected fields per membrane. The results are given as multiplications of the number of migrating cells in cultures without test mitogens. Test mitogens were 10 ng/ml growth factors except for 50 ng/ml HGF and 500 U/ml cytokines. Columns show the means

and SDs for moyamoya and control SMC. * P<0.04, ** P<0.004 compared with cells without test mitogens and with cells from control subjects by unpaired t test.

文献

- 1) Aoyagi M, Fukai N, Sakamoto N, Shinkai T, Matsushima Y, Yamamoto M, Yamamoto K. Altered cellular response to serum mitogens, including platelet - derived growth factor, in cultured smooth muscle cells derived from arteries of patients with moyamoya disease. *J Cell Physiol* 147:191-198, 1991
- 2) Aoyagi M, Fukai N, Matsushima Y, Yamamoto M, Yamamoto K. Kinetics of 125I-PDGF binding and down-regulation of PDGF receptor in arterial smooth muscle cells derived from patients with moyamoya disease. *J Cell Physiol* 154:281-288, 1993

- 3) Fukai N, Aoyagi M, Yamamoto M, Sakamoto H, Ogami K, Matsushima Y, Yamamoto K. Human arterial smooth muscle cell strains derived from patients with moyamoya disease: changes in biological characteristics and proliferative response during cellular aging in vitro. *Mech Aging Dev* 75:21-33, 1994

- 4) Reidy MA, Fingerle J, Lindner V. Factors controlling the development of arterial lesions after injury. *Circulation* 86:III43-46, 1992

- 5) Yamamoto M, Aoyagi M, Fukai N, Matsushima Y, Yamamoto K. Differences in cellular responses to mitogens in arterial smooth muscle cells derived from patients with moyamoya disease. *Stroke* 29:1188-1193, 1998

【Abstract】

Smooth muscle cell proliferation, elastin formation, and tropoelastin transcripts during the development of intimal thickening in rabbit carotid arteries after endothelial denudation.

Yoshiharu Matsushima, Masaru Aoyagi, Mari Yamamoto, Naomi Fukai, Kiyotaka Yamamoto

Department of Neurosurgery, School of Medicine, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan (Y. M., M. A.)

Department of Cell Biology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakae-cho, Itabashi-ku, Tokyo 173, Japan (M. A., M. Y., N. F., K. Y.)

Key words: Muscle, smooth; Arterial wall, growth factor, cytokine, moyamoya disease

We examined the chemotactic and proliferative activities of growth factors and inflammatory cytokines on arterial smooth muscle cells (SMC) derived from moyamoya patients and compared them with those from control subjects. We used 12 SMC strains from moyamoya and 8 from control subjects. SMC migration was examined in a microchemotaxis chamber. DNA synthesis was measured by an immunoperoxidase technique. Platelet-derived growth factor (PDGF)-BB markedly stimulated cell migration and DNA synthesis in control SMC. PDGF-AA stimulated only DNA synthesis in control SMC. In moyamoya SMC, PDGF-AA and PDGF-BB stimulated cell migration but not DNA synthesis. Basic fibroblast growth factor had little migratory activity but stimulated DNA synthesis in moyamoya and control SMC. Conversely, hepatocyte growth factor stimulated cell migration but not DNA synthesis in moyamoya and control SMC. In contrast, Interleukin-1 β (IL-1 β) significantly stimulated the migration and DNA synthesis of control SMC, while it inhibited moyamoya SMC migration. The levels of IL-1 β -induced nitric oxide production did not differ between moyamoya and control SMC, suggesting that IL-1 β inhibits the migration of moyamoya SMC through a nitric oxide-independent pathway. The differences in responses to PDGF and IL-1 in moyamoya SMC are involved in the mechanism by which intimal thickening develops in moyamoya disease.

特発性ウィリス動脈輪閉塞症における thrombomodulin 遺伝子異常の検索

池田栄二¹⁾、加藤真吾²⁾、吉田一成³⁾

はじめに

特発性ウィリス動脈輪閉塞症（以下、本症）は両側内頸動脈終末部における閉塞性血管病変と脳底部を中心とした異常血管網の形成を特徴とするが、その病因はいまだ不明である。本症剖検例を用いた検索の結果、本症内頸動脈終末部の閉塞性血管病変は病理形態学的には血栓の器質化像を呈し、本症における血栓形成傾向の存在が強く示唆されている。我々は以前、血管内皮細胞の細胞膜上に発現する抗血栓性因子である thrombomodulin の発現異常が本症の血管病変形成に関与している可能性を考え、本症内頸動脈における thrombomodulin の発現につき免疫組織学的検索を行った。その結果、免疫染色レベルでは、本症内頸動脈における thrombomodulin 蛋白の発現パターンに対照例に比べて異常は認められなかったことを報告した [1]。その後、thrombomodulin 遺伝子に関して、血栓塞栓性疾患と関連するいくつかの point mutation が報告された (Figure 1) [2,3]。これらの point mutation は missense mutation であり、それに起因する蛋白の異常は我々が免疫染色に用いたポリクローナル抗体では検出できない可能性が高い。そこで今回我々は、本症においても同様な異常が存在する可能性を考え、本症患者の thrombomodulin 遺伝子の解析を行った。

症例および方法

症例

本症患者 6 例を検索対象 (Table 1) とした。年齢は 16 歳～50 歳 (平均 29 歳)、男性 1 例・女性 5 例であった。うち 3 例に家族内発症を認めた。即ち、症例 2 は妹に発症を認めた例であり、症例 5・6 は母娘発症例である。対照として健常者 2 例についても検索を行った。

Table 1: 特発性ウィリス動脈輪閉塞症症例.

症例	年齢(歳)	性別	家族歴
1	29	F	
2	17	F	+ (妹)
3	50	F	
4	16	M	
5	47	F	+ (娘)
6	17	F	+ (母)

* 母娘発症例

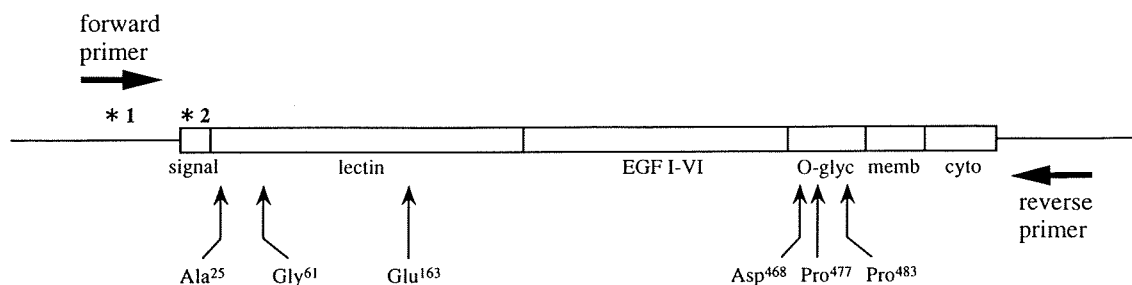


Figure 1: Thrombomodulin 遺伝子の構造。矢印は PCR プライマー、上段の *1 および *2 はシークエンスプライマーの認識部位を示す。下段には、これまで報告されている点変異挿入部位を示す。

¹⁾慶應義塾大学医学部病理学教室、²⁾微生物学教室、³⁾脳神経外科学教室

DNA 抽出および polymerase chain reaction (PCR)

採取した血液より、QIAamp Blood Kit (QIAGEN) を用い genomic DNA を抽出後、polymerase chain reaction (PCR) にて thrombomodulin 遺伝子の coding region 全長 (intron を含まない) を増幅した。PCR には、forward primer として 5'-TGG CCG ATC CGC ATG TCA GAG G-3' (nucleotides 539-560, GenBank No. D00210)、reverse primer として 5'-CAA AGC TGG GGG TGA GGA GGC A-3' (nt. 2508-2487) を用いた (Figure 1)。PCR には Takara LA PCR Kit を使用し、反応条件は 94°C 1分の後、94°C 30秒・60°C 30秒・72°C 2分を 30 cycles とした。

Sequence analysis

PCR 産物をアガロースゲル電気泳動後、thrombomodulin 遺伝子断片を抽出した。抽出した DNA 断片に対し、蛍光プライマーを用いた dideoxy 法にて反応を行い Pharmacia LKB A.L.F. DNA Sequencer II (Pharmacia Biotech) を使用し塩基配列の解析を行った。用いた蛍光プライマーの配列は、5'-TGG CCG ATC CGC ATG TCA GAG G-3' (nt. 539-560, PCR forward primer と同配列; *1 in Figure 1) および 5'-ACA TGC TTG GGG TCC TGG TCC TT-3' (nt. 717-739; *2 in Figure 1) とした。

結果

PCR 反応により thrombomodulin 遺伝子断片が検出された (Figure 2)。本症患者検体および対照健常者検体から増幅された遺伝子断片サイズはともに 2.0 kb (Figure 2) であり、アガロースゲル電気泳動上では長さの異常は検出されなかった。これらの DNA 断片をアガロースゲルより抽出し塩基配列を決定した。今回は、5' 側にシークエンスプライマーを設定し (*1, *2 in Figure 1) 翻訳開始コドンを含めた塩基配列の解析を行い、Ala²⁵ および Gly⁶¹

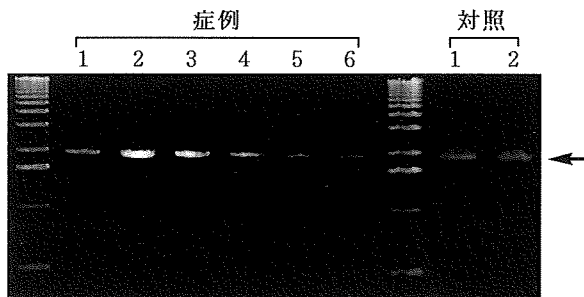


Figure 2: PCR により増幅された thrombomodulin 遺伝子断片. ウィリス動脈輪閉塞症・対照健常者間では増幅 DNA 断片サイズ (2.0 kb) に有意な差は認められなかった。

コドンにおける異常の有無を中心に検索を行った。塩基配列解析結果に関しては、得られた wave のうち minor wave についても heterozygosity の可能性を含め検討した。Figure 3 に解析結果を示す。血栓塞栓疾患においてこれまで報告されている Ala²⁵ および Gly⁶¹ コドンの異常は認められなかった。今回検索を行った 6 例中 1 例 (症例 5) では Glu¹⁶³ コドンまで塩基配列解析を行えたが、その症例においては Glu¹⁶³ コドンにも異常は検出されなかった (data not shown)。

nt.756-757 (GenBank No. D00210) に CC→C の変化がみられ本症における欠失変異が疑われたが、健常者 2 例の解析からも同様の結果が得られた。本症に特異的な変化ではないが、我々の解析結果は、すでに報告されている塩基配列との間に frame-shift を生じることになる。この点に関し、今後さらに検討を重ねる必要があると考えられる。

考察

特発性ウィリス動脈輪閉塞症の血管病変に対する病理組織学的検索結果は、本症の病因として血栓形成傾向が関与することを強く示唆する。今回我々は、血管内皮細胞の細胞膜上に存在する抗血栓性因子である thrombomodulin の発現異常が本症血管病変成立に関与している可能を考え、本症患者における thrombomodulin 遺伝子異常の有無につき検索を加えた。これまで、血栓塞栓性疾患との関連で、thrombomodulin 遺伝子におけるいくつかの point mutation が報告されている。我々は、それらの point mutation に焦点をあて、ウィリス動脈輪

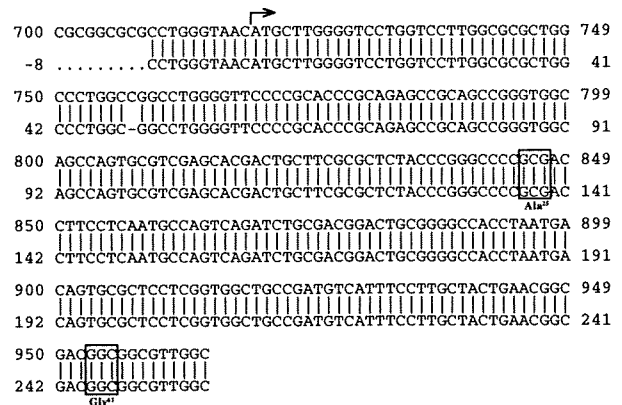


Figure 3: Thrombomodulin 遺伝子配列 (GenBank No. D00210; 上段) およびウィリス動脈輪閉塞症患者 (症例 5) 遺伝子配列解析結果 (下段)。Ala²⁵コドン, Gly⁶¹コドンの変異は認められなかった。矢印は翻訳開始部位を示す。

閉塞症患者6例のthrombomodulin遺伝子につき遺伝子異常の有無を検索した。今回の検索では、6例ともにAla²⁵およびGly⁶¹コドンの解析を終えたが、これらコドンに異常は認められなかった。また、1例ではGlu¹⁶³コドン周辺まで塩基配列を検索し得たが、Glu¹⁶³コドンにも異常はみられなかった。上記コドン以外の塩基配列に関しても、今回検索し得た範囲では、健常者と比較し本症に特異的な異常は検出されなかった。今後、Glu¹⁶³コドンに関し残る5例について検索を行うとともに、さらに下流に存在するAsp⁴⁶⁸, Pro⁴⁷⁷, Pro⁴⁸³コドン(Figure 1)の異常の有無に関して解析をすすめる予定である。

文献

- [1] Ikeda E, Maruyama I, Hosoda Y: Expression of thrombomodulin in patients with spontaneous occlusion of the circle of Willis. *Stroke* 24:657-660, 1993.
- [2] Ireland H, Kyriakoulis K, Kunz G, Lane DA: Directed search for thrombomodulin gene mutations. *Haemostasis* 26:227-232, 1996.
- [3] Öhlin A-K, Norlund L, Marlar RA: Thrombomodulin gene variations and thromboembolic disease. *Thromb Haemost* 78: 396-400, 1997.

Analysis of the thrombomodulin gene in patients with spontaneous occlusion of the circle of Willis

by

Eiji Ikeda¹⁾, Shingo Kato²⁾, Kazunari Yoshida³⁾

from

Department of ¹⁾Pathology, ²⁾Microbiology and ³⁾Neurosurgery,
Keio University School of Medicine

Spontaneous occlusion of the circle of Willis (SOCW) is characterized by obstructive vascular lesions around the terminal portions of internal carotid arteries and abnormal vascular networks at the base of brain. The obstructive vascular lesion in SOCW is caused by eccentric intimal fibrous thickening which is histopathologically consistent to the organized mural thrombus. A series of evidence suggests that patients with SOCW have a systemic tendency to cause thrombi. Thrombomodulin is a thrombin receptor on endothelial cells which acts as an inhibitor of intravascular coagulation, and is thought to play important roles in thrombogenesis in vivo. Previously, we performed an immunohistochemical study on the expression of thrombomodulin in patients with SOCW in order to see if the abnormalities of the expression of thrombomodulin contribute to the pathogenesis of SOCW. However, we did not detect significant difference in the thrombomodulin expression between patients with SOCW and control patients. Subsequently, several mutations of the thrombomodulin gene which are related to thromboembolic disorders have been reported. These reported mutations are missense point mutations and may not have been detected by the polyclonal antibody we used in our previous study. Therefore, in the present study, we analysed directly the thrombomodulin gene in patients with SOCW, with focus on the codons in which mutations were reported. The thrombomodulin genes were amplified from the genomic DNA from six patients with SOCW as well as two control healthy donors. Until now, the nucleotide sequences from the translation initiation codon to the two candidate codons for the point mutation, Ala²⁵ and Gly⁶¹, were determined in all the samples including two control samples. No mutations were observed at the Ala²⁵ and Gly⁶¹ codons. In one sample from a patient with SOCW, the sequence analysis covered Glu¹⁶³ codon which is the third candidate codon for mutation, and the Glu¹⁶³ codon was not mutated in this case. Other than the above codons, no specific mutations for SOCW were detected. Further analysis of another candidate codons for mutations is now under way.

翼口蓋神経節由来 NOS 含有副交感神経慢性両側切断の

局所脳血流に及ぼす影響

福内靖男, 田中耕太郎, 野川 茂, 永田栄一郎, 鈴木重明, 傳法倫久

はじめに

ウィリス動脈輪閉塞症の一部に家族歴が認められ、その発症機序として遺伝的素因が注目されているが、本症に特徴的な内頸動脈終末部からウィリス動脈輪かけて限局する血管閉塞を説明するためには、この部分における解剖学的、あるいは生理学的なアプローチが重要であると考えられる。

同部に特徴的な解剖学的構造のひとつとして、これまで内頸動脈を取り巻く上頸神経節(SCG)からの交感神経線維が注目されてきた。以前より本症患者には、扁桃腺炎、副鼻腔炎、中耳炎などの頭頸部の反復する炎症性疾患を既往に持つ者が多いことから、頸部臓器の炎症により交感神経が刺激され、神経分布の密な部分の血管変化が惹起される可能性が指摘されている¹⁾。しかし、これまでこの理論に基づいてSCG切除術、頸動脈周囲交感神経切除術などが行なわれてきたが²⁾、その効果は必ずしも十分とはいえなかった。

一方、近年 Suzuki ら^{3, 4, 5)}により、脳血管には交感神経のみならず、血管拡張性に働く副交感神経系が存在することが明らかとなった。ラットにおいては、この神経線維の主な起源は翼口蓋神経節(SPG)であり、Fig.1 に示すごとく三叉神経節(TG)由来鼻毛様体神経と共に篩骨孔(EF)を通り頭蓋内に入り、内篩骨動脈(IEA)をたどり同側^{6, 7)}あるいは両側^{8, 9)}のウィリス動脈輪前半部や前大脳動脈(ACA)、中大脳動脈(MCA)に分布することが判明している。また最近、Nozaki ら⁶⁾、Suzuki ら⁷⁾により同神経線維は一酸化窒素合成酵素(NOS)を含有することが明らかとなり、その電気刺激時の脳血管拡張作用にはNOが関与す

ることも報告されている¹⁰⁾。

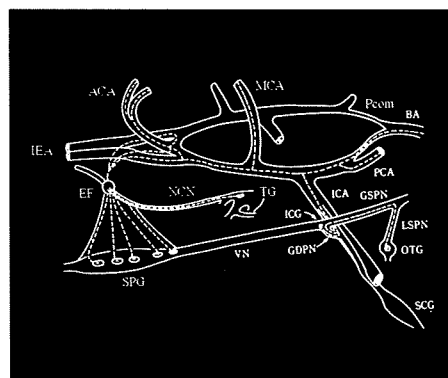


Fig. 1 Origins and distribution of post-ganglionic perivascular nerve fibers in the rat brain. Parasympathetic nerve from the sphenopalatine ganglion and the nasociliary nerve from the trigeminal ganglion innervate large cerebral arteries in the anterior part of the circle of Willis through the ethmoidal foramen.

Abbreviation: ACA, anterior cerebral artery; BA, basilar artery; EF, ethmoidal foramen; GDPN: greater deep petrosal nerve, GSPN: greater superficial petrosal nerve, ICA: internal carotid artery, ICG: internal carotid ganglion, IEA: internal ethmoidal artery, LSPN: lesser superficial petrosal nerve, MCA: middle cerebral artery, ICA: posterior cerebral artery, Pcom: posterior communicating artery. SCG: superior cervical ganglion, SPG: sphenopalatine ganglion, TG: trigeminal ganglion, VN: vidian nerve.

慶応義塾大学神経内科

Key Words: ウィリス動脈輪閉塞症, 副交感神経, 翼口蓋神経節, 一酸化窒素合成酵素, 局所脳血流

ヒトではこれら頭蓋外神経節由来血管拡張神経の局在は明らかにされていないが、SPG などからの副交感神経線維が、SCG からの交感神経と同様に内頸動脈(ICA)およびウィリス動脈輪に分布し、本疾患の病態に関係している可能性も考えられる。そこで本研究では、本疾患の発症における同神経線維の関与を調べるため、幼若ラットにおいて SPG および TG 由来 NOS 含有血管周囲神経を両側で切断し、慢性期にウィリス動脈輪血管径および局所脳血流に及ぼす影響を検討した。

対象と方法

実験には3週齢の雄 Sprague-Dawley ラット 32 匹(体重 40-70 g)を用いた。Equithesin (0.3 ml/100 g 体重)腹腔内投与麻醉下に、lidocaine 局所麻酔を施した眼窩上後部において切開を加え、TG 由来鼻毛様体神経並びに膜状の SPG 由来副交感神経を内側壁 EF 部において露出した。切断群においては、実体顕微鏡下にこれらを EF のすぐ外側において両側で切断した。一方、Sham 手術群では各神経を露出するに留めた。術後閉眼可能となるよう、細かく丁寧に両側で切開部を縫合し、覚醒後、無菌ケージに戻した。以後、ラットを無菌ケージ内で飼育し、3ヶ月後(体重 460-510 g)に以下の実験に供した。

1) NADPH diaphorase 染色

Pentobarbital 腹腔内投与麻醉下に 4% paraformaldehyde で還流固定を行い、取り出した脳よりウィリス動脈輪を取り外してプレパラート上にマウントした。これを Suzuki ら⁷⁾の方法に基づいて NADPH diaphorase 染色を行い、頭蓋外神経節由来 NOS 含有血管周囲神経の有無を検討した (Sham 群, 切断群, 各 n=3)。さらに、脳実質切片において、実質内 NOS 陽性神経細胞、血管内皮の NADPH diaphorase の染色性も比較検討した。また、ウィリス動脈輪各部位の血管断面の観察も行った。

2) ウィリス動脈輪血管径測定

また、ウィリス動脈輪の狭窄の有無を検討するため、Sham 群(n=7)および切断群(n=6)の別の動物において、Berry ら(11)の方法に従い還流固定した後、india ink 溶液を注入し、ウィリス動脈輪が付着したまま脳を取り出した。その後、脳底部の外観を CCD ビデオカメラ(CCD72, Dage-MTI, Michigan city, IN, USA)および画像解析ソフト(Inquiry Ver 3.03,

Loats Associates, Inc., Westminster, MD, USA)を用いてデジタル画像としてコンピューター (Dell OptiPlex Gxa) に取り込み、モニター上で同時に取り込んだ微細目盛を用いてウィリス動脈輪各構成血管の血管径を Fig. 2 の位置で測定した。

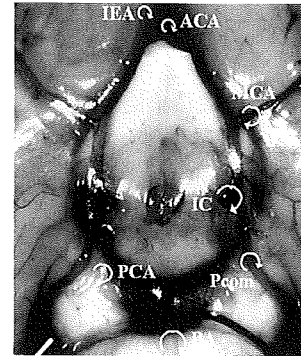


Fig. 2 Digitized image of the bottom side of the rat brain perfused with india ink, which clearly indicates the circle of Willis. Arrows show the points where diameters of the major cerebral arteries were measured.

3) 局所脳血流量測定

さらに細い動脈血管の変化を追求するため、ヨードアンチピリン法(12)により脳内各部位における局所脳血流量(LCBF)を測定した。すなわち、Sham 群(n=6)および切断群(n=7)の動物において、pentobarbital (25 mg/kg 体重)腹腔内投与麻醉下に、大腿動静脈にポリエチレン・カテーテルを挿入した。4時間後、覚醒状態で全身動脈血圧(ABP)および動脈血液ガスなどの生理学的パラメータを測定後、大腿静脈より iodo-N-methyl-[¹⁴C]antipyrine (40 μCi, NEN/DuPont, Wilmington, DE, USA)を約 50 秒間かけて注入した。この間、動脈血 20 μl を経時的に 11 回採取した。注入終了後、ラットを断頭し、速やかに脳を取り出し凍結した。採取した動脈血サンプルは濾紙に吸着後、液体シンチレーション・カウンター(LS 9800, Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA)で放射活性を測定した。また、凍結脳はクリオスタット(Cryocut 1800, Leica Instruments, Nussloch, Germany)を用いて厚さ 20 μm のスライスとし、X 線フィルム(SB-5, Eastman Kodak, Rochester, NY, USA)に7日間感光した。得られたオ

オートラジオグラムを画像解析ソフト(Inquiry Ver 3.03, Loats Associates, Inc., Westminster, MD, USA)を用いて解析し、平均LCBFを計算した。

結果

1) NADPH diaphorase 染色

Fig. 3 に Sham 群(A)および切断群(B)の IEA の NADPH diaphorase 染色を示す。Sham 群では縦走する太いNADPH diaphorase 陽性神経線維が認められた。このNADPH diaphorase 陽性神経線維は、前大脳動脈(ACA)、中大脳動脈(MCA)、ICA、また一部の後大脳動脈(PCA)に認められたが、脳底動脈(BA)ではほとんど認められなかった。これに対し、切断群では、両側IEA およびその他のウィリス動脈輪構成血管において、NADPH diaphorase 陽性神経線維は認められず、除神経が確実に行われ、かつ3ヶ月以内に再生しなかったものと考えられた。一方、実質内神経細胞(Fig. 3C)、血管(Fig. 3D)のNADPH diaphorase の染色性には両群で違いを認めなかった。また、ウィリス動脈輪各部位の血管断面の観察では、内膜の厚さにも差異は認められず、また切断群において血栓形成傾向なども認めなかった。

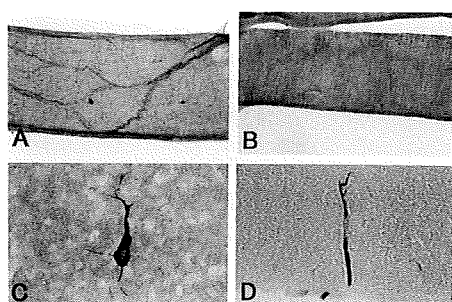


Fig. 3 NADPH diaphorase-positive perivascular nerve fibers on the IEA observed in the Sham group (A) were absent in the Transect. group (B). In the Transect. group, NADPH diaphorase activity was maintained in the neurons (C) and the vessels (D) in the brain parenchyma.

2) ウィリス動脈輪血管径

Sham 群および切断群のウィリス動脈輪の外観

(Fig. 4) および構成血管の平均血管径 (Fig. 5) を示す。ウィリス動脈輪各部位において、血管径に明らかな差異は認められなかった(ICA: Sham 群 $3.4 \pm 0.5 \times 10^2$, 切断群 $3.4 \pm 0.5 \times 10^2$, IEA: Sham 群 $1.8 \pm 0.3 \times 10^2$, 切断群 $1.5 \pm 0.3 \times 10^2 \mu\text{m}$)。また、切断群においてモヤモヤ血管などの異常血管は認められなかった。

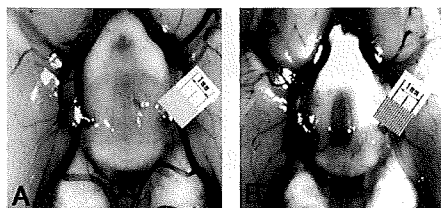


Fig. 4 Digitized images of the circle of Willis in the Sham group (A) and the Transect. group (B).

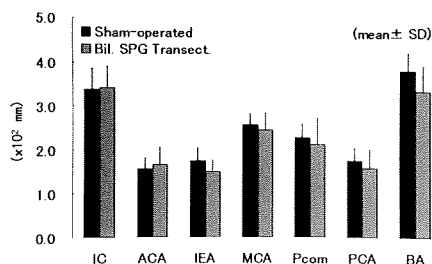


Fig. 5 Diameter of the major cerebral vessels comprising the circle of Willis in the Sham group and the Transect. group.

3) 局所脳血流量

さらに、Sham 群および切断群の代表的LCBF オートラジオグラム(Fig. 6)および平均LCBF(Fig. 7)を示す。両群で脳内各部位において明らかな違いを認めなかった(側頭葉皮質: Sham 群 123.41 ± 13.04 , 切断群 120.16 ± 14.82 , 後頭葉皮質: Sham 群 123.41 ± 13.41 , 切断群 $120.16 \pm 14.82 \text{ ml}/100 \text{ g}/\text{min}$)。従

って、細い動脈のレベルにおいても両群の脳内血管径に差が認められないことが示唆された。

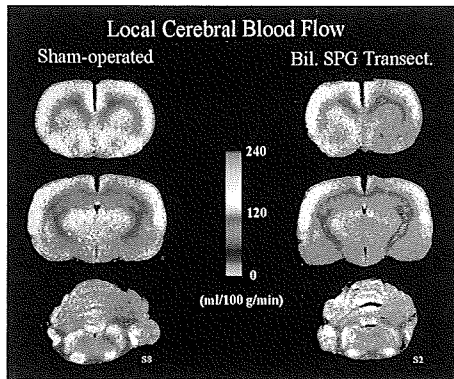


Fig. 6 Representative LCBF autoradograms of the Sham group (left) and the Transect. group (right).

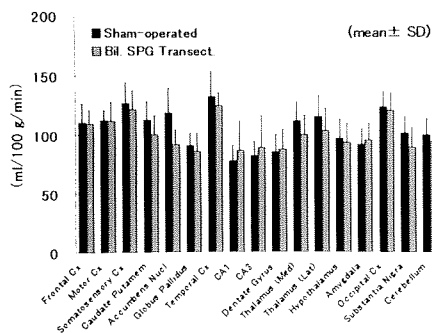


Fig. 7 Mean values of LCBF in the various brain regions in the Sham group and the Transect. group.

考察

頭蓋外神経節由来 NOS 含有血管拡張神経の脳循環調節に関する機能については、虚血時の脳血流維持^{13, 14)}や脱血時の autoregulation¹⁴⁾など、脳血流低下時の防御的な反応に関与していることがこれまで報告されてきた。また、くも膜下出血時の攣縮血管では NOS 染色性が低下しており、vasospasm の病態への関与も示唆されている¹⁵⁾。しかし、同神経は安静時における脳血流維持にはほとんど関与しておらず¹⁶⁾、それにはむしろ血管内皮細胞由来の NO が中心的な役割を担っている可能性が高い^{17, 18)}。ところで、

血管内皮由来 NO には血小板凝集を抑え血栓形成を防いだり、血管平滑筋の増殖を抑制する効果もあり、慢性的に NO 合成阻害薬を投与すると、血圧とは無関係に冠微小血管のリモデリング（中膜平滑筋肥厚、血管周囲線維化）が進行するという¹⁹⁾。しかし、これまで NOS 含有血管周囲神経を3ヶ月以上の長期にわたり除神経し、脳血管形態に対する影響を検討した報告はない。同神経の分布領域はウィリス動脈輪閉塞症で血管狭窄や血栓形成が認められる血管とよく一致することから、本症の発症機序に関与する可能性を考え本研究を行った。

ところが、今回の検討では、3ヶ月と限られた観察期間ではあるものの、ラットでは頭蓋外神経節由来 NOS 含有血管周囲神経両側切断のみではウィリス動脈輪血管径に変化を来さず、異常血管も出現も認められなかった。また、内膜の線維性肥厚、血栓形成などの内腔の変化も認められなかった。さらに、太い動脈のみならず微細血管径も反映すると考えられる LCBF にも変化を認めなかった。これらの結果よりは、頭蓋外神経節由来 NOS 含有血管周囲神経は、本症の発症機序そのものにはあまり関与していない可能性が示唆された。

最近、本疾患の髄液中には NO 代謝産物が多いことが報告された²⁰⁾。この NO の起源が血管内皮か神経細胞かは不明であるが、本疾患では脳虚血に伴って防御的に NO が産生されている可能性があり、今後の検討が待たれる。

結語

頭蓋外神経節由来 NOS 含有副交感神経の両側慢性切断は、ウィリス動脈輪を含む脳血管の安静時血管径には影響を及ぼさなかった。従って、同神経は本症発症後の代償機構としては機能している可能性はあるものの、発症機序に直接には関与していないことが示唆された。

文献

- 1) 小沼武英, 笠井直人, 米満勤: 病因. 111-122. (鈴木二郎編: Moyamoya 病) 医学書院, 東京, 1983.
- 2) 蕎麦田英二: 虚血性脳血管障害における頸部交感神経切除術の効果. 矩形波電磁血流計による血流量と臨床経過の観察. 脳外. 8: 739-748, 1980.

- 3) Suzuki N, Hardebo JE, Karhström J, Owman CH: Selective electrical stimulation of postganglionic cerebrovascular parasympathetic nerve fibers originating from the sphenopalatine ganglion enhances cortical blood flow in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 10: 383-91, 1990.
- 4) Suzuki N, Gotoh F, Koto A: Evidence for in vivo cerebrovascular neurogenic vasodilatation in the rat. *Clin Auton Res.* 1: 23-26, 1991.
- 5) 鈴木則宏: 脳血管の神経支配. *脳神経.* 45: 6, 1993.
- 6) Nozaki K, Moskowitz MA, Maynard KI, Koketsu N, Dawson TM, Brecht DS, Snyder SH: Possible origins and distribution of immunoreactive nitric oxide synthase-containing nerve fibers in cerebral arteries. *J Cereb Blood Flow Metab.* 13: 70-79, 1993.
- 7) Suzuki N, Fukuuchi Y, Koto A, Naganuma Y, Isozumi K, Matsuoka S, Gotoh J, Shimizu T: Cerebro-vascular NADPH-diaphorase-containing nerve fibers in the rat. *Neurosci Lett.* 151: 1-3, 1993.
- 8) Hara H, Zhang QJ, Kuroyanagi T, Kobayashi S: Parasympathetic cerebrovascular innervation: an antegrade tracing from the sphenopalatine ganglion in the rat. *Neurosurgery.* 32: 822-827, 1993.
- 9) Minami Y, Kimura H, Aimi Y, Vincent SR: Projection of nitric oxide synthase-containing fibers from the sphenopalatine ganglion to cerebral arteries in the rat. *Neurosci.* 60: 745-759, 1994.
- 10) Morita-Tsuzuki Y, Hardebo JK, Bouskela E: Inhibition of nitric oxide synthase attenuates the cerebral blood flow response to stimulation of postganglionic parasympathetic nerves in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 13: 993-997, 1993.
- 11) Berry K, Wisniewski HM, Savarzew L, Baez S: On the relationship of brain vasculature to production of neurological deficit and morphological change following acute unilateral common carotid artery ligation in gerbils. *J Neurol Sci.* 25: 75-92, 1975.
- 12) Sakurada O, Kennedy C, Jehle J, Brown JD, Carbin GL, Sokoloff L: Measurement of local cerebral blood flow with iodo[¹⁴C]antipyrine. *Am J Physiol.* 234: H59-H66, 1978.
- 13) Kano M, Moskowitz MA, Yokota M: Parasympathetic denervation of rat pial vessels significantly increases infarction volume following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab.* 11: 628-637, 1991.
- 14) Koketsu N, Moskowitz MA, Kontos HA, Yokota M, Shimizu T: Chronic parasympathetic sectioning decreases regional cerebral blood flow during hemorrhagic hypotension and increases infarct size after middle cerebral artery occlusion in spontaneously hypertensive rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 12: 613-20, 1992.
- 15) Pluta RM, Thompson BG, Dawson TM, Snyder SH, Broock RJ, Oldfield EH: Loss of nitric oxide synthase immunoreactivity in cerebral vasospasm. *J Neurosurg.* 84: 648-654, 1996.
- 16) Tanaka K, Fukuuchi Y, Shirai T, Nogawa S, Nozaki H, Nagata E, Kondo T, Suzuki N, Shimizu T: Chronic transection of post-ganglionic parasympathetic and nasociliary nerves does not affect local cerebral blood flow in the rat. *J Auton Nerv Syst.* 53: 95-102, 1995.
- 17) Tanaka K, Gotoh F, Gomi S, Takashima S, Mihara B, Shirai T, Nogawa S, Nagata E: Inhibition of nitric oxide synthesis induces a significant reduction in local cerebral blood flow in the rat. *Neurosci Lett.* 127: 129-132, 1991.
- 18) Nogawa S: Effects of intravenous arginine administration on cerebral circulation in the rat. *Keio J Med.* 44: 19-29, 1995.
- 19) Numaguchi K, Egashira K, Takemoto M, Kadokami T, Shimokawa H, Sueishi K, Takeshita A: Chronic inhibition of nitric oxide

synthesis causes coronary microvascular remodeling in rats. Hypertension. 26: 957-962, 1995.

20) 野田篤, 鈴木善男, 大本安一, 渡辺和

彦, 原政人, 高安正和, 吉田純: モヤモヤ病患者の髄液中一酸化窒素 (NO) 及びサイトカインの濃度. 脳卒中. 20: 207, 1998.

ABSTRACT

Effect of long-term denervation of NOS-containing parasympathetic nerve fibers from the sphenopalatine ganglion on local cerebral blood flow in the rat

Yasuo Fukuuchi, Kortaro Tanaka, Shigeru Nogawa, Eiichiro Nagata, Shigeaki Suzuki, Tomohisa Denbo

Department of Neurology, Keio University, School of Medicine

Nitric oxide synthase (NOS)-containing parasympathetic nerve fibers from the sphenopalatine ganglion (SPG) and nasociliary nerve from trigeminal ganglion (TG) innervate large cerebral arteries in the anterior part of the circle of Willis through the ethmoidal foramen (EF) in the rat. Because NO maintains blood circulation by dilating vessels and preventing thrombus formation and proliferation of the blood vessel walls, we hypothesized that chronic denervation of the NOS-containing perivascular nerve fibers might cause occlusion of the circle of Willis and a decrease in local cerebral blood flow (LCBF). Thirty two male Sprague-Dawley rats were utilized. In the Transect. group (n=16), bilateral perivascular nerve fibers from SPG and TG were transected just outside of EF. In the Sham group (n=16), these nerve fibers were only exposed. Three months after the surgery, animals were subjected to following experiments: 1) NADPH-diaphorase staining (n=3 each group) revealed absence of NOS-containing perivascular nerve fibers in the anterior portion of the circle of Willis in the Transect. group. 2) No significant difference between these groups (n=6-7 each) was observed in the diameter of the major vessels comprising the circle of Willis measured by a digitizer system. 3) No significant difference between the groups (n=6-7 each) was detected in LCBF evaluated by the [¹⁴C]iodoantipyrine method. These data suggest that these NOS-containing postganglionic perivascular nerve fibers may not be involved in pathogenesis of the spontaneous occlusion of the circle of Willis (moyamoya disease).

Key Words: moyamoya disease, parasympathetic nerve, sphenopalatine ganglion, nitric oxide synthase, local cerebral blood flow

最新の診断，治療の手引き（1995年）

厚生省疾病対策課より難病の診断，治療の手引きを各疾患間で統一するよう指導があり，1995年度本研究班において，1994年度の診断基準の改正を基本に書式を変更した。

- I. 診断の手引き（診断基準）
- II. 概念・疫学（1995年全国調査）・病因・症状・治療
- III. 治療の手引き
- IV. MRI・MRAによる画像診断のための指針（画像）
- V. 臨床調査個人票

Ⅰ. ウィリス動脈輪閉塞症の診断の手引き

1. ウィリス動脈輪閉塞症の診断基準

- (1) 診断上，脳血管撮影は必須であり，少なくとも次の所見がある。
 - 1) 頭蓋内内頸動脈終末部，前および中大脳動脈近位部に狭窄または閉塞がみられる。
 - 2) その付近に異常血管網が動脈相においてみられる。
 - 3) これらの所見が両側性にある。
- (2) ただし，磁気共鳴画像(MRI)と磁気共鳴血管撮影(MRA)により脳血管撮影における診断基準に照らして，下記のすべての項目を満たしうる場合は通常の脳血管撮影は省いてもよい。
 - 1) MRAで頭蓋内内頸動脈終末部，前および中大脳動脈近位部に狭窄または閉塞がみられる。
 - 2) MRAで大脳基底核部に異常血管網がみられる。
注) 2') MRI上，大脳基底核部に少なくとも一側で2つ以上明らかな flow void を認める場合，異常血管網と判定してよい。
 - 3) 1) と2) の所見が両側性にある。（「MRI・MRAによる画像診断のための指針」を参照のこと）
- (3) 本症は原因不明の疾患であり，下記の特別な基礎疾患に伴う類似の脳血管病変は除外する。
 - 1) 動脈硬化 2) 自己免疫疾患 3) 髄膜炎 4) 脳腫瘍
 - 5) ダウン症候群 6) レックリングハウゼン病 7) 頭部外傷 8) 頭部放射線照射
 - 9) その他
- (4) 診断の参考となる病理学的所見
 - 1) 内頸動脈終末部を中心とする動脈の内膜肥厚と，それによる内腔狭窄ないし閉塞が，通常両側性に認められる。ときに肥厚内膜内に肥質沈着を伴うこともある。
 - 2) 前・中大脳動脈，後大脳動脈などウィリス動脈輪を構成する諸動脈に，しばしば内膜の線維性肥厚，内弾性板の屈曲，中膜の菲薄化を伴う種々の程度の狭窄ないし閉塞が認められる。
 - 3) ウィリス動脈輪を中心として多数の小血管（穿通枝および吻合枝）がみられる。
 - 4) しばしば軟膜内に小血管の網状集合がみられる。

<診断の判定>

1に述べられている事項を参考として，下記のごとく分類する。なお脳血管撮影を行わず剖検を行ったものについては，(4)を参考として別途に検討する。

[1. 確実例]

(1)あるいは(2)のすべての条件および(3)を満たすもの。ただし，小児では一側に(1)あるいは(2)の1)，2)を満たし，他側の内頸動脈終末部付近にも狭窄の所見が明らかにあるものを含む。

[2. 疑い例]

(1)あるいは(2)および(3)のうち，(1)あるいは(2)の3)の条件のみを満たさないもの。

II. ウィリス動脈輪閉塞症

<概念>

ウィリス動脈輪閉塞症は、日本人に多発する原因不明の脳血管疾患であり、脳血管撮影で異常血管網を認めることからモヤモヤ病ともいわれる。発症の年齢分布は二峰性を示し、5歳を中心とする高い山と30～40歳を中心とする低い山を認める。前者を若年型、後者を成人型と区別している。若年型はウィリス動脈輪の狭窄や閉塞による病態であり、成人型は主として若年過程に生じた副血行路の破綻による出血である。

<疫学>

本邦およびアジア系民族に多い。全国年間受療患者数(1994年)は約3,900人、人口10万人あたり3.16(95%信頼区間3,500～4,000人)である。推計発生率は人口10万人あたり0.35、男女比は1:1.8で女性に多い。患者の約10%に本症の家族歴を認める。(1995年全国調査推定)

<病因>

症例の一部では宿主要因(多因子遺伝)の関連が示唆されているが、原因不明の脳血管疾患である。

<症状>

症状および経過については、無症状(偶然発見)のものから、一過性のもの、および固定神経症状を呈するものなど軽量・多岐にわたっている。小児例では脳虚血症状を、成人例では頭蓋内出血症状を主体とするものが多い。

- (1) 小児例は脳の虚血による神経症状をもって始まるものが多く、意識障害、脱力発作(四肢麻痺、片麻痺、単麻痺)、感覚異常、不随意運動、痙攣、頭痛などが突発する。このような虚血発作は、過呼吸時(激しい啼泣など)あるいはなんら誘因なく反復発作的に出現し、ときに病側が左右交代して現れることがある。症状はその後継続して生ずる場合と、停止する場合がある。悪化する症例では精神機能障害、知能低下、失語、全盲などに至る場合がある。成人例のように出血発作をきたすことはまれである。
- (2) 成人例は頭蓋内出血による脳卒中発作の形(多くは脳室内、クモ膜下腔、あるいは脳内出血)で突然発症することが多く、出血部位に応じて意識障害、運動麻痺、言語障害、精神症状などを呈する。残りは小児例と同様、脳虚血発作の形で発病する。これらの多くは軽快し、あるいは固定神経症状を残すが、なかには重症となり、死亡するものもある。死亡例の約半数が出血例である。

<治療>

虚血・出血発作の急性期には、気道確保と血圧維持、脳圧亢進対策、痙攣抑制、呼吸器および尿路感染防止などの対症療法を行う。虚血発作に対しては、脳循環代謝などを評価し、必要に応じて外科的血行再建術を行うことが多い(特に小児例)。後遺症に対してはリハビリテーションを行う。

III-1. 一次医療機関における治療およびその限界点

本症の原因は不明であるので根治的な治療法はない。急性期と再発防止・後遺症に対する対症療法が主体である。

特に小児の脳卒中発作は本症を疑い、虚血・出血発作の急性期には、輸液、脳圧亢進対策、痙攣抑制、気道確保と血圧維持など脳循環機能の改善を目指した対症療法を行う。激しい啼泣・必要以上の酸素吸入は症状を悪化させることがあるので注意が必要である。確定診断のためには、脳血管造影や高解像度MRIが必要であるので、症状が落ちつき次第、二次・三次医療機関への転送が望ましい。

III-2. 二次・三次医療機関などにおける治療

まず診断の確定に先立って急性期には輸液、脳圧亢進対策、痙攣抑制、気道確保と血圧維持など脳循環機能の改善を目指した対症療法を行う必要がある。成人出血例にあつては、確定診断前に脳室ドレナ