

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等政策研究事業（難治性疾患政策研究事業）
Dolichoectasia の疾患概念確立並びに病態解明・診断基準作成に関する研究 分担研究報告書

ゲノム解析、エピゲノム解析、単一細胞解析

研究分担者：和田洋一郎 東京大学・アイソトープ総合センター

研究協力者：中富浩文 東京大学・医学部附属病院

栗原裕基 東京大学・大学院医学系研究科

研究要旨 マウス脳底動脈の露出手技を開発し、同血管に直接塩化カルシウムパッチを施したところ、マウス脳底動脈に拡張性病変を来すことに成功した。そこで、引き続きマイクロアレイを施行したところ、術後 6 時間の時点で既に MAPK カスケードや NF- κ B 関連遺伝子の発現亢進が認められ、特に後者は病態形成への関与が強く疑われた。更に、好中球マーカーや細胞外基質分解酵素（主に MMP）の発現亢進も認められた。細胞周期・増殖関連遺伝子やマクロファージマーカーは術後 6 時間よりも術後 72 時間でより発現が亢進していた。これにより、浸潤細胞は好中球 マクロファージの順に異なる phase で遊走して来ていることが示唆された。これらはごくごく一部のデータに過ぎないが、これらをもとに更なる解析を進めることで当モデルの病態形成・増悪の機序を解明し、ひいては dolichoectasia の新たな治療法開発へと繋げていくことが期待出来るものと考えられる。

A. 研究目的

マウス体血管を直接操作することで血管病変を作成するモデルは、これまでに多数報告されている。しかし、脳血管、殊に脳底動脈となると、そのようなモデルの報告はほとんど無い。この主な要因として、マウス脳底動脈を生きながらに露出して操作を加える手術手技の困難さが挙げられる。しかしながら、dolichoectasia は圧倒的に後方循環に多い為、dolichoectasia を模するマウスモデルの作成にはこの手術手技が必須であると考えた。

そこで、まずは研究代表者である中富浩文（東京大学・医学部附属病院）および研究分担者である栗原裕基（東京大学・大学院医学系研究科）により、安全かつ確実なマウス脳底動脈露出手技を確立した上で、マウス脳底動脈に拡張性病変を来すモデル（マウス脳動脈瘤モデル）を作成・確立した。このモデルは術後超早期から劇的な組織学的変化を来すことが分かった為、この時点における網羅的な遺伝子発現解析を行うことで、病態形成に重要な役割を果たしていると考えられる遺伝子の特定を目指した。

B. 研究方法

マウスの系統は C57BL/6N を選択し、9-10 週齢の雄を用いた。

既に確立したマウス脳動脈瘤モデルを作成し、術後 6 時間および 72 時間の時点で脳底動脈を各々 10 匹分ずつ採取した。コントロールも同様にして 10 匹分を採取した。引き続きサンプルより total RNA の抽出を行い、cRNA まで調整を行なった。これらを用いてマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行い、得られたデータを解析した。

（倫理面への配慮）

動物実験に関しては、東京大学大学院医学系研究科動物実験委員会の主催する動物実験講習会への参加が義務付けられており、その上で「東京大学動物実験実施規則」及び「東京大学動物実験実施マニュアル」に基づき動物実験が遂行されるものである。また、本研究の動物実験計画書も既に担当部局長（東京大学大学院医学系研究科長）に提出の上、承認済み（承認番号：医-H14-187）である。

C. 研究結果

コントロールと比して、術後6時間の時点で既にMAPKカスケードやNF- κ B関連遺伝子の発

現亢進が認められた。好中球マーカーや細胞外基質分解酵素(主にMMP)の発現亢進も認められた。そしてこれらは、術後72時間の時点では既にピークアウトしていた。これに対し、細胞周期・増殖関連遺伝子やマクロファージマーカーは術後6時間よりも術後72時間でより発現が亢進していた。

D. 考察

術後6時間の時点で既にNF-κB関連遺伝子の発現が顕著に亢進していたことから、参考文献1)のように、当モデルでもNF-κBがその病態形成に非常に重要な役割を果たしている可能性が考えられた。また、浸潤細胞のマーカーに関しては、先に好中球のマーカーが発現のピークを迎え、その後マクロファージのマーカーが追従するような動きを示しており、実際にこのような順序で細胞浸潤が起こっている可能性が示唆された。更に、参考文献2)のように、腹部大動脈瘤モデル(塩化カルシウムパッチ)では特にMMP2とMMP9が協調して働くことで病態形成・増悪が起こるとされているが、当モデルではMMP2の発現亢進こそ顕著ではなかったもののMMP9は明らかに発現が亢進しており、病態形成への関与が疑われる。これらの結果をもとに、研究分担者である栗原裕基(東京大学・大学院医学系研究科)において各種免疫組織化学を行い、これらの経時的な発現状況や局在等を調べている。また、その結果に応じて今後ウェスタンブロットや定量PCRといった解析を進めて行く予定である。

E. 結論

当モデルでは、術後6時間の時点でMAPKカスケードやNF-κBの発現亢進を認め、特に後者の病態形成への強い関与が示唆された。これに引き続く形で、細胞周期・増殖関連遺伝子の発現亢進が認められた。浸潤細胞のマーカーは、先に好中球のマーカーが発現亢進し、その後マクロファージのマーカーが上昇して来る傾向を認めた。各種MMPも術後6時間で軒並み上昇しており、参考文献から特にMMP9の病態形成への関与が強く疑われた。なお、MMP12のみ術後72時間の方が発現量が上昇していたが、MMP12はマクロファージMMPであることが

ら、これもマクロファージマーカーの動きに矛盾しない所見であった。

[参考文献]

[雑誌]

- 1) Aoki T, Kataoka H, Shimamura M, Nakagami H, Wakayama K, Moriwaki T, Ishibashi R, Nozaki K, Morishita R, Hashimoto N. NF-kappaB is a key mediator of cerebral aneurysm formation. *Circulation* Dec 11;116(24):2830-40, 2007.
- 2) Longo GM1, Xiong W, Greiner TC, Zhao Y, Fiotti N, Baxter BT. Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *J Clin Invest* Sep;110(5):625-32, 2002

[書籍]

無し

F. 健康危険情報

無し。

G. 研究発表(2015/4/1~2016/3/31発表)

1. 論文発表

[雑誌] (著者名は省略せずに全員記載して下さい。)

無し

[書籍] (著者名は省略せずに全員記載して下さい。)

無し

2. 学会発表

(発表者名は省略せずに全員記載してください。)

- 1) 苗村和明、中富浩文、宮脇哲、越智崇、伊藤明博、今井英明、栗原裕基、斉藤延人. マウス脳底動脈露出手技の確立及びマウス脳底動脈拡張症モデルの作成・解析. 日本脳神経外科学会第74回学術総会, 札幌, 10月15日, 2015年.
- 2) 苗村和明、中富浩文、田口明糸、和田洋一郎、斉藤延人、栗原裕基. マウス脳底動脈拡張症モデルの作成・解析. 第23回日本血管生物医学会学術集会, 神戸, 12月11日, 2015年.
- 3) 苗村和明、中富浩文、宮脇哲、越智崇、伊藤明博、今井英明、栗原裕基、斉藤延人. マ

- ウス脳底動脈拡張症モデルの作成・解析. 日本脳卒中学会総会, 札幌, 4月15日, 2016年.
- 4) 苗村和明、中富浩文、小野秀明、宮脇哲、越智崇、伊藤明博、今井英明、栗原裕基、斉藤延人. マウス脳底動脈拡張症モデルの作成・解析. 日本脳神経外科学会第75回学術総会, 博多, 10月01日, 2016年.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得
無し

2. 実用新案登録
無し

3. その他

図表は、上記本文の中に
貼り付けないで下さい。