

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

## マウス脳動脈瘤モデルの確立と病態解析

研究分担者：栗原裕基 東京大学・大学院医学系研究科

研究協力者：中富浩文 東京大学・医学部附属病院

和田洋一郎 東京大学・アイソトープ総合センター

**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、血管径の拡大および中膜平滑筋層の菲薄化を認め、内弾性板の変形も顕著に認められた。これは dolichoectasia の病理所見に類似していた。引き続き、マイクロアレイの結果に基づき各種免疫組織化学を行なったところ、MMP（特に MMP9）が病態形成に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。この MMP9 は、術後超早期には中膜平滑筋細胞から、その後はマクロファージから分泌されている可能性が示唆され、外膜組織の分解により血管径拡張に関与しているものと考えられた。当モデルは dolichoectasia と類似しており、病態形成過程における細胞動態とその分子機構の更なる解析により、新たな治療法開発への貢献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、我々はまずマウス脳底動脈の安全かつ確実な露出手技の確立を目指した。その上で、この露出手技を用いてマウス脳底動脈に直接操作を加えることで、同血管に拡張性病変を来すモデルの作成・確立を目指した。更に、このモデルを詳細に解析し、その病態モデルとしての妥当性を検討した。

### 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。

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）の協力のもと、参考文献 1) の手術手技を応用することで、マウス脳底動脈の広範な露出を図った。また、その過程で同

手術手技を改良することにより、より安全かつ確実な露出法を模索した。

続いて、参考文献 2) を参考に、露出したマウス脳底動脈に対して 0.5mol/L 塩化カルシウムのパッチ (Group1) を行った。対照群としては、生理食塩水 (0.9% 塩化ナトリウム) のパッチを行なった群 (Group2) を置いた。また、介入群として、塩化カルシウムパッチの 3 日前から sacrifice までドキシサイクリン内服を継続した群 (Group3) を用意した。これら 3 群につき、血管径および組織学的特徴 (内皮細胞、平滑筋細胞、内弾性板等) を経時的に比較・評価した。

その後、研究分担者である和田洋一郎（東京大学・アイソトープ総合センター）により実施されたマイクロアレイによる網羅的解析の結果を受け、各種免疫組織化学により実際の発現状況・局在を確認した。

### （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

平成28年5月31日現在、マウス220匹に対して前述の手術を施行しているが、sacrificeまでに死亡したものは9匹のみであった。すなわち、術後生存率は95.9%(211/220)であり、手術手技の困難さから想定された当初の予想と比較しても、非常に良好な数字が達成出来ている。

Group1では、術後4日、7日、14日、28日、42日と経時的に評価を行ったところ、血管径が徐々に拡張していく傾向が認められた。これに対し、Group2では経時的な拡張傾向は認められず、両者には全期間において統計学的な有意差が認められた。ドキシサイクリンによる介入を行なったGroup3でもGroup2と同様に経時的な拡張傾向を認めず、やはり全期間においてGroup1と統計学的な有意差を認めた。以上より、0.5mol/L 塩化カルシウムパッチによってマウス脳底動脈に有意な血管拡張が引き起こされるが、これはドキシサイクリンによってキャンセルされることが示された。

また、Group1では術後4日の時点で中膜平滑筋層の顕著な菲薄化を認め、以降徐々に回復していく傾向を認めた。これに対し、Group2では全期間を通じて中膜平滑筋層の厚みには変化を認めず、両者には全期間において統計学的な有意差が認められた。Group3において、中膜平滑筋層の菲薄化は抑制される傾向を認め、術後4日、14日ではGroup1と有意差を認めたが、それ以降は有意差を認めなかった。以上より、0.5mol/L 塩化カルシウムパッチによってマウス脳底動脈の中膜平滑筋層に有意な菲薄化がもたらされるが、これもドキシサイクリンによってある程度抑制されることが分かった。

更に、Group1ではパッチを行なった側の内弾性板の変形・変性が顕著に認められた。ただし、PECAMによる内皮細胞の免疫組織化学により、これらは特に影響を受けていない可能性が高いことが示唆された。

引き続き、マイクロアレイによる網羅的解析の結果を受け、まずは好中球(Ly6G)およびマクロファージ(Iba1)による免疫組織化学を行なった。結果、術後1-2時間で好中球の浸潤が認

められるようになり、術後1日でピークを迎え、術後3日にはやや沈静化する傾向を認めた。これに対し、マクロファージの浸潤は術後1日程度からようやく増え始め、術後3日で更に増える傾向が認められた。すなわち、浸潤細胞に関しては、好中球 マクロファージの順にややphaseがずれてピークを迎えていることが分かった。

また、MMP9による免疫組織化学を行うと、術後1時間の時点で既にパッチをした側に染色がはっきりと認められた。この染色は術後6時間~1日でピークを迎え、術後3日にはかなり消退していく傾向が認められ、その一部が中膜平滑筋層( $\alpha$ SMA)の外層と共発現していることが確認された。また、術後1日の時点ではマクロファージの集団(F4/80)とも共発現して来る様子が認められた。

### D. 考察

今回我々が確立したマウス脳底動脈の露出手技を用いたマウスモデルに於いて、術後生存率は前述の通りであり、これは十分に許容される数値であると考えられた。また、この手術手技は今後様々な形で応用可能であり、非常に有用な手術手技を開発出来たものとする。

当モデルの特徴として、脳底動脈の有意な拡張、中膜平滑筋層の有意な菲薄化および内弾性板の変形・変性を挙げる事が出来る。これはdolichoectasiaの組織学的特徴と類似しており、本疾患を研究する上で非常に有用なモデルを作成することが出来たものとする。

また、マイクロアレイの結果に基づいた免疫組織化学により、術後超早期におけるMMP9の分泌には中膜平滑筋細胞が一部関与していることが判明した。恐らくこの分泌により、血管の支持組織たる外膜組織の分解が促進され、以降の血管径拡張に繋がっていくものと考えられる。また、浸潤細胞にも種類によってphaseの違いがあり、まずは好中球が遊走し、これに遅れてマクロファージが遊走して来ることが分かった。後者はMMP9の分泌に関与している可能性があり、こちらも血管径の拡張に関与していることが示唆された。ドキシサイクリン介入によって当モデルの形質が大部分キャンセルされたことも、ドキシサイクリンがMMP阻

害薬としての機能を有していることを考えると、当モデルにおいて MMP（特に MMP9）がその病態形成に大きな役割を果たしている可能性が強く示唆された。

#### E. 結論

マウス脳底動脈の安全かつ確実な露出手技を確立することに成功した。この手術手技を用いることで、マウス脳底動脈に拡張性病変を来すモデルを作成・確立した。その組織学的特徴は dolichoectasia に類似していた。MMP（特に MMP9）が病態形成に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。今後も引き続きマイクロアレイの結果等に基づいた解析を続けていく予定である。

#### [参考文献]

##### [雑誌]

- 1) Yonekura I, Kawahara N, Nakatomi H, Furuya K, Kirino T. A model of global cerebral ischemia in C57 BL/6 mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* Feb;24(2):151-8, 2004.
- 2) Wang Y, Krishna S, Golledge J. The calcium chloride-induced rodent model of abdominal aortic aneurysm. *Atherosclerosis.* Jan;226(1):29-39, 2013.

##### [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  
貼り付けしないで下さい。