(様式 10)

(海外特別研究員事業)

令和2年 1月 6日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

ウェブサイト公開用

採用年度 30年度 受付番号 201860299 氏 名 池堂 太一 池堂太—

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。 なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

	記		
1.	用務地(派遣先国名)用務地:アリゾナ州フェニックス市 (国名: 米国)	
2.	研究課題名(和文) <u>※研究課題名は申請時のものと違わないように記載すること。</u>		
脳動脈瘤破裂メカニズム解明と薬剤療法確立の研究			
3.	派遣期間: <u>平成 30年 4月 5日 ~ 平成 31年 3月</u>	13 日	

4. 受入機関名及び部局名

Department of Neurosurgery and Neurobiology, Barrow Neurological Institute

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意(A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も**

可)

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6.研究発表」以降については様式10-別紙1~4に記入の上、併せて提出すること。

【研究の目的】

くも膜下出血は 8-67%の患者が死亡,生存患者のうち 40%が社会復帰困難な障害を残す重篤な 疾患である。脳動脈瘤破裂が最大の原因であり,予測と適切な治療のため,動脈瘤発生から破 裂までのメカニズム解明が求められている。

【研究の内容、成果】

今回の留学派遣先であった Barrow Neurological Institute, Hashimoto Lab は、マウス破裂脳動脈瘤 モデルを開発した研究室である。まず、従来京都大学で我々が使用していたラット脳動脈瘤増 大モデルに加えて、新しく習得する事で、帰国後の我が国での脳動脈瘤研究の幅を広げること ができた(Figure 1)。血糖降下薬 Dipeptidyl Peptidase-4 (DPP-4) 阻害薬投与実験に関しては、薬剤 と遺伝子改変マウス入手が困難であったが、今回の研究テーマ "脳動脈瘤破裂メカニズム解明 と薬剤療法確立の研究"における主な研究成果として、下記に示す結果を得ることができた。

研究成果 ① (Hypertension. 2019. Feb;73(2):491-496.) Potential Influences of Gut Microbiota on the Formation of Intracranial Aneurysm 腸内細菌叢が脳動脈瘤発生に関与する可能性に関する研究

腸内細菌叢の脳動脈瘤発生に与える影響に関して、マウス脳動脈瘤破裂モデルを用いて検証した。抗生剤を動脈瘤誘導手術の3週間前より経口投与し腸内除菌を行うと、炎症性サイトカイン産生が抑制され、脳動脈瘤発生率が抑えられた(83% versus 6%, P<0.001)。また抗生剤投与を動脈瘤誘導の直前に中止した場合も、脳動脈瘤発生率は抑制された(86% versus 28%, P<0.05)。 腸内細菌叢が動脈瘤発生の病態に関与することが示された。

研究成果 ② (Hypertension. 2019. in press)

<u>Toll-like receptor 4 mediates the development of intracranial aneurysm rupture</u> 脳動脈瘤破裂における TLR4 経路関与のメカニズムに関する研究

(目的)これまで、脳動脈瘤増大破裂への慢性炎症の関与が報告されてきた。また、近年自然免疫 に関わる受容体である、Toll-like receptor 4 (TLR4) が心血管疾患において炎症と病態進展に関わ ることが報告されている。本研究では、TLR4 経路が脳動脈瘤破裂に寄与するか否か、さらにそ の詳細なメカニズムについて検討した。

(方法)マウス脳動脈瘤破裂モデルを作成し破裂率により比較した。

(結果)TLR4 阻害薬である Rhodobacter sphaeroides (LPS-RS) 腹腔投与において, 破裂率は有意に 抑制された (Figure 2. vehicle versus TLR4 inhibitor; 83% versus 52%; P < 0.05)。また, 野生型マ ウスと比較し, TLR4 遺伝子欠損マウスにおいて破裂率が有意に低下し (Figure 3. wild-type littermates versus TLR4 knockout mice; 77% versus 33%; P < 0.05), 炎症性サイトカインの抑制 を認めた (Figure 4)。さらに, TLR4 の役割の局在を調べるため, マクロファージ特異的 TLR4 遺 伝子欠損マウスを作成した。同マウスにおいても破裂率は有意に抑制された (Figure 5. control littermate mice versus macrophage/granulocyte-specific TLR4 knockout mice; 91% versus 39%; P < 0.05)。最後に, TLR4 経路の関連を検討するため, TLR4 に結合する主要な調整因子である, myeloid differentiation primary-response protein 88 (MyD88) 遺伝子欠損マウスを用いて破裂率を検 討した。同マウスにおいても野生型マウスに比較し, 破裂率は有意に抑制された (Figure 6. wild-type littermates versus MyD88 knockout mice; 88% versus 53%; P < 0.05)。 (結論)マウス脳動脈瘤破裂モデルにおいて,炎症性細胞における TLR4 経路活性が, 脳動脈瘤破 裂に寄与する可能性が示唆された。 **Figure 1.** Representative images of unruptured and ruptured aneurysms. Blue dye was injected into Circle of Willis. **A**. no aneurysm. **B**. unruptured aneurysm. **C**. ruptured aneurysm with subarachnoid hemorrhage. Arrowheads indicate intracranial aneurysms.



Figure 2. TLR4 inhibitor reduced a rupture rate but did not affect the formation of aneurysms. **A**. Incidence of unruptured and ruptured aneurysms. **B**. Rupture rate. **C**. Symptom-free curve (Kaplan–Meier analysis curve). **D**. Systolic blood pressure. Mice that did not have aneurysms were excluded from this analysis. *P < 0.05, **P < 0.01



Figure 3. Toll-like receptor 4 (TLR4) knockout mice had a lower rupture rate than wild-type littermates. **A.** Incidence of unruptured and ruptured aneurysms. **B.** Rupture rate. **C.** Symptom-free curve (Kaplan–Meier analysis curve). **D.** Systolic blood pressure. Mice that did not have aneurysms were excluded from this analysis. *P < 0.05, **P < 0.01, TLR4 KO: toll-like receptor 4 knockout mice.



Figure 4. RNA expression of interleukin (IL)-6, IL-1 β , tumor necrosis factor- α (TNF α), monocyte chemoattractant factor-1 (MCP-1), matrix metalloproteinase (MMP)-9, and nuclear factor-kappa B (NF- κ B) p65 in cerebral arteries from mice with or without induction of aneurysm (n = 5 each). *P < 0.05, **P < 0.01, TLR4 KO: toll-like receptor 4 knockout mice.





Figure 5. Macrophage/granulocyte-specific toll-like receptor 4 (TLR4) knockout mice (TLR4 flox/flox LysMCre +) had a lower rupture rate than control littermate mice (TLR4 flox/flox LysMCre -). **A**. Incidence of unruptured and ruptured aneurysms. **B**. Rupture rate. **C**. Symptom-free curve (Kaplan–Meier analysis curve). **D**. Systolic blood pressure. Mice that did not have aneurysms were excluded from this analysis. *P < 0.05, **P < 0.01, TLR4 LysM - indicates toll-like receptor 4 flox/flox LysMCre - mice; TLR4 LysM +, TLR4 flox/flox LysMCre + mice.



Figure 6. Myeloid differentiation primary-response protein 88 (MyD88) knockout mice had a lower rupture rate than wild-type littermates. **A**. Incidence of unruptured and ruptured aneurysms. **B**. Rupture rate. **C**. Symptom-free curve (Kaplan–Meier analysis curve). **D**. Systolic blood pressure. Mice that did not have aneurysms were excluded from this analysis. *P < 0.05, **P < 0.01, MyD88 KO: myeloid differentiation primary-response protein 88 knockout mice.



【成果の発表、論文等】

Shikata F, Shimada K, Sato H, <u>Ikedo T</u>, Kuwabara A, Furukawa H, Korai M, Kotoda M, Yokosuka K, Makino H, Ziegler EA, Kudo D, Lawton MT, Hashimoto T. Potential Influences of Gut Microbiota on the Formation of Intracranial Aneurysm. Hypertension. 2019 Feb;73(2):491-496.

Mitsui K^{*}, <u>Ikedo T^{*}</u>, Kamio Y, Furukawa H, Lawton M, Hashimoto T, Toll-like receptor 4 mediates the development of intracranial aneurysm rupture. Hypertension. 2019. In press.