

**The Elucidation of Clinical Characteristics  
and the Underlying Mechanism of  
Specific Angiogenesis in Moyamoya Disease**

もやもや病における特異的側副血行路形成の  
臨床的特徴および発生機序の解明

生命融合科学教育部（博士課程） 認知・情動脳科学専攻

山本 修輔

## 目次

要旨	3
1. 序論	5
2. 対象と方法	
2-1 もやもや病における脳血行再建術後のもやもや血管の変化	8
2-2 小児期発症成人もやもや病における放射線学的・臨床的特徴	11
2-3 もやもや病患者くも膜の免疫組織学的評価	12
3. 結果	
3-1 もやもや病における脳血行再建術後のもやもや血管の変化	14
3-2 小児期発症成人もやもや病における放射線学的・臨床的特徴	20
3-3 もやもや病患者くも膜の免疫組織学的評価	25
4. 考察	
4-1 もやもや病における脳血行再建術後のもやもや血管の変化	30
4-2 小児期発症成人もやもや病における放射線学的・臨床的特徴	32
4-3 もやもや病患者くも膜の免疫組織学的評価	33
5. 結語	37
6. 謝辞	38
7. 参考文献	38

## 要旨

**【目的】**もやもや病では、経硬膜吻合および間接血行再建術後の血管新生といった、特異的な側副血行路の形成がみられる。これらは他の閉塞性脳血管障害ではみられない、もやもや病に特有の現象である。これらの発達は内頸動脈終末部を中心とした脳主幹動脈狭窄による脳虚血を代償するが、その臨床的意義および発生メカニズムはいまだ完全には明らかとなっていない。今回、これらの側副血行路形成の臨床的意義、発生メカニズムを解明することを目的として、3つの臨床研究を実施した。

**【方法】**成人および小児もやもや病に対し、浅側頭動脈-中大脳動脈吻合術 (STA-MCAバイパス術) およびencephalo-duro-myo-arterio-pericranial synangiosis (EDMAPS) を実施し、もやもや病における頭蓋内出血の原因となるもやもや血管の術前後の変化を評価した。もやもや血管は、lenticulostriate、thalamic、およびchoroidal channelの3つに分類し、それぞれについてGrade 0~2の3段階で評価した。また、術後の側副血行路の発達度ともやもや血管の消退との関連性を解析した。次に、成人もやもや病患者を小児期の脳虚血エピソードを有する「小児期発症群」と有さない「成人期発症群」に分類し、その臨床的・放射線学的特徴を比較した。両群におけるもやもや血管の発達度、経硬膜吻合や間接血行再建術後の側副血行路の発達度を比較した。最後に、もやもや病患者に対する手術中にくも膜組織を採取し、くも膜細胞の生物学的特徴を明らかにするため免疫組織染色を実施した。その所見を動脈硬化性頭蓋内動脈狭窄患者 (対照群) と比較した。免疫組織染色にはplatelet-derived growth factor receptor- $\alpha$  (PDGFR $\alpha$ )、PDGFR $\beta$ 、 $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA) に対する一次抗体を使用した。また、くも膜のコラーゲン密度を測定するためにSirius red染色を実施した。さらに、術中に採取した脳脊髄液中のサイトカイン濃度をenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) にて測定した。Basic fibroblast growth factor (bFGF)、hepatocyte growth factor (HGF)、transforming growth factor  $\beta$ -1 (TGF- $\beta$ 1) の濃度を測定し、両群間で比較した。

**【結果】** STA-MCAバイパス術およびEDMAPSを実施した61人92半球のうち、小児17人ではlenticulostriateおよびchoroidal channelが術後に有意に退縮した (それぞれ $P<0.001$ 、 $P=0.034$ )。成人44人では、lenticulostriate、thalamic、choroidal channelの全てが術後に有意に退縮した (それぞれ $P<0.001$ 、 $P=0.012$ 、 $P=0.004$ )。また、複合血行再建術後の側副血行路の発達度は、頭蓋内出血のリスク因子であるchoroidal channelの消退と有意に関連していた。次に、69人116半球の成人もやもや病患者を小児期の虚血エピソードの有無にて分類したところ、14人26半球が小児期発症群、55人90半球成人期発症群と診断された。小児期発症群では平均年齢が有意に若く ( $34.0\pm 6.2$ 歳 vs.  $43.3\pm 11.1$ 歳、 $P<0.001$ ) 頭蓋内出血での発症が多かった ( $57.1\%$  vs.  $14.5\%$ 、 $P=0.009$ )。Lenticulostriateおよびchoroidal channelは小児期発症群でより発達度が高く (それぞれ $P=0.044$ 、 $P<0.001$ )、vault moyamoyaは小児期発症群でより保有率が高

かった (88.5% vs 27.8%、 $P<0.001$ )。また、間接血行再建術を介した側副血行路は、小児期発症群でより高度に発達していた ( $P=0.002$ )。小児期発症 (OR 4.31 [95% CI 1.21-15.4]、 $P=0.025$ ) およびGrade-2 choroidal channel (OR 6.78 [95% CI 1.78-25.8]、 $P=0.005$ ) は、成人もやもや病における頭蓋内出血の独立した危険因子であった。最後に、26人のもやもや病患者と、6人の動脈硬化性頭蓋内動脈狭窄患者 (対照群) のくも膜を採取し、免疫組織学的検討を行った。PDGFR $\alpha$ 、PDGFR $\beta$ 、および $\alpha$ SMA陽性細胞は、対照群と比較してもやもや病群で有意に高発現していた (それぞれ $P=0.02$ 、 $P=0.01$ 、 $P<0.01$ )。さらに、PDGFR $\alpha$ と $\alpha$ SMAの蛍光二重染色では、もやもや病群で共陽性細胞数が有意に多くみられた ( $80.5\pm 15.6\%$  vs.  $14.6\pm 7.2\%$ 、 $P<0.01$ )。このことから、もやもや病患者のくも膜細胞は筋線維芽細胞であると考えられた。また、くも膜のコラーゲン密度はもやもや病群で有意に高かった ( $60.3\pm 15.0\%$  vs.  $40.1\pm 15.3\%$ 、 $P<0.01$ )。脳脊髄液中のbFGF、HGF、TGF- $\beta$ 1はいずれも対照群と比較してもやもや病群で有意に高濃度であった (いずれも $P<0.01$ )。

【結語】STA-MCAバイパス術およびEDMAPSが、もやもや病において頭蓋内出血の原因となり得るもやもや血管を有意に退縮させることを示した。初発および再発頭蓋内出血の最も有力な予測因子であるGrade-2 choroidal channelの退縮は、脳血行再建術後の側副血行路発達と有意に相関していた。もやもや病に特異的である間接血行再建を介した側副血行路発達が、もやもや病患者の転帰改善に非常に重要であることが判明した。小児期発症成人もやもや病患者では、もやもや血管がより高度に発達しており、その結果として頭蓋内出血が発生する危険性が高いことが初めて明らかとなった。また、この患者群では経硬膜吻合がより発達しており、これは小児期の脳血流需要の高さのためであると考えられた。成人もやもや病における「小児期発症」という概念は臨床的に重要なものであると考えられる。もやもや病患者のくも膜では対照群と比較して線維芽細胞数が多く、その大部分が筋線維芽細胞へ分化していることが初めて明らかとなった。もやもや病の脳脊髄液におけるbFGF、HGF、TGF- $\beta$ 1などの血管新生因子濃度の上昇が、この現象に寄与している可能性がある。筋線維芽細胞がくも膜におけるコラーゲン産生を促進し、経硬膜吻合や間接血行再建術後の側副血行路形成など、もやもや病における特異的な血管新生を促進している可能性がある。今後、もやもや病くも膜における $\alpha$ SMA陽性筋線維芽細胞の役割についてさらなる研究が必要である。

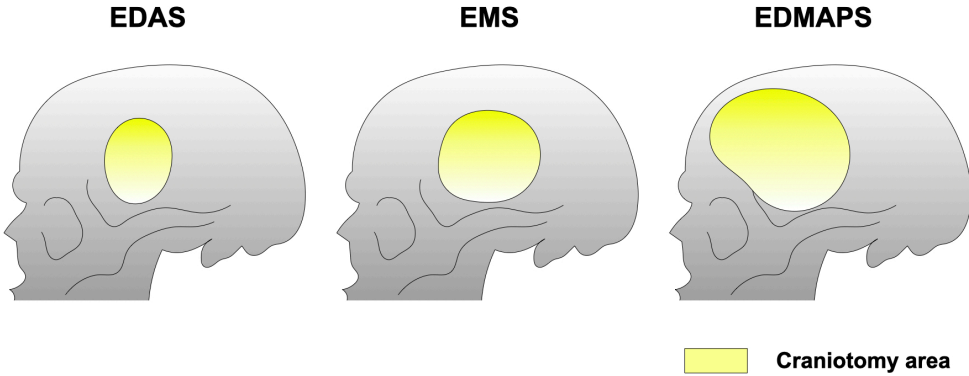
## 1. 序論

もやもや病（ウイルス動脈輪閉塞症）は、1957年に特異な脳血管撮影所見が初めて報告され、1960年代に疾患としての概念が確立された。<sup>1-3</sup> 本疾患は内頸動脈終末部から前および中大脳動脈近位部に慢性進行性の狭窄が生じ、これによる脳虚血を代償するための側副血行路として脳底部に異常血管網（脳底部もやもや血管）が形成される原因不明の閉塞性脳血管障害である。脳血管撮影検査において、これらのもやもや血管が立ちのぼる煙のように見えることから「もやもや病」と名付けられた。<sup>3</sup> 小児患者では多くの場合、脳虚血の進行により一過性脳虚血発作（TIA）や脳梗塞で発症する。一方、成人患者の約半数は頭蓋内出血で発症することが知られている。<sup>4</sup> 病期の進行により内頸動脈が閉塞に至るにつれて、外頸動脈系から脳表の皮質動脈への血管新生が発生する。<sup>3</sup> この新生血管は硬膜を経由して脳表へ至ることから、経硬膜吻合（transdural anastomosis）と呼ばれる。<sup>5</sup> これはもやもや病に非常に特異的な側副血行路である。<sup>4</sup>

前述の通り、もやもや病ではTIAや脳梗塞、頭蓋内出血を生じ得る。<sup>3,4</sup> 特に脳梗塞や頭蓋内出血を起こした場合、意識障害や言語障害、麻痺等の神経症状が後遺する可能性がある。これを防ぐ上で有効な内科治療は存在せず、脳血行再建術が唯一の治療方法である。<sup>4</sup> 脳血行再建術には直接血行再建術、間接血行再建術、および両者を同時に行う複合血行再建術が含まれる。浅側頭動脈-中大脳動脈吻合術（STA-MCAバイパス）に代表される直接血行再建術は、術直後から脳循環不全を改善する効果があり、もやもや病をはじめとする閉塞性脳血管障害に広く実施されている。<sup>6-9</sup> 一方、間接血行再建術は硬膜弁や側頭筋弁、骨膜弁を脳表に接着させることで、これらの栄養血管から脳への血管新生を促す術式である。<sup>10-20</sup> 間接血行再建術後に生じる血管新生は、経硬膜吻合と同様にもやもや病に特異的な現象で、その他の閉塞性脳血管障害では起こり得ないことが知られている。現在に至るまで、間接血行再建術として様々な術式が実施されてきた。その中でも、硬膜、浅側頭動脈を脳表に接着させ血管新生を促すencephalo-duro-arterio-synangiosis (EDAS)、側頭筋を脳表に接着させるencephalo-myo-synangiosis (EMS)、硬膜、浅側頭動脈、側頭筋を脳表に接着させるencephalo-duro-arterio-myo-synangiosis (EDAMS)が広く行われ、その有効性が報告されてきた。<sup>17-20</sup> 一方、これらの間接血行再建術においては、血管新生が生じる範囲が開頭範囲に依存するという問題点がある。例えば、EDASやEMSでは脳表に接着させることのできる硬膜や側頭筋の面積に限りがあるため、側副血行路が形成される範囲は側頭葉が中心となる。もやもや病では前頭葉において脳循環不全が最も生じやすいが、これらの間接血行再建術では前頭葉の脳循環不全を十分に改善させることができない。また大脳半球の内側部、すなわち前大脳動脈領域への側副血行路形成も不十分である。さらに過去の研究により、「小さな開頭」が小児もやもや病患者における知的予後不良の独立した予測因子であることが報告されている。<sup>21</sup> こ

うした背景から、われわれは長きにわたり encephalo-duro-myo-arterio-pericranial-synangiosis (EDMAPS) を実施してきた。これは、上記の硬膜、側頭筋等の組織に加え、前頭部の骨膜を新たなドナーとして採用した方法である。EDAS や EMS、EDAMS 等の術式と比較し前頭部に大きく拡大した開頭を設け、前頭部骨膜で前頭葉の大きな範囲を覆うことができる。さらに大脳半球の内側部に対しても硬膜を用いた間接血行再建が施せるため、これまで課題であった前頭葉や前大脳動脈領域の脳循環不全に対応することができる (図 1)。<sup>15</sup> 近年、われわれのグループが STA-MCA バイパス術に EDMAPS を組み合わせた複合血行再建術の長期成績を報告したが、平均 10.5 年の追跡期間における脳卒中イベントは 0.10%/人・年と非常に優れた成績であった。<sup>16</sup> このようにもやもや病における特異的な血管新生の臨床的有意性はよく知られている一方、経硬膜吻合や間接血行再建術による血管新生のメカニズムそのものはいまだ明らかとなっていない。

図 1. 各種間接血行再建術における開頭範囲の比較



Comparison of the craniotomy area in each indirect bypass surgery.  
 The craniotomy in encephalo-duro-synangiosis (EDAS) and encephalo-myo-synangiosis (EMS) is limited to a small area. On the other hand, encephalo-duro-myo-arterio-pericranial-synangiosis (EDMAPS) allows for a large craniotomy covering frontal lobe adequately.

上述の通り、もやもや病では内頸動脈系の慢性進行性の狭窄により脳循環不全が生じる。もやもや血管が拡張・伸長することにより脳虚血を代償する一方、血行力学的負荷によりやがてもやもや血管が破綻し、頭蓋内出血を引き起こすと考えられている。<sup>4,22</sup> これまで長きにわたりもやもや血管の由来は大脳基底核を栄養する穿通枝と考えられてきたが、近年の研

究によりその起源はレンズ核線状体動脈、視床穿通枝、脈絡叢動脈の3つに大別されることが明らかとなった。<sup>23,24</sup> このうち、脈絡叢動脈を起源とするもやもや血管の発達が頭蓋内出血の発症と大きく関わることをわが国におけるランダム化比較試験で示された。<sup>25,26</sup> 一方で、もやもや病に対する脳血行再建術はもやもや血管を消退させ得ることが知られている。<sup>13,14,27</sup> これらのことから、もやもや病における頭蓋内出血の予防において、脳血行再建術によりもやもや血管を消退させることの重要性が再度認識されつつある。

上述の間接血行再建術後の血管新生は、小児患者ではほぼ全例でみられるが、成人患者ではわずか40-50%の患者でしか生じないことが知られている。<sup>14,28</sup> このことは臨床的に非常に重要な点であるが、そのメカニズムはいまだ明らかとなっていない。また上述のように、小児と成人では発症様式にも差があるため、もやもや病診療においては両者を明確に区別する必要があることはよく知られている。一方、成人患者の中には、小児期のTIAやてんかん発作等、脳虚血を疑わせるエピソードを有しながらも、症状が軽度であったためもやもや病と診断されずに幼少期を過ごし、成人になり初めてもやもや病と診断される症例が少なからず存在する。このような場合、成長するにつれて発作は徐々に消失することが知られているが、中には成人になってから脳梗塞やTIA、頭蓋内出血を起こす症例も存在する。また、脳循環不全やもやもや血管への血行力学的負荷が長期にわたり持続するため、罹病期間が長くなると将来の生活に悪影響を及ぼす可能性がある。しかし、小児期に発症した成人もやもや病が、成人期に発症したもやもや病と比較して特徴的な臨床症状を示すか否か、また両者では間接血行再建術を介した血管新生の発達に差があるか否かを明らかにした報告はない。

以上より、私はもやもや病における脳血行再建術後の血管新生が臨床像や転帰に与える影響を明らかにするとともに、もやもや病に特異的な経硬膜吻合および間接血行再建術後の血管新生のメカニズムを明らかにすることを目的として以下の3つの研究を計画した。まず、もやもや病に対する脳血行再建術後の放射線学的所見、特に頭蓋内出血の原因と認識されているもやもや血管の変化を評価した。特に、脳血行再建術後の側副血行の発達度ともやもや血管の消退の関連性を解析した。<sup>29</sup> 続いて、成人もやもや病を小児期に虚血エピソードを有する「小児期発症群」と、そうでない「成人期発症群」に分類し、それぞれにおける臨床像やもやもや血管の発達度、経硬膜吻合の発達度、脳血行再建術後の側副血行路の発達度を比較した。<sup>30</sup> さらに、もやもや病における経硬膜吻合や間接血行再建術後の血管新生におけるメカニズムを明らかにすべく、もやもや病患者のくも膜を術中に採取し病理組織学的検討を行った。これによりもやもや病に特異的な血管新生に寄与する生物学的変化の有無を検証した。<sup>31</sup>

なお、本学位論文は、学術雑誌にて公表された原著論文を基礎として作成したものである。

## 2. 対象と方法

本研究では、全てのもやもや病患者は厚生労働省もやもや病研究班によるもやもや病ガイドラインに沿って診断した。<sup>32</sup>

### 2-1 もやもや病における脳血行再建術後のもやもや血管の変化

#### 対象

2013年から2019年に当院を受診したもやもや病患者を対象とした。このうち、脳梗塞やTIA、頭蓋内出血、てんかん等で発症した症候性の患者で、かつ脳血流SPECTにて安静時脳血流およびアセタゾラミドに対する脳血管反応性が低下した患者に対して脳血行再建術を実施した。このうち、以下の条件を満たした患者を解析対象とした。1) MRIにて脳実質の損傷がない、もしくはごくわずかである。2) STA-MCAバイパスおよびencephalo-duro-my-arterio-pericranial synangiosis (EDMAPS)を実施した。3) 術前および術後3~6ヶ月に脳血管撮影を実施した。また、診療録から患者の年齢、性別、基礎疾患、発症様式(脳梗塞、TIA、頭蓋内出血、無症候、その他)、画像検査所見(脳血管撮影、MRI)に関する情報を入手した。

#### 手術方法

全ての患者に対してSTA-MCAおよびEDMAPSを実施した。前方に大きく拡大した前頭側頭開頭を行い、STAの分枝を1本または2本使用しSTA-MCAバイパスを実施した。その後、脳表を側頭筋、硬膜、骨膜で被覆した。詳細は既報の通りである。<sup>15,16,33</sup>

#### 脳血管撮影所見の評価

術前および術後3~6ヶ月の時点で脳血管撮影を行い、以下の項目を評価した。

1) 病期：鈴木分類に沿って以下のように病期を以下の6段階に分類した。<sup>3,34</sup> 術前および術後3~6ヶ月にそれぞれ評価した。

Stage 1 : Carotid fork 狭小期

Stage 2 : Moyamoya 初発期 (脳内主幹動脈が拡張し、もやもや血管がわずかに認められる)

Stage 3 : Moyamoya 増勢期 (中および前大脳動脈が脱落し、もやもや血管が太くなる)

Stage 4 : Moyamoya 細微期 (後大脳動脈が脱落し、もやもや血管の1本1本が細くなる)

Stage 5 : Moyamoya 縮小期 (内頸動脈系の全脳主幹動脈が消失し、もやもや血管も縮小する。外頸動脈系の側副血行路が増加してくる)



Stage 6 : Moyamoya 消失期 (もやもや血管が消失し、外頸動脈および椎骨脳底動脈系からのみ脳血流が保全される)

- 2) もやもや血管 : 以下のように、もやもや血管をその起源により **lenticulostriate channel**、**thalamic channel**、**choroidal channel** に分類し、それぞれに対してその発達の程度により以下の 3 段階に分類した。<sup>24,25</sup> 手術を受けた患者では、これらを術前および術後 3~6 ヶ月にそれぞれ評価した。

**Lenticulostriate channel:** レンズ核線状体動脈を起源とする

Grade 0 : 拡張・進展していない

Grade 1 : 拡張・進展しているが、脳梁周囲動脈の高さを超えない

Grade 2 : 拡張・進展し、脳梁周囲動脈の高さを超える

**Thalamic channel:** 視床穿通動脈、視床膝状体動脈等の視床穿通枝を起源とする

Grade 0 : 拡張・進展していない

Grade 1 : 拡張・進展しているが、内側後脈絡叢動脈の高さを超えない

Grade 2 : 拡張・進展し、内側後脈絡叢動脈の高さを超える

**Choroidal channel:** 前および後脈絡叢動脈を起源とする

Grade 0 : 拡張・進展していない

Grade 1 : 拡張・進展しているが、側脳室の高さを超えない

Grade 2 : 拡張・進展し、側脳室の高さを超える

それぞれ代表症例を **図 2** に示す。

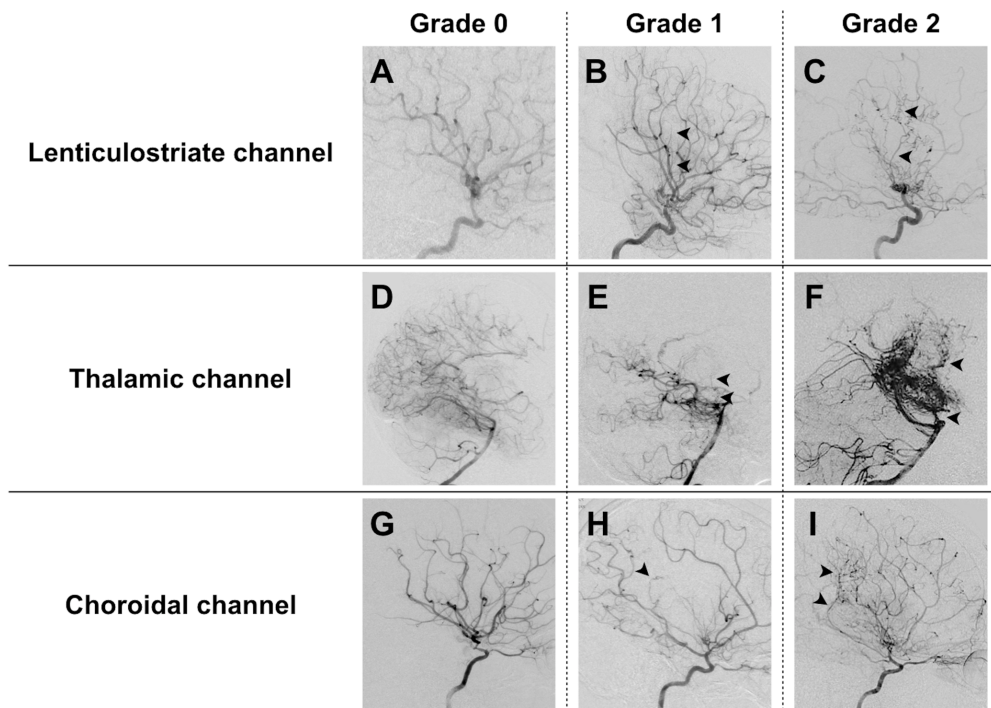
- 3) 脳血行再建術後の側副血行路の評価 : 脳血行再建術後 3~6 ヶ月の時点で脳血管撮影を行い、手術による側副血行路の発達の程度を以下の 3 段階に分類した。<sup>35</sup>

Grade A : 中大脳動脈領域の 1/3 以下を灌流する

Grade B : 中大脳動脈領域の 1/3 以上、2/3 以下を灌流する

Grade C : 中大脳動脈領域の 2/3 以上を灌流する

図 2. もやもや血管の分類



Classification and grading of moyamoya vessels.

These panels show representative findings of the lenticulostriate channel, thalamic channel, and choroidal channel on cerebral angiography. They were categorized into three grades according to previous report (*see the text*).

#### 脳血行再建術後の病期・もやもや血管の変化

脳血行再建術前・術後 3～6 ヶ月の脳血管撮影所見を比較し、病期・もやもや血管の発達の変化を解析した。

#### Choroidal channel の消退と脳血行再建術後の側副血行路の発達との関係

頭蓋内出血の発生に大きく影響を与える choroidal channel の術後変化と側副血行路の発達との関係性を評価した。本研究では、choroidal channel が術後に Grade 2 から Grade 0 または Grade 1 に変化した場合を「choroidal channel の消退」と定義した。

#### 発症様式ともやもや血管の発達の関係

虚血（TIA または脳梗塞）発症患者と頭蓋内出血発症患者における、3 種類のもやもや血管（lenticulostriate channel、thalamic channel、choroidal channel）の発達の程度を比較した。

## 統計解析

連続変数は平均±標準偏差で表した。得られたデータは chi-square test または Mann-Whitney's U test で比較した。もやもや血管の評価における判定者内一致 (intrarater agreement) および判定者間一致 (interrater agreement) は  $\kappa$  係数を用いて評価した。P<0.05 の場合、統計学的に有意であると定義した。

## 2-2 小児期発症成人もやもや病における放射線学的・臨床的特徴

### 対象

2013 年から 2018 年に当院を受診した成人もやもや病患者を対象とした。診療録から患者の年齢、性別、基礎疾患、発症様式 (脳梗塞、TIA、頭蓋内出血、無症候、その他)、画像検査所見 (脳血管撮影、MRI) に関する情報を入手した。このうち、小児期の脳虚血によるものと思われる脱力発作や言語障害、感覚障害、てんかん、不随意運動のエピソードの有無を聴取した。小児期のエピソードを有する症例を「小児期発症」、その他を「成人期発症」と定義した。

### 手術方法

脳梗塞や TIA、頭蓋内出血、てんかん等で発症した症候性の患者のうち、脳血流 SPECT にて安静時脳血流およびアセタゾラミドに対する脳血管反応性が低下した患者に対して脳血行再建術を実施した。手術方法は、2-1 に記載した通りである。

### 脳血管撮影所見の評価

全ての患者で脳血管撮影を行った。また手術を受けた患者においては術後 3~6 ヶ月の時点でも脳血管撮影を行った。2-1 に記載した項目に加え、以下を評価した。

- ・後大脳動脈病変：後大脳動脈病変の程度を、その狭窄度により以下の 3 段階に分類した。

36,37

Grade 0：狭窄病変がない

Grade 1：狭窄している

Grade 2：閉塞している

- ・ Vault moyamoya : vault moyamoya は、過去の報告をもとに頭蓋骨円蓋部において中硬膜動脈や後頭動脈等の外頸動脈系から脳表へ吻合する経硬膜吻合と定義し、「有」「無」の2段階で評価した。

### 小児期発症および成人期発症成人もやもや病の臨床的・放射線学的特徴

対象患者を小児期発症群と成人期発症群に分類し、それぞれの年齢、性別、発症様式を比較した。また、両群において脳血管撮影所見を比較した。手術を実施した患者では、脳血行再建術後の側副血行路の発達度を比較した。

### 間接血行再建術を介した側副血行路の発達

小児期発症群と成人期発症群の間で、間接血行再建を介した側副血行路の発達度に差があるかを検証した。発達度の評価には 2-1 に示した方法を用いた。

後大脳動脈病変：後大脳動脈病変の程度を、その狭窄度により以下の3段階に分類した。<sup>36,37</sup>

Grade 0：狭窄病変がない

Grade 1：狭窄している

Grade 2：閉塞している

### 小児期発症が頭蓋内出血に与える影響

頭蓋内出血の発症に影響する臨床像・放射線学的特徴を解析した。

### 統計解析

連続変数は平均±標準偏差で表した。小児期発症群および成人期発症群における差は chi-square test または t-test を用いて解析した。また、脳血行再建術後の側副血行路の発達、頭蓋内出血での発症に対する予測因子を抽出する目的で多重ロジスティック回帰分析を実施した。その際、単変量解析にて  $P < 0.20$  の変数を用いて多変量解析を実施した。 $P < 0.05$  の場合、統計学的に有意であると定義した。

## 2-3 もやもや病患者くも膜の免疫組織学的評価

### 対象

2016年から2019年に当院にて脳血行再建術を実施したもやもや病患者を対象とした。また対照群として、同時期に脳血行再建術を実施した動脈硬化性頭蓋内動脈狭窄患者を登録した。診療録から患者の年齢、性別、基礎疾患、発症様式（脳梗塞、TIA、頭蓋内出血、無症候、その他）、画像検査所見（脳血管撮影）に関する情報を入手した。

## 手術方法

もやもや病患者に対しては STA-MCA バイパスおよび EDMAPS を実施した。手術方法は 2-1 に記載した通りである。また、対照群に対しては STA-MCA バイパス術を実施した。

## くも膜・脳脊髄液検体の採取

もやもや病患者、対照群に対して、術中にシルビウス裂近傍から 20~40mm<sup>2</sup> のくも膜検体を手術顕微鏡下に採取し、直ちに 4%パラホルムアルデヒドにて固定した。またくも膜の採取と同時に、2.5mL のシリンジにてくも膜下腔から緩徐に 1~2mL の脳脊髄液を血液が混入しないよう採取した。採取した脳脊髄液は 0.5mL に分注し、測定直前まで-80°Cで保存した。

## くも膜に対する免疫染色

4%パラホルムアルデヒドで固定したくも膜をパラフィン包埋し、3 $\mu$ m の切片を作成した。各切片を脱パラフィンし、加圧ポットで 2 分間加熱した。免疫染色として、platelet-derived growth factor receptor- $\alpha$  (PDGFR $\alpha$ 、100 倍、SC-398206、Santa Cruz、USA)、PDGFR $\beta$  (100 倍、ab5511、Abcam、UK)、 $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA、200 倍、ab32575、Abcam、UK) に対する一次抗体を 24°Cにて 40 分間適用し、DAKO Envision+ Kit (DAKO Cytomation)を 60 分間塗布した。その後、DAB substitute kit (DAKO Cytomation) を 3 分間塗布しヘマトキシリンで対比染色を行った。くも膜は inner arachnoid reticular layer および outer mesothelial layer の 2 層で構成される。本研究ではこのうち前者において陽性細胞のカウントを実施した。各切片において、50 $\times$ 200 $\mu$ m の範囲をランダムに 3 ヶ所選択し、その範囲内の陽性細胞数を手動でカウントした。3 つの範囲における陽性細胞数の平均値を算出し、これをその切片における陽性細胞数 (cell/field) と定義した。また、くも膜におけるコラーゲンの密度を算出するために、Sirius Red 染色を実施した。画像解析ソフトウェア (ImageJ、1.48v、National Institutes of Health、USA) を用いて、くも膜の面積に対するコラーゲンの面積の割合を算出した。全ての切片の評価は All-in One Microscope (BZ9000、Keyence Co.、Osaka、Japan) を用いて実施した。

## 脳脊髄液のサイトカイン濃度の測定

術中に採取した脳脊髄液に対し、市販の Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Quantikine、DFB50、DHG00B、DB100B、DHD00C、DBB00、R&D Systems Minneapolis、MN、USA) を用いて各種サイトカイン濃度を測定した。Basic fibroblast growth factor (bFGF)、

hepatocyte growth factor (HGF)、transforming growth factor  $\beta$ -1 (TGF- $\beta$ 1)、PDGF-AA、PDGF-BB の濃度を、添付の指示書に沿って測定した。

### $\alpha$ SMA 陽性細胞数に影響する因子の解析

もやもや病群において、背景因子、放射線学的所見のうち  $\alpha$ SMA 陽性細胞数に影響を与える因子を統計学的に解析した。

### 統計解析

連続変数は平均 $\pm$ 標準偏差で表した。得られたデータは t-test、chi-square test で解析した。また、くも膜の免疫染色における陽性細胞数、コラーゲン密度、脳脊髄液中のサイトカイン濃度の比較には、Wilcoxon 検定を用いた。 $\alpha$ SMA 陽性細胞数に影響する変数を明らかにするために、重回帰分析を実施した。

## 3. 結果

### 3-1 もやもや病における脳血行再建術後のもやもや血管の変化

STA-MCA バイパスおよび EDMAPS を実施した 61 人 92 半球を登録した。うち、17 人は小児 (18 歳以下)、44 人が成人であった。平均年齢は、小児  $9.6\pm 3.8$  歳、成人  $41.4\pm 11.6$  歳、男性 24 人、女性 37 人であった。小児患者の発症様式は、TIA 13 人 (76.5%)、脳梗塞 3 人 (17.6%)、頭痛 1 人 (5.9%) であった。成人では TIA 21 人 (47.7%)、脳梗塞 12 人 (27.3%)、頭蓋内出血 10 人 (22.7%) てんかん 1 人 (2.3%) であった。ベースラインのデータは表 1 に示した。

### 転帰

術後の平均フォローアップ期間は小児、成人でそれぞれ  $54.9\pm 19.7$  および  $40.2\pm 25.5$  ヶ月であった。術後過灌流症候群は 10 半球 (10.9%) で発生したが、術後 2 週間以内に軽快した。TIA は 4 人を除いた全ての患者で術後直ちに消失した。3 人では徐々に頻度が減少し、1 年以内に消失した。その他の成人患者 1 人では、新たに後大脳動脈に内腔 50%以上の狭窄病変が出現したため、術後 1 年間 TIA を繰り返した。このため、後頭動脈-後大脳動脈バイパスおよび後頭葉に対する間接バイパスを追加した。これにより TIA は消失した。フォローアップ期間中、脳梗塞や頭蓋内出血は生じなかった。

表 1. 小児および成人患者における臨床的データ

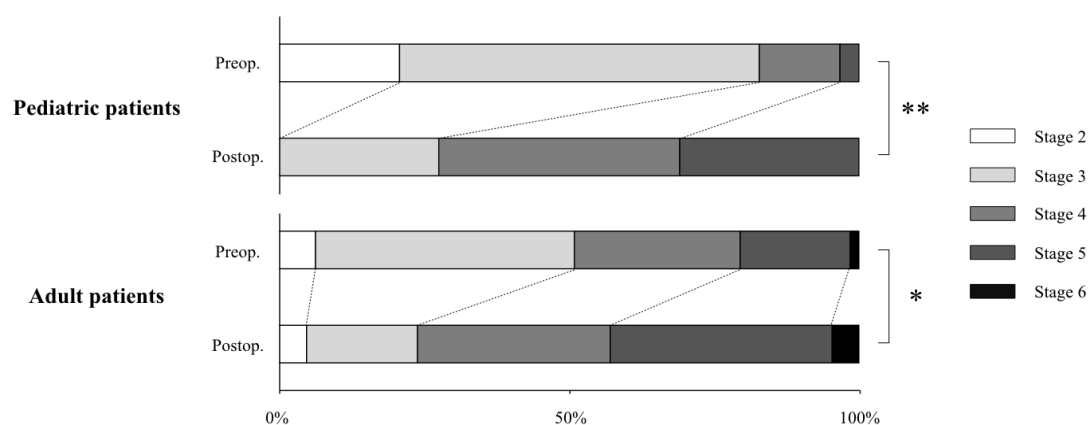
	Children	Adults
Number of patients	17	44
Number of hemispheres	29	63
Age (mean ± SD)	9.6±3.8	41.4±11.6
Female sex	6 (35.3%)	31 (70.5%)
Onset type		
Intracranial hemorrhage	0	10 (22.7%)
Cerebral infarction	3 (17.6%)	12 (27.3%)
TIA	13 (76.5%)	21 (47.7%)
Seizure	0	1 (2.3%)
Headache	1 (5.9%)	0

TIA, transient ischemic attack

脳血管再建術後の病期・もやもや血管の変化

図 3 に術後の病期の変化を示す。脳血管再建術に伴い、小児、成人の両群において病期が有意に進行した（それぞれ  $P < 0.001$ 、 $P = 0.042$ ）。

図 3. 術前後の病期の変化



Change in disease stage before and after surgery.

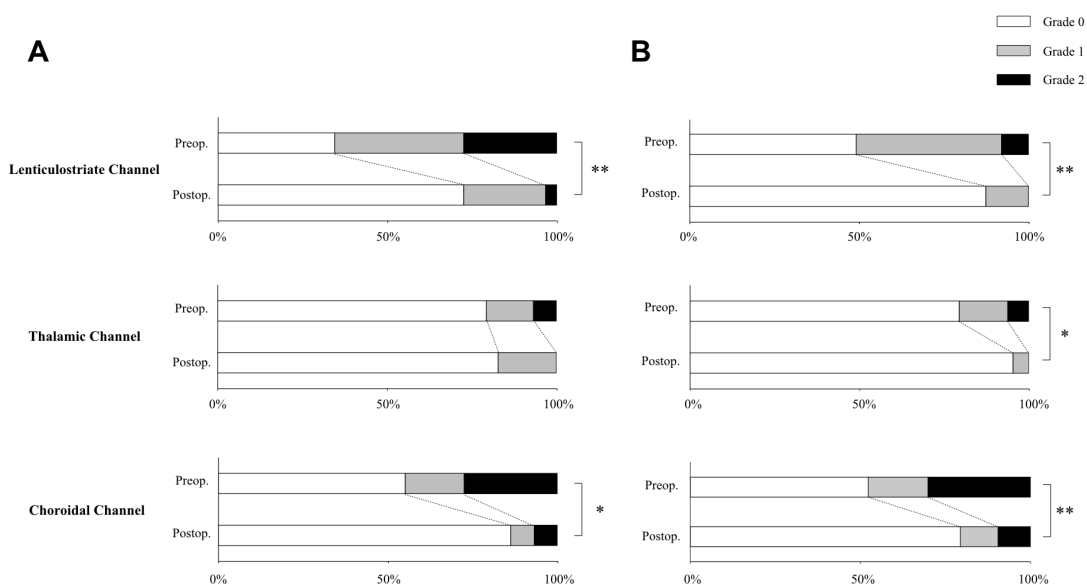
The bar graphs show the pre- and postoperative Suzuki's angiographical stage in pediatric and adult patients. Postoperative Suzuki's angiographical stage significantly advanced in both pediatric and adult patients ( $P < 0.001$  and  $P = 0.042$ , respectively). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

次に、術前後のもやもや血管の発達度を比較した。まず、もやもや血管の発達度の評価における判定者内一致 (intrarater agreement) および判定者間一致度 (interrater agreement) を  $\kappa$  係数を用いて算出した。その結果、 $\kappa$  係数は判定者内では 0.86、判定者間では 0.91 と非常に高い一致率を示した。

図 4A は小児における術前後のもやもや血管の発達度を示している。小児においては lenticulostriate channel が最も発達しており、術前 60%以上の大脳半球で Grade 1 または Grade 2 と判定された。脳血管再建術後は、lenticulostriate および choroidal channel において発達度が有意に低下した (それぞれ  $P<0.001$ 、 $P=0.034$ )。

成人における術前後のもやもや血管の発達度は図 4B に示した。成人では choroidal channel の発達が最も著しく、術前に約 1/3 の大脳半球で Grade 2 と判定された。脳血管再建術後の脳血管撮影では、lenticulostriate, thalamic, および choroidal channel の全てが有意に消退していた (それぞれ  $P<0.001$ 、 $P=0.012$ 、 $P=0.004$ )。

図 4. 術前後のもやもや血管の変化



#### Change in moyamoya vessels before and after surgery.

The bar graphs show the pre- and postoperative extent of lenticulostriate, thalamic, and choroidal channels in pediatric patients (A) and adult patients (B). In pediatric patients, lenticulostriate and choroidal channels significantly regressed after STA-MCA anastomosis and EDMAPS ( $P<0.001$  and  $P=0.034$ , respectively). In adult patients, all of lenticulostriate, thalamic, and choroidal channels significantly regressed after surgery ( $P<0.001$ ,  $P=0.012$ , and  $P<0.001$ , respectively). \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$



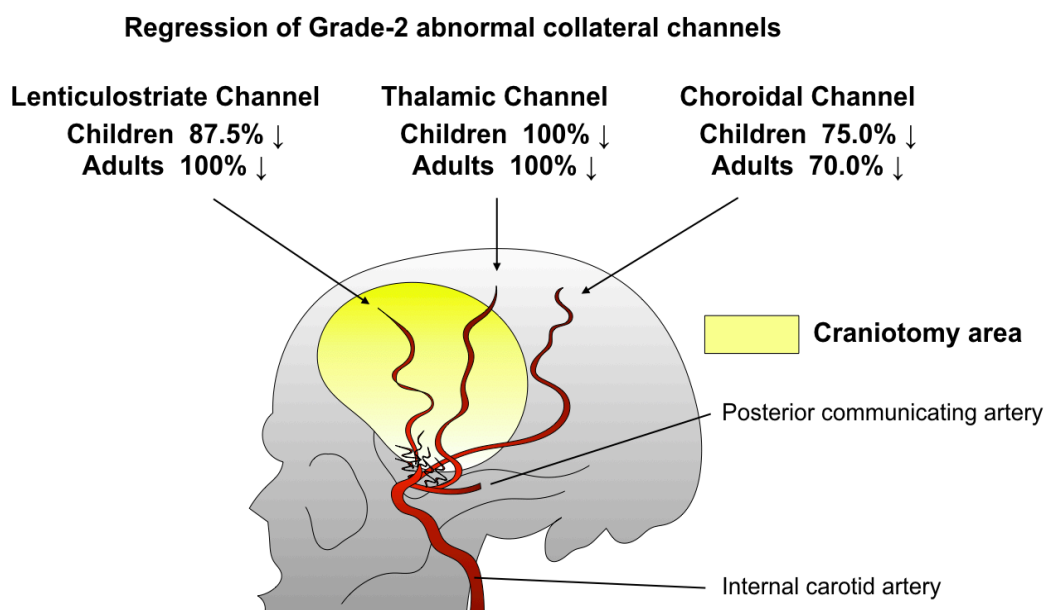
小児では、87.5%の Grade-2 lenticulostriate channel、全ての Grade-2 thalamic channel、そして75.0%の choroidal channel が術後に消退した。同様に成人では全ての lenticulostriate および thalamic channel、70.0%の choroidal channel が術後に消退した（図5）。

代表症例として、29歳男性の術前および術後の脳血管撮影像を図6に示す。

#### 複合血行再建術を介した側副血行路の発達

小児では、29半球中、25半球（86.2%）が Grade A、2半球（6.9%）が Grade B、2半球（6.9%）が Grade Cであった。成人では、63半球中44半球（69.8%）が Grade A、14半球（22.2%）が Grade B、5半球（7.9%）が Grade Cであった。

図5. Grade-2 もやもや血管の消退率

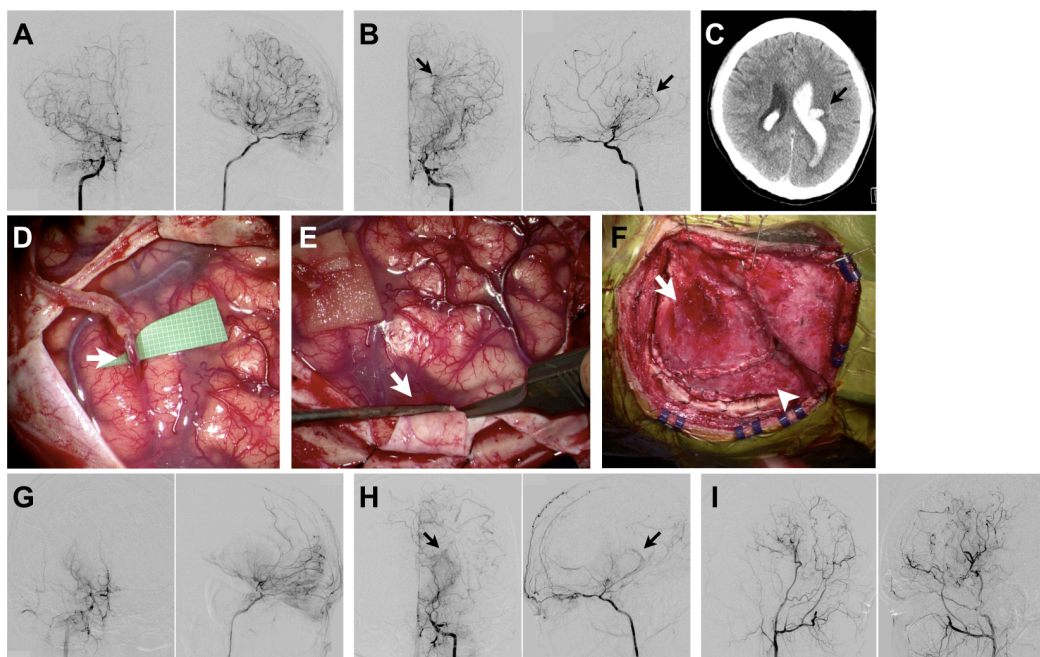


The relationship between the regression of moyamoya vessels and the area of craniotomy.

The illustration demonstrates the relationship between each abnormal collateral channel and the extent of craniotomy for STA-MCA anastomosis and EDMAPS. Values demonstrate the percentage of postoperative regression of Grade-2 abnormal collateral channels. In pediatric patients, 87.5% of the Grade-2 lenticulostriate channels, all of the Grade-2 thalamic channels, and 75.0% of the Grade-2 choroidal channels regressed to Grade 0 or 1 after surgery. In adult patients, all of the Grade-2

lenticulostriate and thalamic channels and 70.0% of the Grade-2 choroidal channels regressed to Grade 0 or 1. Note that a majority of choroidal channel outside the extent of craniotomy significantly diminished after surgery in both pediatric and adult patients.

図 6. 代表症例における放射線学のおよび術中所見



Pre- and postoperative radiological findings and intraoperative findings in a 29-year-old male emerged with intracerebral hemorrhage.

A) The preoperative right internal carotid angiography demonstrated marked stenosis of the carotid fork, judged as Stage 4. The extent of lenticulostriate, thalamic, and choroidal channels was judged as Grade 1, Grade 0, and Grade 1, respectively.

B) The preoperative left internal carotid angiography demonstrated marked stenosis of the carotid fork associated with well-developed moyamoya vessels, judged as Stage 3. The extent of lenticulostriate, thalamic, and choroidal channels was judged as Grade 1, Grade 0, and Grade 2 in the left hemisphere, respectively. Note the markedly dilated and extended choroidal channel (arrows).

C) Plain CT scan on admission showed intracerebral hemorrhage in the left periventricular white matter associated with intraventricular hemorrhage. Hemorrhagic source anatomically correlated very well with the choroidal channel on the left side (arrow).

D) The intraoperative photo of STA-MCA anastomosis and EDMAPS on the right side. The arrow shows frontal branch of STA that was anastomosed to central artery.

- E) The intraoperative photo shows that dural pedicle (arrow) is inserted into the subdural space to create indirect bypass.
- F) The intraoperative photo shows that the brain surface was covered with temporal muscle (arrow) and pericranial flap (arrowhead) to create indirect bypass.
- G) The postoperative right internal carotid angiography demonstrated that the extent of lenticulostriate and thalamic channels did not change, but choroidal channels regressed from Grade 1 to Grade 0.
- H) The postoperative left internal carotid angiogram demonstrated that disease stage advanced from Stage 3 to Stage 5. The extent of lenticulostriate and thalamic channels did not change, but choroidal channels markedly regressed from Grade 2 to Grade 0 (arrows).
- I) The postoperative right and left external carotid angiography (the right and left panel, respectively) revealed that surgical collaterals through direct and indirect bypass widely provide blood flow to the operated hemisphere.

#### Choroidal channel の消退と脳血管再建術後の側副血行路の発達との関係

術前の脳血管撮影において choroidal channel が Grade 2 と判定された 27 半球のうち、脳血管再建術後 3～6 ヶ月での脳血管撮影で Grade-2 choroidal channel が残存した半球は 8 半球であった。表 2 に示した通り、複合血行再建術を介した側副血行路の発達は、choroidal channel の消退と有意に関連していた。

表 2. 術後の側副血行路の発達と Grade-2 choroidal channel 消退の関係

	Regression of choroidal channel		P value
	Yes	No	
Development of surgical collaterals			
Grade A	19	3	<0.001
Grade B	0	5	
Grade C	0	0	

Values are presented as the number of hemispheres.

Choroidal channel was judged as "regressed" when Grade-2 choroidal channel changed to Grade 0 or 1 after surgery.

### 発症様式ともやもや血管の発達の関係

小児患者のうち頭蓋内出血で発症した患者は認めなかった。成人患者では 37 半球が虚血発症、10 半球が頭蓋内出血発症であった。虚血発症半球のうち、17 半球が lenticulostriate channel Grade 0、18 半球が Grade 1、2 半球が Grade 2 であった。また 33 半球が thalamic channel Grade 0、3 半球が Grade 1、1 半球が Grade 2 であった。Choroidal channel については 23 半球が Grade 0、7 半球が Grade 1、7 半球が Grade 2 であった。一方、頭蓋内出血発症半球のうち、lenticulostriate channel は 5 半球で Grade 0、4 半球で Grade 4、1 半球で Grade 2 であった。Thalamic channel は 6 半球で Grade 0、2 半球で Grade 1、2 半球で Grade 2 であった。Choroidal channel は 2 半球で Grade 0、2 半球で Grade 1、6 半球で Grade 2 であった。虚血発症半球と頭蓋内出血発症半球を比較すると、両群間で choroidal channel の発達に有意差がみられた ( $P=0.027$ ) が、lenticulostriate および thalamic channel の発達には有意差はなかった (それぞれ  $P=0.82$ 、 $P=0.10$ )。

### 3-2 小児期発症成人もやもや病における放射線学的・臨床的特徴

#### 小児期発症および成人期発症成人もやもや病の臨床的・放射線学的特徴

74 人 128 半球の成人もやもや病のうち、12 半球は入院時にすでに脳血管再建術を実施されていたため除外した。結果として、69 人 116 半球を対象とした。男性 24 人、女性 45 人で、平均年齢は  $41.4 \pm 10.9$  歳であった。発症様式は、TIA および脳梗塞が 44 人、頭蓋内出血が 16 人、無症候性が 9 人であった。患者本人またはその家族からの聴取に基づき、14 人 26 半球を小児期発症成人もやもや病と診断し、その他の 55 人 90 半球を成人期発症成人もやもや病と診断した。小児期発症患者における小児期のエピソードは、全例 TIA であった。小児期発症群は成人期発症群と比較し、年齢が有意に若かった (それぞれ  $34.0 \pm 6.2$  歳、 $43.3 \pm 11.1$  歳、 $t=-2.98$ 、 $df=67$ 、 $P<0.001$ )。性別には有意差はなかった ( $P=0.24$ )。頭蓋内出血での発症は小児期発症群で有意に多かった ( $57.1\%$  vs.  $14.5\%$ 、 $P=0.009$ )。患者背景は表 3 に示した。

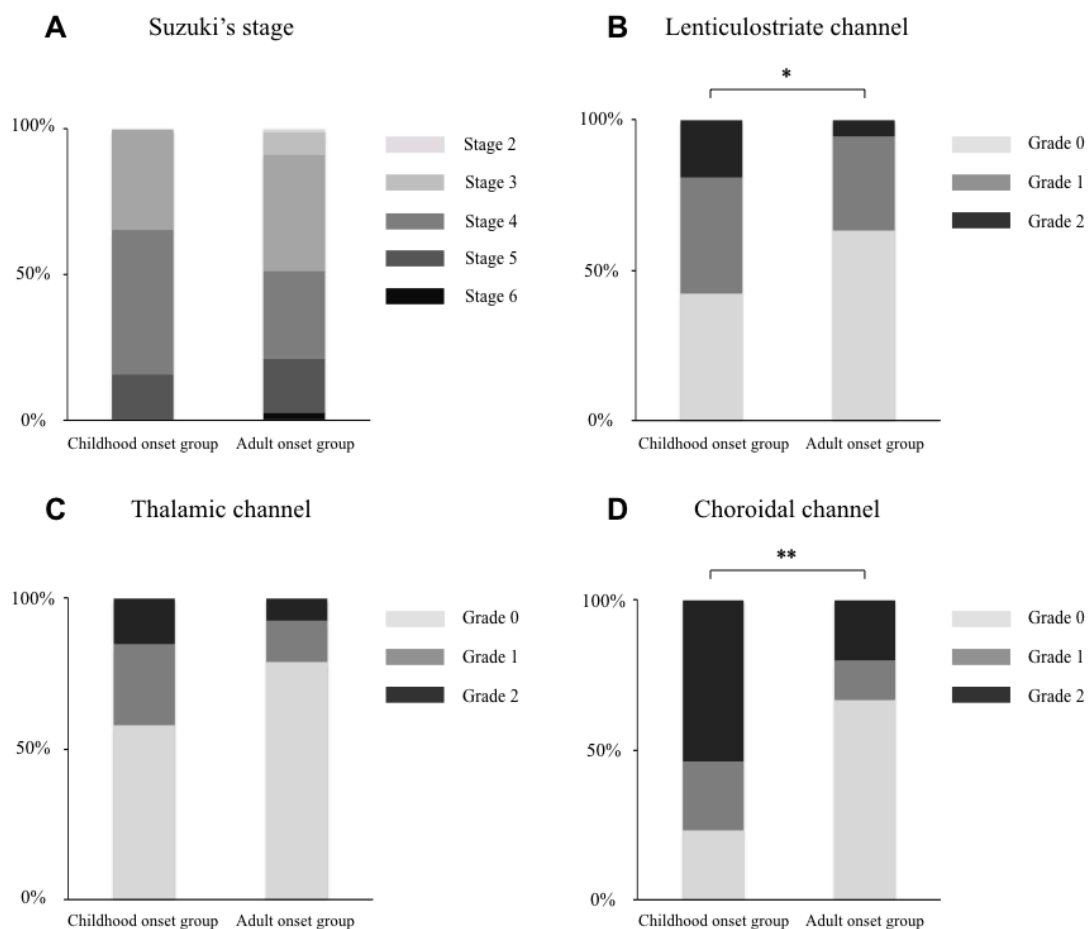
図 7A に示すように、病期においては両群間に有意な差はなかった ( $P=0.32$ )。Lenticulostriate channel は小児期発症群でより発達度が高かった ( $P=0.044$ 、図 7B)。Thalamic channel の発達度には両群間で有意な差はなかった ( $P=0.094$ 、図 7C)。Choroidal channel は lenticulostriate channel と同様に、小児期発症群で有意に発達度が高かった ( $P<0.001$ 、図 7D)。

表 3. 小児期発症および成人期発症成人もやもや病患者における臨床データ

	Childhood onset group	Adult onset group	P value
Number of patients	14	55	
Number of hemispheres	26	90	
Age (mean $\pm$ SD)	34.0 $\pm$ 6.2	43.3 $\pm$ 11.1	0.0002
Sex (male:female)	3:11	21:34	0.240
Onset type			0.0091
Ischemia	6	38	
Ischemic stroke	2	14	
TIA	4	24	
Intracranial hemorrhage	8	8	
Asymptomatic	0	9	

TIA, transient ischemic attack

図 7. 小児期および成人期発症群における病期およびもやもや血管の発達度



Comparison of disease stage and development of collateral channels between childhood onset group and adult onset group.

The bar graph demonstrates the Suzuki's angiographical stage and the development of collateral channels in the childhood onset group and the adult onset group. The degree of development of collateral channels is categorized into 3 grades (*see the text*). \*;  $P < 0.05$ , \*\*;  $P < 0.01$ .

(A) There is no significant difference between the two groups ( $P = 0.32$ , chi-square test).

(B) Lenticulostriate channel is more developed in the childhood onset group than in the adult onset group ( $P = 0.044$ , chi-square test).

(C) There is no significant difference in thalamic channel between the two groups ( $P = 0.094$ ).

(D) Choroidal channel is remarkably developed in the childhood onset group than in the adult onset group ( $P < 0.001$ ).

図 8A に示すように、後大脳動脈病変の進行度には両群間に差はなかった ( $P = 0.099$ )。Vault moyamoya の保有率は、小児期発症群でより高かった (88.5% vs 27.8%、 $P < 0.001$ 、図 8B)。間接血行再建術を介した側副血行路の発達

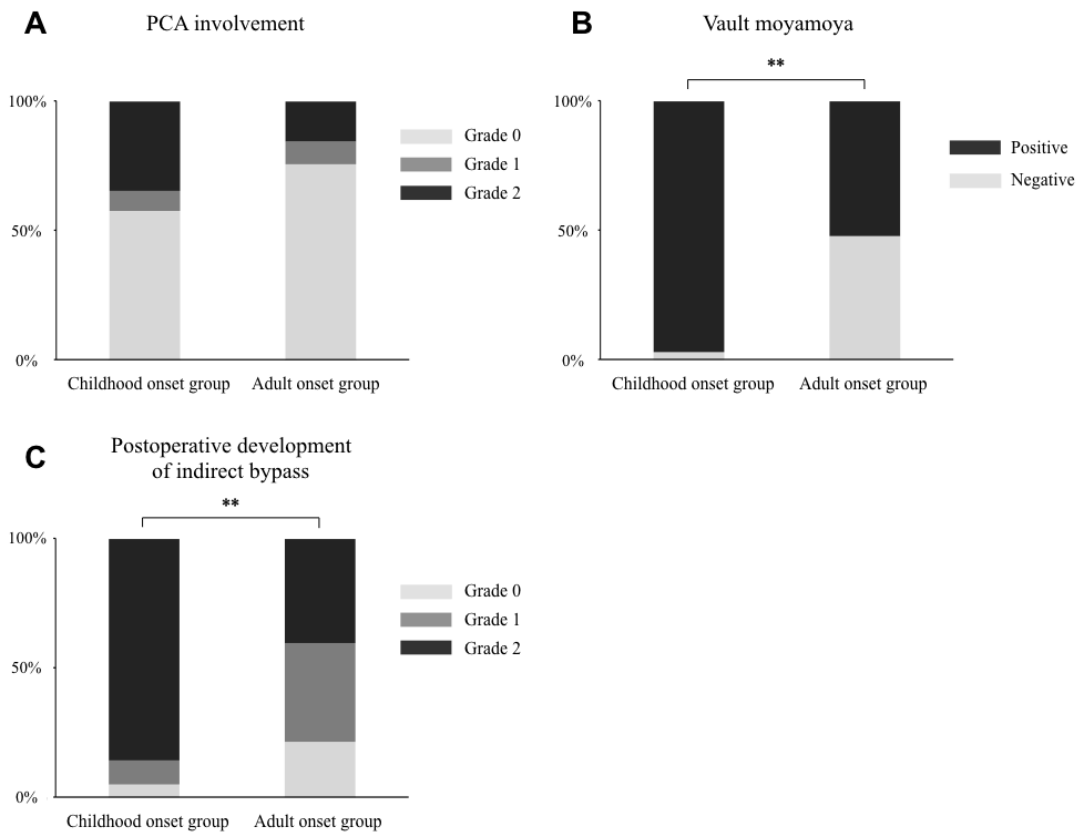
STA-MCA バイパスおよび EDMAPS を小児期発症群では 26 半球中 23 半球に、成人期発症群では 90 半球中 57 半球にそれぞれ実施した。このうち、小児期発症群 21 半球、成人期発症群 47 半球に対して術後 3~6 ヶ月に脳血管撮影を実施した。両群における間接血行再建を介した側副血行路の発達度は図 8C に示した。小児期発症群では、18 半球(85.7%)が Grade A、2 半球(9.5%)が Grade B、1 半球 (4.8%) が Grade C であった。一方、成人期発症群では、19 半球 (40.4%) が Grade A、18 半球 (38.3%) が Grade B、10 半球 (25.0%) Grade C であった。間接血行再建を介した側副血行路の発達度には両群間で有意な差がみられた ( $P = 0.002$ )。続いて、間接血行再建を介した側副血行路の発達 (Grade A および B) の予測因子を検討した。表 4 に示すように、単変量解析では、Grade-2 choroidal channel、vault moyamoya が存在することが予測因子として抽出されたが、多変量解析では予測因子は抽出されなかった。

#### 小児期発症が頭蓋内出血に与える影響

次に、頭蓋内出血に関連する因子を解析した。表 5 に示すように、単変量解析では小児期発症、Grade-2 thalamic channel、Grade-2 choroidal channel が有意な予測因子として抽出された。多変量解析の結果、小児期発症 (OR 4.31 [95% CI 1.21-15.4]、 $P = 0.025$ )、Grade-2 choroidal channel (OR 6.78 [95% CI 1.78-25.8]、 $P = 0.005$ ) が頭蓋内出血の予測因子であることが示され

た。

図 8. 小児期および成人期発症群における後大脳動脈病変、vault moyamoya、間接血行再  
建術後の血管新生



Comparison of degree of posterior cerebral artery involvement, prevalence of vault moyamoya, and degree of postoperative development of indirect bypass.

The bar graphs demonstrate the degree of posterior cerebral artery (PCA) involvement, prevalence of vault moyamoya, and the degree of postoperative development of indirect bypass in the childhood onset group and the adult onset group. The degree of PCA involvement and postoperative development of indirect bypass are categorized into 3 grades (*see the text*). \*\*; P<0.01.

(A) There is no significant difference in degree of PCA involvement between the two groups (P=0.099, chi-square test).

(B) The proportion of presence of vault moyamoya is much higher in the childhood onset group than in the adult onset group (P<0.001).

表 4. 間接血行再建を介した側副血行路発達の予測因子

	Development of indirect bypass		Univariate analysis			Multivariate analysis		
	Yes	No	OR	95% CI	P value	OR	95% CI	P value
Number of hemispheres	57	11						
Age	39.1±1.6	39.5±3.6	1.00	0.95-1.06	0.90			
Female sex	45 (78.9)	6 (54.5)	3.13	0.81-12.0	0.097	2.80	0.62-12.7	0.18
Hemorrhagic onset	13 (22.8)	2 (18.2)	1.47	0.28-7.60	1.00			
Childhood onset group	20 (35.1)	1 (9.1)	5.41	0.64-45.3	0.15	1.38	0.097-19.7	0.81
Suzuki's angiographical stage (≥4)	31 (54.3)	4 (36.3)	0.48	0.13-1.82	0.33			
Lenticulostriate channel (Grade 2)	7 (12.3)	0	NA	NA	NA			
Thalamic channel (Grade 2)	9 (15.8)	0	NA	NA	NA			
Choroidal channel (Grade 2)	26 (45.6)	1 (9.1)	8.39	1.01-69.9	0.04	6.14	0.65-57.9	0.11
PCA involvement (Grade 1 and 2)	20 (35.1)	1 (9.1)	5.41	0.64-45.3	0.15	2.93	0.31-27.9	0.35
Vault moyamoya	30 (52.6)	2 (18.2)	5.00	0.99-25.2	0.05	2.86	0.37-22.0	0.31

Values are presented as the number of hemispheres (%).

OR, odds ratio; CI, confidence interval; PCA, posterior cerebral artery; NA, not applicable

表 5. 頭蓋内出血の予測因子

	Intracranial hemorrhage	Other onset type	Univariate analysis			Multivariate analysis		
			OR	95% CI	P value	OR	95% CI	P value
Number of hemispheres	18	98						
Age	40.8±11.6	41.2±11.1	1.00	0.95-1.04	0.89			
Female sex	14 (77.8)	63 (64.3)	1.94	0.59-6.36	0.42			
Childhood onset	10 (55.6)	16 (16.3)	6.41	2.19-18.7	<0.001	4.31	1.21-15.4	0.025
Suzuki's angiographical stage (≥4)	10 (55.6)	53 (54.1)	1.06	0.39-2.92	1.00			
Lenticulostriate channel (Grade 2)	3 (16.7)	7 (7.1)	2.60	0.60-11.2	0.19	0.99	0.15-6.66	0.99
Thalamic channel (Grade 2)	5 (27.8)	6 (6.1)	5.90	1.57-22.1	0.013	2.55	0.40-16.5	0.33
Choroidal channel (Grade 2)	13 (72.2)	19 (19.4)	10.8	3.43-34.0	<0.0001	6.78	1.78-25.8	0.005
PCA involvement (Grade 1 and 2)	7 (38.9)	20 (20.4)	2.48	0.85-7.22	0.13	0.63	0.13-2.98	0.56

Values are presented as the number of hemispheres (%).

OR, odds ratio; CI, confidence interval; PCA, posterior cerebral artery



### 3-3 もやもや病患者くも膜の免疫組織学的評価

STA-MCA バイパス術および EDMAPS を実施した 26 人のもやもや病患者を登録した。うち、5 人が小児患者、21 人が成人患者であった。小児患者の平均年齢は  $7.6 \pm 5.4$  歳、成人患者の平均年齢は  $46.0 \pm 2.6$  歳で、男性 10 人、女性 16 人であった。発症様式は TIA が 13 人、脳梗塞が 9 人、頭蓋内出血が 4 人であった。 $^{123}\text{I}$ -IMP SPECT では、全患者において脳血流量および脳血管反応性が低下していた。一方、本研究では STA-MCA バイパスを受けた 6 人の動脈硬化性頭蓋内動脈狭窄患者を対照群として登録した。平均年齢は  $67.8 \pm 8.1$  歳、全員が男性であった。患者背景を表 6 に示した。

表 6. 患者背景および放射線学的特徴

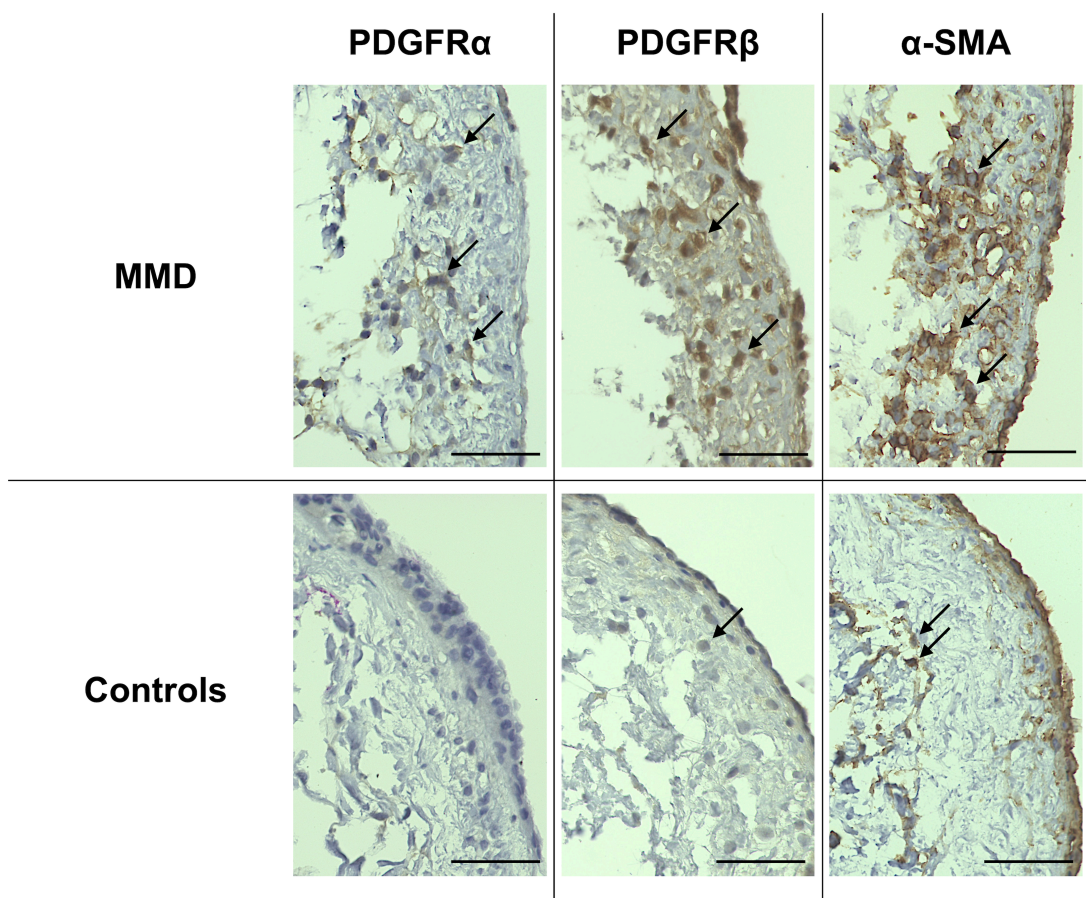
	MMD	Controls	P value
Number of patients	26	6	
Number of hemispheres	31	6	
Age	$38.6 \pm 19.5$	$67.8 \pm 8.1$	<0.01
Sex (male: female)	10:16	6:0	<0.01
Clinical diagnosis			<0.01
TIA	13 (50.0)	0	
Ischemic stroke	9 (34.6)	6 (100)	
Hemorrhagic stroke	4 (15.4)	0	
Suzuki's stage			NA
Stage 3	17 (54.8)	NA	
Stage 4	10 (32.3)	NA	
Stage 5	3 (9.7)	NA	
Stage 6	1 (3.2)	NA	
Steno-occlusive lesion			NA
ICA stenosis	NA	2 (33.3)	
ICA occlusion	NA	3 (50.0)	
MCA occlusion	NA	1 (16.7)	

MMD: moyamoya disease, TIA: transient ischemic attack, ICA: internal carotid artery, MCA middle cerebral artery, NA: not applicable

## くも膜の免疫組織学的所見

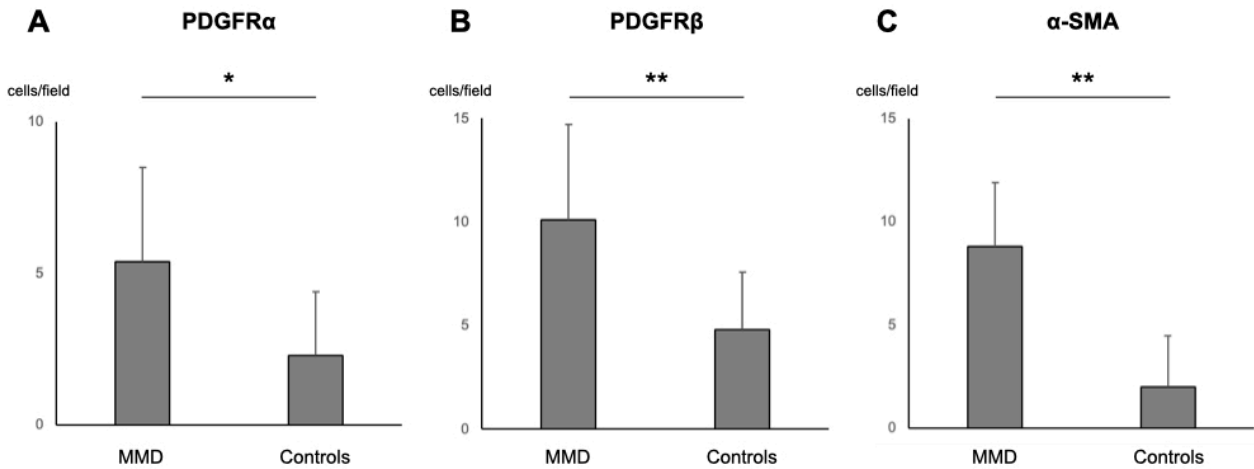
図9にPDGFR $\alpha$ 、PDGFR $\beta$ 、 $\alpha$ SMA染色の代表症例を示した。PDGFR $\alpha$ 陽性細胞は、対照群と比較し、もやもや病群で有意に多かった(5.4 $\pm$ 3.1 vs. 2.3 $\pm$ 2.1 cells/field、Z=-2.33、P=0.02、図10A)。同様に、PDGFR $\beta$ 陽性細胞もコントロールと比較し、もやもや病群で有意に多かった(10.1 $\pm$ 4.6 vs. 4.8 $\pm$ 2.8 cells/field、Z=-2.51、P=0.01、図10B)。さらに $\alpha$ SMA陽性細胞も、同じく対照群と比較し、もやもや病群で有意に多かった(8.8 $\pm$ 3.1 vs. 2.0 $\pm$ 2.5 cells/field、Z=-3.22、P<0.01、図10C)。

図9. くも膜の免疫組織学的所見



Photomicrographs of immunohistochemistry using primary antibodies against PDGFR $\alpha$  (*left*), PDGFR $\beta$  (*middle*), or  $\alpha$ -SMA (*right*) in MMD (*upper*) and the controls (*lower*). PDGFR $\alpha$ -, PDGFR $\beta$ -, and  $\alpha$ -SMA-positive cells were widely distributed in the inner layer of the arachnoid membrane in MMD (arrows), but their number was much smaller in the controls (arrows). Scale bar = 50  $\mu$ m.

図 10. くも膜の免疫染色における陽性細胞数



Number of positive cells for immunohistochemistry.

Bar graphs showing the number (/field) of PDGFR $\alpha$ - (A), PDGFR $\beta$ - (B), and  $\alpha$ -SMA-positive cells (C) in the inner layer of arachnoid membrane. Their numbers were significantly larger in moyamoya disease than in the controls. \*: P<0.05, \*\*: P<0.01

もやもや病群において、小児患者と成人患者の免疫染色陽性細胞数を比較した。その結果、PDGFR $\alpha$  陽性細胞数には両群間で有意差はみられなかった ( $4.7 \pm 2.3$  vs.  $5.8 \pm 3.1$  cells/field,  $Z = -0.81$ ,  $P = 0.42$ )。同様に PDGFR $\beta$  陽性細胞数にも両群間で有意な差はみられなかった ( $10.4 \pm 4.3$  vs.  $10.1 \pm 4.9$  cells/field,  $Z = -0.18$ ,  $P = 0.86$ )。さらに  $\alpha$ SMA 陽性細胞数にも有意な差はなかった ( $10.4 \pm 2.6$  vs.  $8.7 \pm 3.2$  cells/field,  $Z = 1.03$ ,  $P = 0.30$ )。

図 11 に PDGFR $\alpha$  および  $\alpha$ SMA に対する二重免疫染色所見を示した。もやもや病群では、PDGFR $\alpha$  陽性細胞の  $80.5 \pm 15.6\%$  が  $\alpha$ SMA 共陽性であった。一方、対照群では PDGFR $\alpha$  陽性細胞の  $14.6 \pm 7.2\%$  が  $\alpha$ SMA 共陽性であり、もやもや病群で共陽性細胞が有意に多くみられた ( $P < 0.01$ )。

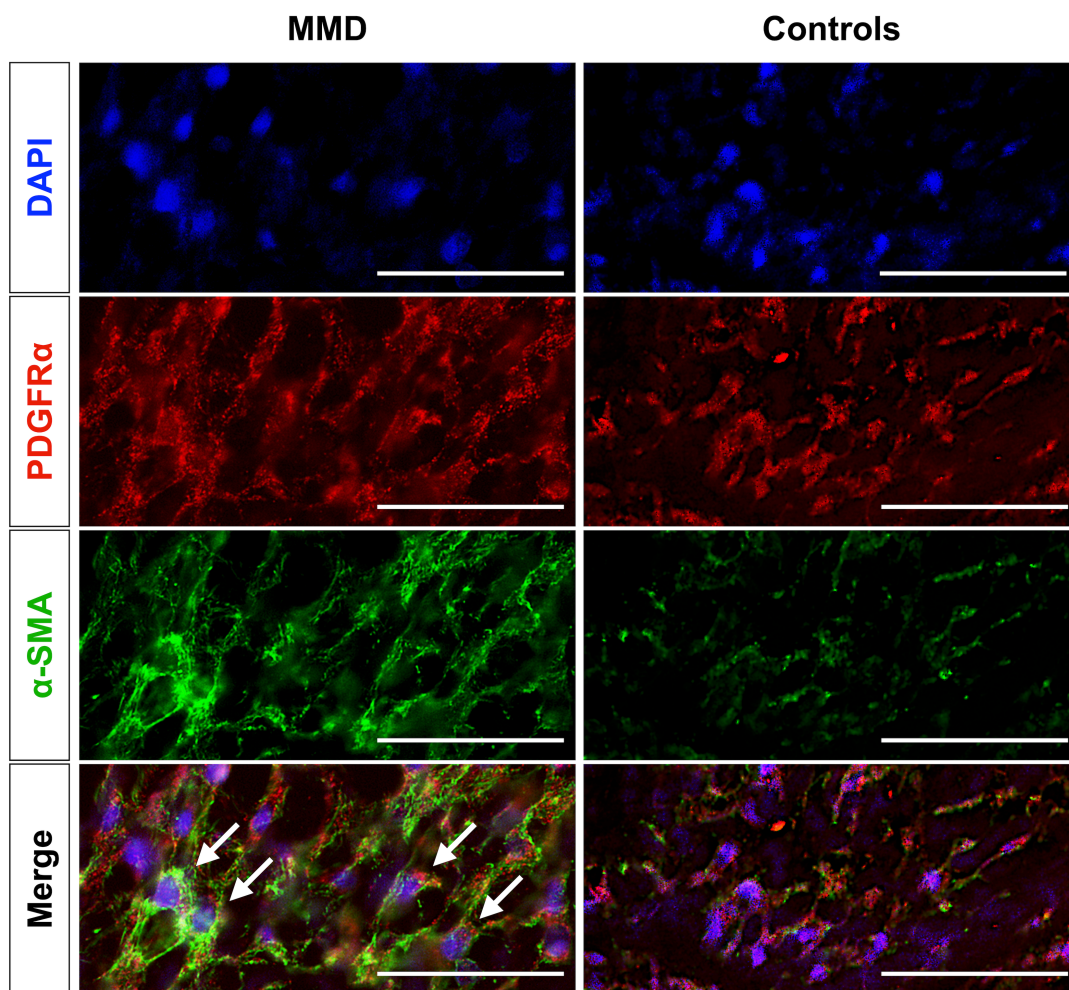
Sirius red 染色を行い、くも膜におけるコラーゲン密度を測定した。もやもや病群のくも膜におけるコラーゲン密度は  $60.3 \pm 15.0\%$  であった。一方、対照群では  $40.1 \pm 15.3\%$  であり、もやもや病群で有意にコラーゲン密度が高かった ( $Z = -2.8$ ,  $P < 0.01$ , 図 12)。

#### 脳脊髄液のサイトカイン濃度の測定

脳脊髄液中のサイトカイン濃度を測定するために ELISA を実施した。bFGF 濃度は対照群と比較してもやもや病群で有意に高かった ( $45.7 \pm 60.9$  pg/mL vs.  $5.3 \pm 3.7$  pg/mL,  $Z = -3.90$ ,  $P < 0.01$ 、

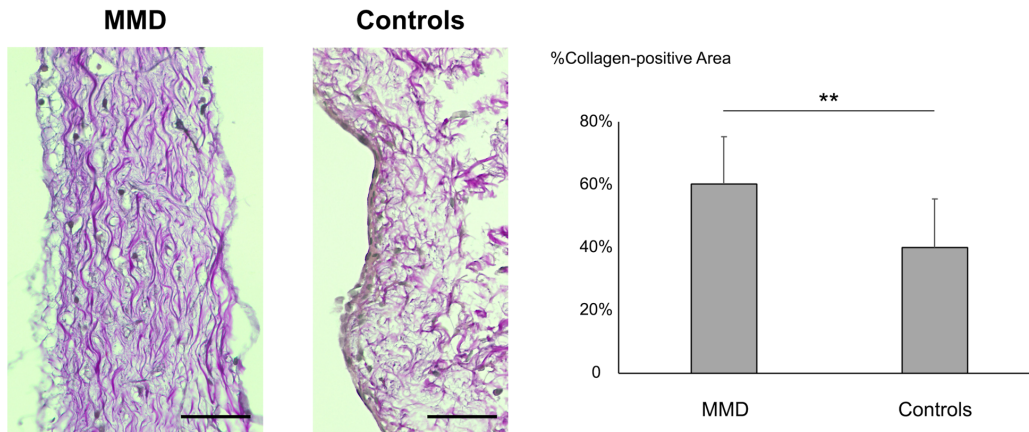
図 13A)。同様に、HGF 濃度ももやもや病群で有意に高かった ( $602.3 \pm 407.9$  pg/mL vs.  $295.3 \pm 142.2$  pg/mL,  $Z = -2.63$ ,  $P < 0.01$ 、図 13B)。さらに、TGF- $\beta$ 1 濃度も対照群と比較してもやもや病群で有意に高かった ( $160.4 \pm 108.3$  pg/mL vs.  $46.3 \pm 9.9$  pg/mL,  $Z = -3.93$ ,  $P = < 0.01$ 、図 13C)。一方で、PDGF-AB および BB はもやもや病群および対照群の全検体で測定感度以下の濃度であった。

図 11. くも膜における蛍光二重染色所見



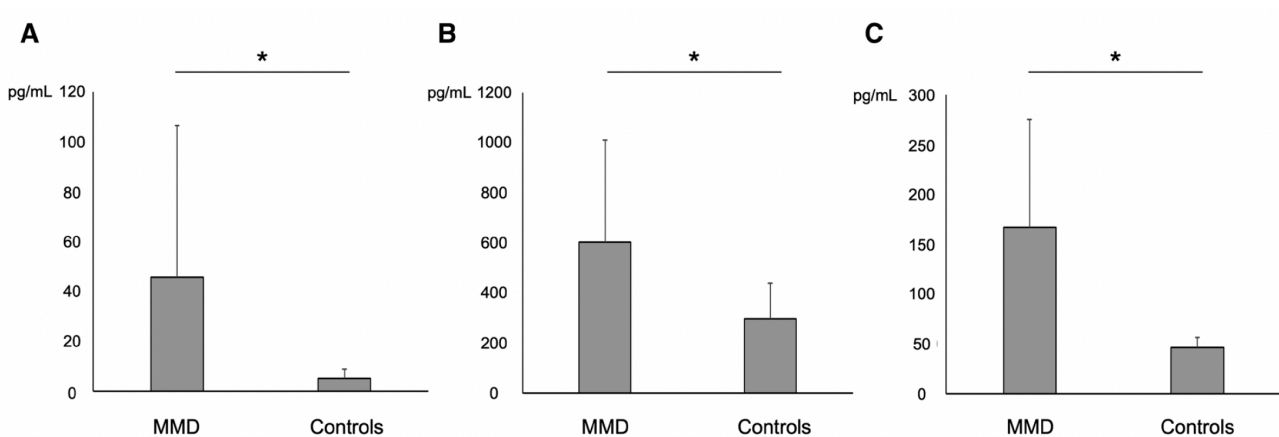
Photomicrographs of Multi-color immunofluorescence using primary antibodies against PDGFR $\alpha$  (red) and  $\alpha$ -SMA (green) in the inner layer of arachnoid membrane of MMD (left) and the controls (right). Their merged images show that the majority of PDGFR $\alpha$ -positive cells also express  $\alpha$ -SMA in MMD (arrows), but not in the controls. Scale bar = 100  $\mu$ m, MMD: moyamoya disease

図 12. くも膜におけるコラーゲン密度の定量化



Photomicrographs of Sirius red staining in the inner layer of arachnoid membrane of MMD (*left*) and the controls (*right*). Not that Sirius red-positive collagen is densely deposited in the inner layer of arachnoid membrane in MMD, but not in the controls. Scale bar = 50  $\mu$ m. The bar graph shows that the percentage of Sirius red-positive area of collagen was significantly larger in MMD than in the controls. \*\*: P<0.01, MMD: moyamoya disease

図 13. 脳脊髄液中のサイトカイン濃度



Cytokine levels in cerebrospinal fluid.

Bar graphs demonstrating the CSF levels of bFGF (A), HGF (B), and TGF- $\beta$ 1 (C) in MMD and the controls. \*: P<0.05

## αSMA 陽性細胞数に影響する因子

もやもや病のくも膜における αSMA 陽性細胞数に影響する背景因子および放射線学的因子、脳脊髄液中のサイトカイン濃度を明らかにするために、重回帰分析を行った。単変量解析の結果、病期進行例（4期以降）で αSMA 陽性細胞数がより多く（P=0.02）、年齢・性別による調整を加えても有意な因子であった（P=0.04、表7）。その他、背景因子や脳脊髄液中のサイトカイン濃度は αSMA 陽性細胞数と関連がなかった。

表7. αSMA 陽性細胞数に関連する因子

	Crude	Multivariate Adjustment *		
	P value	β	R <sup>2</sup>	P value
Age	0.36	0.20	0.05	0.36
Female sex	0.91	0.03	0.05	0.90
Suzuki's stage >3	0.02	1.40	0.10	0.04
Hemorrhagic onset	0.84	0.09	0.06	0.67
bFGF level	0.58	0.26	0.24	0.28
HGF level	0.62	0.36	0.38	0.17
TGF-β1 level	0.74	0.19	0.19	0.43

\* The multivariate adjustment model was adjusted for age (continuous variable) and sex. bFGF: basic fibroblast growth factor, HGF: hepatocyte growth factor, TGF-β1: transforming growth factor-β1

## 4. 考察

### 4-1 もやもや病における脳血行再建術後のもやもや血管の変化

本研究では、STA-MCA バイパスおよび EDMAPS がもやもや血管を消退させ得るかを明らかにすることを目的とした。結果として、成人および小児の両方において、STA-MCA バイパスおよび EDMAPS 実施後 3-6 ヶ月の間にもやもや血管が有意に消退することが明らかとなった。特に、もやもや病における頭蓋内出血と密接な関係を持つことが明らかとなっている Grade-2 choroidal channel の約 7 割が Grade 0 または Grade 1 に消退していた。Houkin らは、1996 年に 35 人の成人もやもや病患者に対し STA-MCA バイパスおよび encephalo-duro-arterio-myosynangiosis (EDAMS) を実施し、25%の患者でもやもや血管が消退することを明

らかにした。<sup>14</sup> Irukura らは 2000 年に 13 人の小児もやもや病患者の 24 半球に対して encephalomyo-synangiosis (EMS) を実施し、94% の患者において良好な側副血行路の形成とともに basal moyamoya vessel の消退が得られたことを報告した。<sup>13</sup> Jiang らは 113 人の出血発症成人もやもや病患者に対して STA-MCA バイパスおよび encephalo-duro-myo-synangiosis (EDMS) を実施し、脈絡叢動脈および視床穿通枝の 70% において異常な拡張・伸展が改善したと報告した。<sup>27</sup> これらの報告はいずれも術後にもやもや血管が消退したことを明らかにしているが、もやもや血管を解剖学的な視点から詳細に分類してはいない。近年の研究から、もやもや血管をその病体生理学的特徴に基づき lenticulostriate、thalamic、および choroidal channel の 3 つに分類することの有用性が明らかとなっている。<sup>24,26,38,39</sup> Miyakoshi らは MR angiography (MRA) を用い、上述の分類法に基づきもやもや血管を 3 つに分類し、脳血行再建術を実施した 104 半球の 45% でもやもや血管が消退することを報告した。<sup>40</sup> しかし、MRA ではもやもや血管を必ずしも正確に評価できない場合があるため、今回私は脳血管撮影を用いた評価を採用した。その結果として、STA-MCA バイパスおよび EDMAPS が小児例においては lenticulostriate および choroidal channel を、成人例では 3 つの channel 全てを有意に消退させることを示した。この結果から、STA-MCA バイパスおよび EDMASP が頭蓋内出血の原因となり得るもやもや血管を有意に消退させるための有用な手段であることが示された。

過去の研究が choroidal channel の発達が成人もやもや病における頭蓋内出血の発症と密接に関係していることを示してきたように、本研究においても Grade-2 choroidal channel は虚血発症例と比較し出血発症例でより発達していた。さらに、複合血行再建術後の側副血行路の発達度が、術後の choroidal channel の消退と有意な関連を示した(表 2)。このことから、もやもや病における脳血行再建術は脳循環不全の改善による TIA や脳梗塞の予防効果のみならず、もやもや血管を消退させることによりこれらの破綻に伴う頭蓋内出血の発症も予防し得ることが示唆された。もやもや血管が術後に消退することの詳細な機序は不明であるが、十分な側副血行路の発達が重要な役割を占めていると考えられており、本研究の結果もこれを支持するものである。直接血行再建術のみならず、もやもや病に特異的である間接血行再建を介した側副血行路の発達が臨床的に持つ意味合いは非常に大きいと言える。

本研究にはいくつかの limitation が存在する。まず、本研究の結果をより正確に検証するには前向き研究が必要である。2 つ目に、術前および術後の脳血管撮影を全症例に実施できていないことが挙げられる。乳幼児もやもや病患者では脳血管撮影を行うこと自体に一定のリスクを伴うことが主な理由であるが、これにより選択バイアスが生じている可能性がある。3 つ目に、本研究では術後 3~6 ヶ月目に脳血管撮影を実施しているが、それ以降の長期的なもやもや血管の変化は確認できていない。最後に、われわれの施設では STA-MCA バイパスおよび EDMAPS を全ての患者に対して実施しているため、他の術式との比較はできてい

ない。これらを解決するためには、多施設共同前向き試験の実施が望まれる。

#### 4-2 小児期発症成人もやもや病における放射線学的・臨床的特徴

本研究は、成人もやもや病を小児期の脳虚血エピソードの有無により「成人期発症」群と「小児期発症」群に分類し、小児期発症成人もやもや病の臨床的・放射線学的特徴を明らかにすることを目的とした。その結果、小児期発症群では成人期発症群と比較し、平均年齢が約 10 歳若いことが明らかとなった（それぞれ 34.0 歳および 43.3 歳）。成人もやもや病の発症年齢は 40 歳前後であることを考慮すると、その差は決して小さくない。<sup>41,42</sup> 加えて、小児期発症群では成人期発症群と比較し頭蓋内出血の発症リスクが約 4 倍であることが判明した。脆弱なもやもや血管に対し、長期にわたり血行力学的負荷がかかることが若年での頭蓋内出血の発症に寄与していることが予想される。

放射線学的な分析が上記の予測を支持している。小児期発症群では成人期発症群と比較して病期に差がないものの、もやもや血管のうち lenticulostriate channel および choroidal channel がより発達していた。上述した通り、近年の研究においてもやもや血管、特に choroidal channel がもやもや病における頭蓋内出血の発生と密接に関係していることが判明している。実際に本研究において、小児期発症であること、Grade-2 choroidal channel が存在することが頭蓋内出血発症の予測因子として抽出されている（それぞれ OR 4.31、6.78、表 5）。近年、JAM Trial Investigators が出血発症成人もやもや病では、虚血発症例と比較して thalamic channel および choroidal channel が有意に発達していることを明らかにした（それぞれ  $P=0.043$ 、 $P<0.001$ ）。同様に、上述した通りわれわれの研究においても choroidal channel の発達は頭蓋内出血の発生と有意に関連していることが判明している（3-1 参照）。これらの知見より、小児期発症成人もやもや病は若年で発症し、かつ頭蓋内出血のリスクが高いことから、新たな臨床的概念として有意義であると思われる。

一般的に、もやもや血管の発達は病期の進行と密接に関わるとされている。しかし、小児期発症群では成人期発症群と病期に差がない一方、lenticulostriate channel および choroidal channel がより発達していた。この機序は不明であるが、小児から成人に成長するまでの脳血流量の変化が関係している可能性がある。過去の研究において、小児では成人と比較し正常の脳血流量が大きいことが明らかとなっている。おそらくこれは脳の成長のために需要が大きいためであると推測される。<sup>43-45</sup> Kennedy らは 3 から 11 歳の小児では、成人と比較して 1.8 倍脳血流量が大きいことを明らかにした。さらに Ogawa らは 5 歳以下の小児では成人と比較して脳血流量が約 2 倍大きく、それ以降徐々に減少していくことを報告した。<sup>46,47</sup> これらのことから、小児期発症成人もやもや病では、小児期の大きな脳血流量の需要を満たすためにもやもや血管がより顕著に発達した可能性がある。そしてこれらの発達したもやもや血



管が一転して成人期の頭蓋内出血の大きなリスク因子となっているものと推測した。一方、本研究では vault moyamoya にも同様の所見がみられた。<sup>5</sup> Vault moyamoya は STA や中硬膜動脈から MCA や ACA へ自然に形成される側副血行路として知られている。<sup>3</sup> これらは 5～6 期といったより進行した病期で形成されることが知られている。しかし、病期に差がない小児期発症群と成人期発症群の 2 群間でその発達に有意な差がみられた。小児期のより大きな脳血流量の需要がこの現象の原因として説明可能であると考ええる。

本研究は、間接血行再建術を介した血管新生が成人期発症群よりも小児期発症群でより高頻度に発達することを示した初めての研究である (P=0.0019)。先行研究では、小児ではほぼ全例に間接血行再建術を介した血管新生が認められたが、成人では 67.9～77.6%に留まった。<sup>28,48</sup> 本研究では、術後の側副血行路形成に寄与する臨床的および放射線学的因子は特定できず、そのメカニズムは未だ不明である。しかし、小児期発症成人もやもや病患者は、上述のように側副血行路の形成に寄与する生物学的特徴を持っている可能性がある。

本研究は、小児期発症成人もやもや病の臨床的、放射線学的特徴を明らかにした。この知見は、もやもや病患者の診療に際して有用なものであると考えられる。しかし、サンプルサイズが小さいことが limitation として挙げられる。今後、より大規模なコホートによる共同研究が必要であると考ええる。

#### 4-3 もやもや病患者くも膜の免疫組織学的評価

本研究は、もやもや病患者のくも膜における特異的な生物学的特徴に焦点を当てた初めての研究であり、もやもや病における血管新生の機序を明らかにし得るものである。くも膜は内層および外層で構成されている。外層は arachnoid barrier cell layer と呼ばれ、2～6 層の密接で扁平な細胞で構成されている。<sup>49,50</sup> これらの細胞は tight junction で連結され、規則的に仕切られている。<sup>51,52</sup> 一方、内層は inner arachnoid reticular cell layer と呼ばれ、粗に配列し扁平でない細胞で構成されている。<sup>51</sup> 内層の細胞は、密な細胞質、中間フィラメント、密なマトリックスを持つ多数の小さなミトコンドリア、細長い核を含んでいる。<sup>52</sup> これらの細胞は、gap junction とデスモソームによって連結されており、これらにより内層の細胞と外層の細胞も連結されている。<sup>51</sup> これまでの研究から、内層と外層を構成しているくも膜細胞は線維芽細胞であると考えられている。<sup>53</sup>

本研究では、もやもや病のくも膜内層における生物学的特性を評価するために、免疫組織化学的手法を採用した。その結果、もやもや病と対照群の両群で、くも膜内層の細胞の多くが PDGFR $\alpha$  に陽性であった。この結果は、線維芽細胞がくも膜内層を構成する主要な構成要素であるというこれまでの報告を支持するものであった。しかし、PDGFR $\alpha$  陽性細胞数には両群間で大きな差があった。このことから、もやもや病のくも膜内層では、何らかのメ

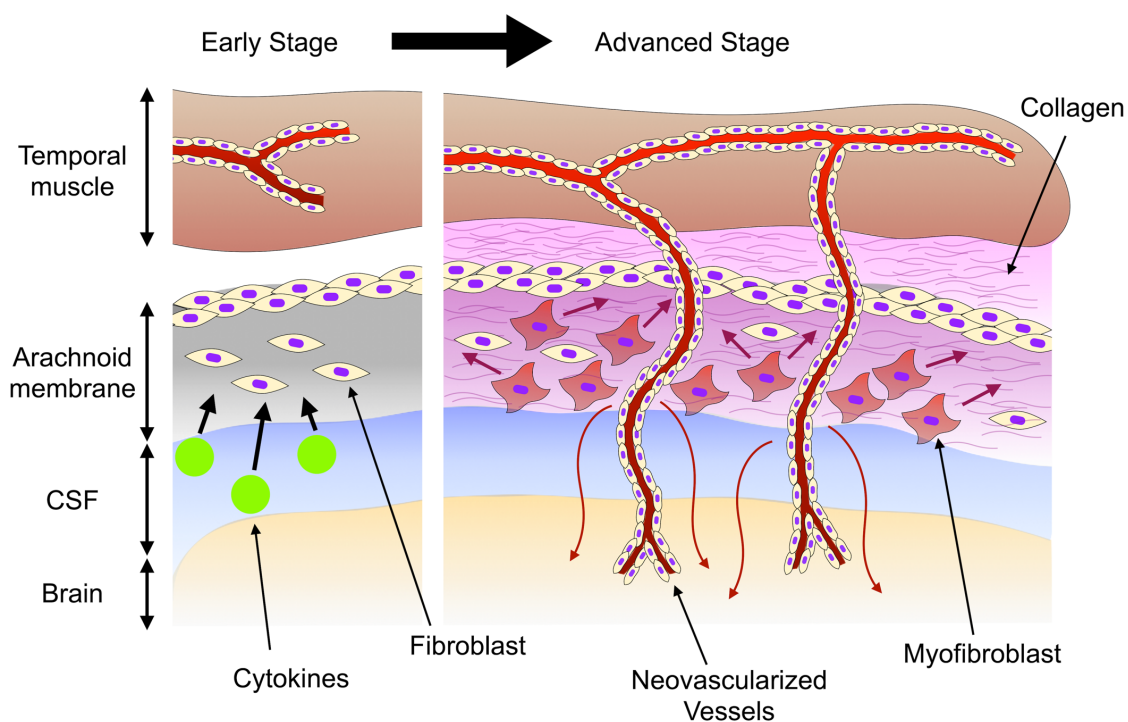
カニズムで線維芽細胞が対照群より増殖しやすい、もしくは線維芽細胞における PDGFR $\alpha$  の発現が上昇している可能性が考えられる。さらにもやもや病では PDGFR $\alpha$  陽性細胞の大部分が  $\alpha$ SMA も発現していたが、対照群では  $\alpha$ SMA をほとんど発現していなかった。このことから、もやもや病ではくも膜内層において筋線維芽細胞数が著明に増加しており、この増加には線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化転換が主に寄与している可能性がある。

筋線維芽細胞は活性型線維芽細胞として知られる間葉系細胞の一つである。分化した筋線維芽細胞の分子マーカーとして最も広く用いられているのは  $\alpha$ SMA の発現である。<sup>54</sup> 筋線維芽細胞の最も重要な役割の一つは、皮膚の創傷治癒や心筋梗塞後の心筋、損傷した腱、骨、軟骨の安定化等、組織の修復である。<sup>54,55</sup> TGF- $\beta$ 1、PDGF、血管内皮増殖因子 (VEGF)、腫瘍壊死因子 (TNF- $\alpha$ )、CCN2 (結合組織増殖因子) 等、様々なサイトカインが筋線維芽細胞を誘導することが報告されている。<sup>54,56-61</sup> その中でも、TGF- $\beta$ 1 は線維芽細胞を筋線維芽細胞へ分化させる最も強力な因子である。一方、bFGF、Interferon (IFN)- $\gamma$ 、TGF- $\beta$ 3、Interleukin (IL)-1、HGF 等のサイトカインは、筋線維芽細胞への分化を抑制することが知られている。<sup>62-68</sup> 本研究においてももやもや病患者の脳脊髄液中の PDGF-AB および BB はいずれも測定感度以下であったが (data not shown)、bFGF、HGF、TGF- $\beta$ 1 の濃度は対照群と比べ有意に高かった。もやもや病の脳脊髄液では、bFGF、HGF、soluble adhesion molecules、CRABP-1、TGF- $\beta$ 1、VEGF 等のサイトカイン濃度が上昇していることが報告されているが、今回の結果はこれらに矛盾しないものである。<sup>69</sup> 以上のことから、もやもや病では脳脊髄液中の豊富な bFGF、HGF、TGF- $\beta$ 1 等のサイトカインが、くも膜における線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化を調整すると考えられ、この分化は促進性のサイトカインと抑制性のサイトカインのバランスに大きく依存することが示唆される。<sup>70</sup>

われわれの両側総頸動脈狭窄モデルマウスを用いた動物実験では、PDGFR $\alpha$  が EMS 後の側頭筋と大脳新皮質間の血管新生に重要な役割を果たすことが示された。<sup>71</sup> CD-31 陽性血管の数および径は、両側総頸動脈狭窄を導入した Flox マウスでは有意に増加したものの、PDGFR $\alpha$  ノックアウトマウスでは増加しなかった。<sup>71</sup> さらに興味深いことに、Flox マウスでは側頭筋と大脳新皮質間のコラーゲン線維が非常に密で、大脳新皮質の表面と強固に密着していた。一方、PDGFR $\alpha$  ノックアウトマウスでは、コラーゲンの形成がまばらで、大脳新皮質表面への接着は乏しかった。これらのことは、もやもや病における間接血行再建術後の特異的血管新生におけるコラーゲン沈着の重要性を強く示している。コラーゲンは血管新生のためのマトリックス骨格を形成し、内皮細胞の増殖、生存、遊走を補助する。<sup>72,73</sup> このことから血管新生を促進するために必要不可欠な分子の一つとされる。本研究において、くも膜のコラーゲン密度は、対照群と比較してもやもや病で有意に高かった。これらのことから、もやもや病の脳脊髄液に豊富に含まれる bFGF、HGF、TGF-1 等のサイトカインが、くも膜の

線維芽細胞の増殖および筋線維芽細胞への分化を促進し、くも膜におけるコラーゲン分泌と沈着を促進している可能性が強く示唆された。経硬膜吻合においては、新生した血管がくも膜を貫通し、硬膜から脳表へ血流を供給する。同様に間接血行再建術後の血管新生においても、硬膜、側頭筋、骨膜等の組織からくも膜を介して脳表へ血流が供給される。今回初めて明らかになったもやもや病のくも膜での筋線維芽細胞によるコラーゲン産生は、もやもや病における経硬膜吻合や間接血行再建術後の血管新生において、新生血管の発生に大きく寄与すると考えられる（図 13）。

図 13. もやもや病における血管新生の機序に対する仮説



Authors' hypothesis for the mechanism of aggressive extracranial-to-intracranial angiogenesis after indirect bypass in moyamoya disease. In moyamoya disease, the CSF levels of angiogenic cytokines elevate and accelerate the proliferation of fibroblasts in the inner layer of arachnoid membrane and their differentiation into myofibroblasts. The myofibroblast actively produce collagen in the inner layer of arachnoid membrane, which provides a favorable environment for spontaneous extracranial-to-intracranial angiogenesis in moyamoya disease.

われわれのこれまでの研究で、筋線維芽細胞の PDGFR $\alpha$  を介したシグナルが筋線維芽細胞自身のコラーゲン産生において重要な役割を果たすことが示されており、今回の結果を支持するものである。<sup>74</sup> さらに PDGFR $\alpha$  を介したシグナルは筋線維芽細胞の HGF 産生を刺激する。HGF はコラーゲンの沈着を促進し、血漿や間質液の成分であるフィブロネクチンを構成することで、血管新生の足場としての働きを持つ。<sup>74</sup> このように、筋線維芽細胞の血管新生における働きは PDGFR $\alpha$  を介したシグナルによって制御されている。さらに、PDGFR $\alpha$  のシグナルの下流で発現が増加したコラーゲンや HGF は血管新生に重要な役割を果たしており、これらがもやもや病における経硬膜吻合の発達を説明する上で重要な要素となっている可能性がある。

もやもや病における経硬膜吻合は、病期が進行した患者においてより発達する。<sup>4,5,75,76</sup> 本研究では、 $\alpha$ SMA 陽性細胞数は病期が進行した患者において有意に発現が高いことが明らかになった。これは、くも膜において分化した筋線維芽細胞が、頭蓋外から頭蓋内への血管新生の発生を刺激しているという仮説を支持するものである。ただし、表 7 において、Suzuki's stage>3 の重回帰係数が 0.10 と非常に低い値となっており、 $\alpha$ SMA 陽性細胞数に対する病期の寄与が低い可能性があることには注意が必要である。一方、もやもや病では脳脊髄液中の bFGF、HGF、TGF- $\beta$ 1 などの血管新生因子濃度が、対照群と比較して上昇しているという過去の知見と同様の結果が得られた。しかし、本研究の結果からはこれらのサイトカイン濃度はもやもや病くも膜における筋線維芽細胞の増殖および分化に影響を与えていなかった (表 7)。将来的に、もやもや病の間接血行再建術後の血管新生を術前に予測できるバイオマーカーの探索を行う必要がある。

一方、もやもや病のくも膜では PDGFR $\beta$  陽性細胞数が対照群と比較し有意に多いことも明らかとなった。PDGFR $\beta$  は血管新生に重要な役割を果たすことが知られている。過去の研究で、ラット虚血後肢モデルにおいて、PDGFR $\beta$  が新生血管を安定化させ、側副血行路形成を誘導することが示されている。<sup>77</sup> さらに PDGFR $\beta$  陽性線維芽細胞は、ヒト固形癌において VEGF 等の血管新生因子を生成することで、血管新生を誘導することが報告されている。<sup>78</sup> これらの知見から、もやもや病では増殖した PDGFR $\beta$  陽性くも膜細胞も脳とその周辺組織間の特異的な血管新生を促進する一因となっている可能性がある。さらに最近の研究では、PDGFR $\beta$  が間葉系幹細胞の  $\alpha$ SMA mRNA の発現を誘導する TGF $\beta$ -TGF $\beta$  受容体シグナルの仲介に重要な役割を果たし、この過程は PDGF リガンドによる PDGFR $\beta$  活性化を必要としないことが示されている。<sup>79</sup> したがって、くも膜筋線維芽細胞における PDGFR $\beta$  の増加は、もやもや病の脳脊髄液における TGF- $\beta$  の増加とともに  $\alpha$ SMA mRNA の発現を媒介した可能性があるが、この仮説を明らかにするにはさらなる研究が必要である。

本研究には複数の限界がある。まず本研究では、もやもや病群と対照群との間で年齢や性

別などの臨床的特徴を一致させることが困難であった。もやもや病群で有意に年齢が若く、女性が男性の約2倍となっている。一方、対照群は STA-MCA バイパス術を受けた動脈硬化性頭蓋内動脈狭窄症例で構成されている。その多くが高齢であり、全例男性である。もやもや病のくも膜における生物学的変化が、もやもや病に特異的なものであるか脳虚血によるものであるかを判別することが重要であると考え、重度の脳虚血を伴う動脈硬化性頭蓋内動脈狭窄患者を対照群として採用した。年齢や性別によるくも膜の組織所見の変化についてはこれまで報告がなく、両者をマッチングさせることは今後の課題である。

## 5. 結語

本研究は、まず STA-MCA バイパス術および EDMAPS がもやもや病における頭蓋内出血の原因となりうるもやもや血管を有意に退縮させることを明確に示した。初発および再発頭蓋内出血の最も有力な予測因子である Grade-2 choroidal channel の退縮は、外科的側副血行路の発達と有意に関連していた。STA-MCA バイパス術および EDMAPS は、もやもや病においてももやもや血管を退縮させ、大脳半球の広範に外科的側副血行路を供給することにより、虚血性のみならず出血性脳卒中を予防する最も有効な術式の一つである可能性が示唆された。そして、もやもや病に特異的である間接血行再建を介した側副血行路発達が、もやもや病患者の転帰改善に非常に重要であることを示した。

次に、本研究は小児期発症成人もやもや病患者の臨床的・放射線学的な特徴を示した。小児期発症成人もやもや病患者では、小児期の罹病期間が長くその脳血流需要の高さのためもやもや血管がより高度に発達しており、結果として頭蓋内出血が発生する可能性が高いことが初めて明らかとなった。また、この患者群では経硬膜吻合がより発達しており、これも小児期の脳血流需要の高さのためであると考えられた。これらのことから、「小児期発症」という概念は新規性があり、かつ臨床的に重要なものであると考えられる。

最後に、もやもや病患者のくも膜では対照群と比較して線維芽細胞が増殖、もしくは線維芽細胞における PDGFR  $\alpha$  の発現が上昇し、その多くが筋線維芽細胞へ分化していることを世界で初めて明らかとした。もやもや病の脳脊髄液における bFGF、HGF、TGF- $\beta$ 1 などの血管新生因子濃度上昇が、この特異な現象に寄与している可能性がある。また、この現象は病期の進行と密接に関連していた。筋線維芽細胞は、くも膜におけるコラーゲン産生を促進し、経硬膜吻合や間接血行再建術後の側副血行路形成など、もやもや病における特異的な血管新生を促進している可能性がある。今後、もやもや病くも膜における  $\alpha$ SMA 陽性筋線維芽細胞の役割についてさらなる研究が必要である。

## 6. 謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の遂行に関して御指導、御高閲を賜りました、富山大学脳神経外科 黒田 敏教授に感謝申し上げます。また共同研究者として御指導を賜りました、富山大学病態病理学 笹原 正清教授、山本 誠士先生、研究を支えてくださった脳神経外科学のスタッフの方々に感謝申し上げます。

## 7. 参考文献

1. Kudo T. Spontaneous occlusion of the circle of Willis. A disease apparently confined to Japanese. *Neurology*. 1968;18:485-496
2. Nishimoto A, Takeuchi S. Abnormal cerebrovascular network related to the internal carotid arteries. *J Neurosurg*. 1968;29:255-260
3. Suzuki J, Takaku A. Cerebrovascular "moyamoya" disease. Disease showing abnormal net-like vessels in base of brain. *Arch Neurol*. 1969;20:288-299
4. Kuroda S, Houkin K. Moyamoya disease: current concepts and future perspectives. *Lancet Neurol*. 2008;7:1056-1066
5. Kodama N, Fujiwara S, Horie Y, Kayama T, Suzuki J. [Transdural anastomosis in moyamoya disease--vault moyamoy (author's transl)]. *No Shinkei Geka*. 1980;8:729-737
6. Miyamoto S, Akiyama Y, Nagata I, Karasawa J, Nozaki K, Hashimoto N, Kikuchi H. Long-term outcome after STA-MCA anastomosis for moyamoya disease. *Neurosurg Focus*. 1998;5:e5
7. Liu X, Zhang D, Shuo W, Zhao Y, Wang R, Zhao J. Long term outcome after conservative and surgical treatment of haemorrhagic moyamoya disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013;84:258-265
8. Guzman R, Lee M, Achrol A, Bell-Stephens T, Kelly M, Do HM, Marks MP, Steinberg GK. Clinical outcome after 450 revascularization procedures for moyamoya disease. Clinical article. *J Neurosurg*. 2009;111:927-935
9. Kim SK, Cho BK, Phi JH, Lee JY, Chae JH, Kim KJ, Hwang YS, Kim IO, Lee DS, Lee J, et al. Pediatric moyamoya disease: An analysis of 410 consecutive cases. *Ann Neurol*. 2010;68:92-101
10. Kawaguchi T, Fujita S, Hosoda K, Shose Y, Hamano S, Iwakura M, Tamaki N. Multiple burr-hole operation for adult moyamoya disease. *J Neurosurg*. 1996;84:468-476

11. Houkin K, Kuroda S, Nakayama N. Cerebral revascularization for moyamoya disease in children. *Neurosurg Clin N Am.* 2001;12:575-584
12. Kuroda S, Houkin K, Kamiyama H, Abe H, Mitsumori K. Regional cerebral hemodynamics in childhood moyamoya disease. *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery.* 1995;11:584-590
13. Irikura K, Miyasaka Y, Kurata A, Tanaka R, Yamada M, Kan S, Fujii K. The effect of encephalo-myo-synangiosis on abnormal collateral vessels in childhood moyamoya disease. *Neurological research.* 2000;22:341-346
14. Houkin K, Kamiyama H, Abe H, Takahashi A, Kuroda S. Surgical therapy for adult moyamoya disease. Can surgical revascularization prevent the recurrence of intracerebral hemorrhage? *Stroke.* 1996;27:1342-1346
15. Kuroda S, Houkin K, Ishikawa T, Nakayama N, Iwasaki Y. Novel bypass surgery for moyamoya disease using pericranial flap: its impacts on cerebral hemodynamics and long-term outcome. *Neurosurgery.* 2010;66:1093-1101
16. Kuroda S, Nakayama N, Yamamoto S, Kashiwazaki D, Uchino H, Saito H, Hori E, Akioka N, Kuwayama N, Houkin K. Late (5-20 years) outcomes after STA-MCA anastomosis and encephalo-duro-myo-arterio-pericranial synangiosis in patients with moyamoya disease. *J Neurosurg.* 2020;134:909-916
17. Ishii R. [Surgical treatment of moyamoya disease]. *No Shinkei Geka.* 1986;14:1059-1068
18. Karasawa J, Kikuchi H, Furuse S, Sakaki T, Yoshida Y. A surgical treatment of "moyamoya" disease "encephalo-myo synangiosis". *Neurol Med Chir (Tokyo).* 1977;17:29-37
19. Kinugasa K, Mandai S, Kamata I, Sugiu K, Ohmoto T. Surgical treatment of moyamoya disease: operative technique for encephalo-duro-arterio-myo-synangiosis, its follow-up, clinical results, and angiograms. *Neurosurgery.* 1993;32:527-531
20. Matsushima Y, Fukai N, Tanaka K, Tsuruoka S, Inaba Y, Aoyagi M, Ohno K. A new surgical treatment of moyamoya disease in children: a preliminary report. *Surg Neurol.* 1981;15:313-320
21. Kuroda S, Houkin K, Ishikawa T, Nakayama N, Ikeda J, Ishii N, Kamiyama H, Iwasaki Y. Determinants of intellectual outcome after surgical revascularization in pediatric moyamoya disease: a multivariate analysis. *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery.* 2004;20:302-308
22. Miyamoto S, Yoshimoto T, Hashimoto N, Okada Y, Tsuji I, Tominaga T, Nakagawara J, Takahashi JC. Effects of extracranial-intracranial bypass for patients with hemorrhagic

- moyamoya disease: results of the Japan Adult Moyamoya Trial. *Stroke*. 2014;45:1415-1421
23. Funaki T, Fushimi Y, Takahashi JC, Takagi Y, Araki Y, Yoshida K, Kikuchi T, Miyamoto S. Visualization of periventricular collaterals in moyamoya disease with flow-sensitive black-blood magnetic resonance angiography: preliminary experience. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2015;55:204-209
  24. Funaki T, Takahashi JC, Yoshida K, Takagi Y, Fushimi Y, Kikuchi T, Mineharu Y, Okada T, Morimoto T, Miyamoto S. Periventricular anastomosis in moyamoya disease: detecting fragile collateral vessels with MR angiography. *J Neurosurg*. 2016;124:1766-1772
  25. Funaki T, Takahashi JC, Houkin K, Kuroda S, Takeuchi S, Fujimura M, Tomata Y, Miyamoto S. Angiographic features of hemorrhagic moyamoya disease with high recurrence risk: a supplementary analysis of the Japan Adult Moyamoya Trial. *J Neurosurg*. 2017:1-8
  26. Fujimura M, Funaki T, Houkin K, Takahashi JC, Kuroda S, Tomata Y, Tominaga T, Miyamoto S. Intrinsic development of choroidal and thalamic collaterals in hemorrhagic-onset moyamoya disease: case-control study of the Japan Adult Moyamoya Trial. *J Neurosurg*. 2018:1-7
  27. Jiang H, Ni W, Xu B, Lei Y, Tian Y, Xu F, Gu Y, Mao Y. Outcome in adult patients with hemorrhagic moyamoya disease after combined extracranial-intracranial bypass. *Journal of neurosurgery*. 2014;121:1048-1055
  28. Mizoi K, Kayama T, Yoshimoto T, Nagamine Y. Indirect revascularization for moyamoya disease: is there a beneficial effect for adult patients? *Surg Neurol*. 1996;45:541-548; discussion 548-549
  29. Yamamoto S, Kashiwazaki D, Uchino H, Saito H, Hori E, Akioka N, Kuwayama N, Kuroda S. Ameliorative Effects of Combined Revascularization Surgery on Abnormal Collateral Channels in Moyamoya Disease. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2021;30:105624
  30. Yamamoto S, Kashiwazaki D, Uchino H, Saito H, Akioka N, Kuwayama N, Kuroda S. Clinical and Radiological Features of Childhood Onset Adult Moyamoya Disease: Implication for Hemorrhagic Stroke. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2020;60:360-367
  31. Yamamoto S, Yamamoto S, Akai T, Sasahara M, Kuroda S. Differentiation of Fibroblasts Into Myofibroblasts in the Arachnoid Membrane of Moyamoya Disease. *Stroke*. 2022;53:3465-3473
  32. Research Committee on the P, Treatment of Spontaneous Occlusion of the Circle of W, Health Labour Sciences Research Grant for Research on Measures for Infractable D. Guidelines for diagnosis and treatment of moyamoya disease (spontaneous occlusion of the circle of Willis). *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2012;52:245-266



33. Kuroda S, Houkin K. Bypass surgery for moyamoya disease: concept and essence of surgical techniques. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2012;52:287-294. doi: 10.2176/nmc.52.287
34. Suzuki J, Kodama N. Cerebrovascular "Moyamoya" disease. 2. Collateral routes to forebrain via ethmoid sinus and superior nasal meatus. *Angiology*. 1971;22:223-236
35. Matsushima T, Inoue T, Suzuki SO, Fujii K, Fukui M, Hasuo K. Surgical treatment of moyamoya disease in pediatric patients--comparison between the results of indirect and direct revascularization procedures. *Neurosurgery*. 1992;31:401-405
36. Yamamoto S, Kashiwazaki D, Uchino H, Saito H, Akioka N, Kuwayama N, Noguchi K, Kuroda S. Stenosis Severity-Dependent Shrinkage of Posterior Cerebral Artery in Moyamoya Disease. *World Neurosurg*. 2019;126:e661-e670
37. Yamamoto S, Funaki T, Fujimura M, Takahashi JC, Uchino H, Houkin K, Tominaga T, Miyamoto S, Kuroda S. Development of Hemorrhage-prone Anastomoses in Asymptomatic Moyamoya Disease-A Comparative Study with Japan Adult Moyamoya Trial. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2019;28:104328
38. Takahashi JC, Funaki T, Houkin K, Inoue T, Ogasawara K, Nakagawara J, Kuroda S, Yamada K, Miyamoto S, Investigators JAMT. Significance of the Hemorrhagic Site for Recurrent Bleeding: Prespecified Analysis in the Japan Adult Moyamoya Trial. *Stroke*. 2016;47:37-43
39. Funaki T, Takahashi JC, Houkin K, Kuroda S, Takeuchi S, Fujimura M, Tomata Y, Miyamoto S. Angiographic features of hemorrhagic moyamoya disease with high recurrence risk: a supplementary analysis of the Japan Adult Moyamoya Trial. *J Neurosurg*. 2018;128:777-784
40. Deng X, Zhang Z, Zhang Y, Zhang D, Wang R, Ye X, Xu L, Wang B, Wang K, Zhao J. Comparison of 7.0- and 3.0-T MRI and MRA in ischemic-type moyamoya disease: preliminary experience. *J Neurosurg*. 2016;124:1716-1725
41. Wakai K, Tamakoshi A, Ikezaki K, Fukui M, Kawamura T, Aoki R, Kojima M, Lin Y, Ohno Y. Epidemiological features of moyamoya disease in Japan: findings from a nationwide survey. *Clin Neurol Neurosurg*. 1997;99 Suppl 2:S1-5
42. Kuriyama S, Kusaka Y, Fujimura M, Wakai K, Tamakoshi A, Hashimoto S, Tsuji I, Inaba Y, Yoshimoto T. Prevalence and clinicoepidemiological features of moyamoya disease in Japan: findings from a nationwide epidemiological survey. *Stroke*. 2008;39:42-47
43. Kennedy C, Sokoloff L. An adaptation of the nitrous oxide method to the study of the cerebral circulation in children; normal values for cerebral blood flow and cerebral metabolic rate in childhood. *The Journal of clinical investigation*. 1957;36:1130-1137
44. Kety SS. Human cerebral blood flow and oxygen consumption as related to aging. *Journal of*

*chronic diseases*. 1956;3:478-486

45. Komatani A, Yamaguchi K, Kera M. [Cerebral blood flow and brain size in healthy subjects--sensitivity to age and gender]. *No to shinkei = Brain and nerve*. 1990;42:889-893
46. Ogawa A, Nakamura N, Sugita K, Sakurai Y, Kayama T, Wada T, Suzuki J. [Regional cerebral blood flow in children--normal value and regional distribution of cerebral blood flow in childhood]. *No to shinkei = Brain and nerve*. 1987;39:113-118
47. Kuroda S, Kamiyama H, Abe H, Yamauchi T, Kohama Y, Houkin K, Mitsumori K. Cerebral blood flow in children with spontaneous occlusion of the circle of Willis (moyamoya disease): comparison with healthy children and evaluation of annual changes. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 1993;33:434-438
48. Uchino H, Kim JH, Fujima N, Kazumata K, Ito M, Nakayama N, Kuroda S, Houkin K. Synergistic Interactions Between Direct and Indirect Bypasses in Combined Procedures: The Significance of Indirect Bypasses in Moyamoya Disease. *Neurosurgery*. 2017;80:201-209
49. Alcolado R, Weller RO, Parrish EP, Garrod D. The cranial arachnoid and pia mater in man: anatomical and ultrastructural observations. *Neuropathology and applied neurobiology*. 1988;14:1-17
50. Haines DE, Harkey HL, al-Mefty O. The "subdural" space: a new look at an outdated concept. *Neurosurgery*. 1993;32:111-120
51. Nabeshima S, Reese TS, Landis DM, Brightman MW. Junctions in the meninges and marginal glia. *The Journal of comparative neurology*. 1975;164:127-169
52. Vandenabeele F, Creemers J, Lambrechts I. Ultrastructure of the human spinal arachnoid mater and dura mater. *Journal of anatomy*. 1996;189:417-430
53. Lopes CA, Mair WG. Ultrastructure of the arachnoid membrane in man. *Acta neuropathologica*. 1974;28:167-173
54. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G. The myofibroblast: one function, multiple origins. *The American journal of pathology*. 2007;170:1807-1816
55. Hinz B. The myofibroblast: paradigm for a mechanically active cell. *Journal of biomechanics*. 2010;43:146-155
56. Rønnov-Jessen L, Petersen OW. Induction of alpha-smooth muscle actin by transforming growth factor-beta 1 in quiescent human breast gland fibroblasts. Implications for myofibroblast generation in breast neoplasia. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1993;68:696-707

57. Desmoulière A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *The Journal of cell biology*. 1993;122:103-111
58. Jester JV, Huang J, Petroll WM, Cavanagh HD. TGFbeta induced myofibroblast differentiation of rabbit keratocytes requires synergistic TGFbeta, PDGF and integrin signaling. *Experimental eye research*. 2002;75:645-657
59. Park HY, Kim JH, Park CK. VEGF induces TGF- $\beta$ 1 expression and myofibroblast transformation after glaucoma surgery. *The American journal of pathology*. 2013;182:2147-2154
60. Ferrari G, Bignami F, Giacomini C, Franchini S, Rama P. Safety and efficacy of topical infliximab in a mouse model of ocular surface scarring. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2013;54:1680-1688
61. Shi-Wen X, Leask A, Abraham D. Regulation and function of connective tissue growth factor/CCN2 in tissue repair, scarring and fibrosis. *Cytokine & growth factor reviews*. 2008;19:133-144
62. Cushing MC, Mariner PD, Liao JT, Sims EA, Anseth KS. Fibroblast growth factor represses Smad-mediated myofibroblast activation in aortic valvular interstitial cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2008;22:1769-1777
63. Moulin V, Castilloux G, Auger FA, Garrel D, O'Connor-McCourt MD, Germain L. Modulated response to cytokines of human wound healing myofibroblasts compared to dermal fibroblasts. *Experimental cell research*. 1998;238:283-293
64. Oldroyd SD, Thomas GL, Gabbiani G, El Nahas AM. Interferon-gamma inhibits experimental renal fibrosis. *Kidney international*. 1999;56:2116-2127
65. Serini G, Gabbiani G. Modulation of alpha-smooth muscle actin expression in fibroblasts by transforming growth factor-beta isoforms: an in vivo and in vitro study. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 1996;4:278-287
66. Shah M, Foreman DM, Ferguson MW. Control of scarring in adult wounds by neutralising antibody to transforming growth factor beta. *Lancet (London, England)*. 1992;339:213-214
67. Shephard P, Martin G, Smola-Hess S, Brunner G, Krieg T, Smola H. Myofibroblast differentiation is induced in keratinocyte-fibroblast co-cultures and is antagonistically regulated by endogenous transforming growth factor-beta and interleukin-1. *The American*

*journal of pathology*. 2004;164:2055-2066

68. Gamulescu MA, Chen Y, He S, Spee C, Jin M, Ryan SJ, Hinton DR. Transforming growth factor beta2-induced myofibroblastic differentiation of human retinal pigment epithelial cells: regulation by extracellular matrix proteins and hepatocyte growth factor. *Experimental eye research*. 2006;83:212-222
69. Wang C, Sun C, Zhao Y, Song H, Li Z, Jin F, Cui C. RNF213 gene silencing upregulates transforming growth factor  $\beta$ 1 expression in bone marrow-derived mesenchymal stem cells and is involved in the onset of Moyamoya disease. *Experimental and therapeutic medicine*. 2021;22:1024
70. Adeeb N, Deep A, Griessenauer CJ, Mortazavi MM, Watanabe K, Loukas M, Tubbs RS, Cohen-Gadol AA. The intracranial arachnoid mater : a comprehensive review of its history, anatomy, imaging, and pathology. *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery*. 2013;29:17-33
71. Hayashi T, Yamamoto S, Hamashima T, Mori H, Sasahara M, Kuroda S. Critical role of platelet-derived growth factor- $\alpha$  in angiogenesis after indirect bypass in a murine moyamoya disease model. *J Neurosurg*. 2020;134:1535-1543
72. Ignatz RA, Massagué J. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *The Journal of biological chemistry*. 1986;261:4337-4345
73. Sottile J. Regulation of angiogenesis by extracellular matrix. *Biochimica et biophysica acta*. 2004;1654:13-22
74. Horikawa S, Ishii Y, Hamashima T, Yamamoto S, Mori H, Fujimori T, Shen J, Inoue R, Nishizono H, Itoh H, et al. PDGFR $\alpha$  plays a crucial role in connective tissue remodeling. *Scientific reports*. 2015;5:17948
75. Suzuki J, Kodama N. Moyamoya disease--a review. *Stroke*. 1983;14:104-109
76. Storey A, Michael Scott R, Robertson R, Smith E. Preoperative transdural collateral vessels in moyamoya as radiographic biomarkers of disease. *J Neurosurg Pediatr*. 2017;19:289-295
77. Zhang J, Cao R, Zhang Y, Jia T, Cao Y, Wahlberg E. Differential roles of PDGFR-alpha and PDGFR-beta in angiogenesis and vessel stability. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2009;23:153-163
78. Hu G, Huang L, Zhong K, Meng L, Xu F, Wang S, Zhang T. PDGFR- $\beta$ (+) fibroblasts deteriorate survival in human solid tumors: a meta-analysis. *Aging*. 2021;13:13693-13707
79. Aoto K, Ito K, Aoki S. Complex formation between platelet-derived growth factor receptor  $\beta$

and transforming growth factor  $\beta$  receptor regulates the differentiation of mesenchymal stem cells into cancer-associated fibroblasts. *Oncotarget*. 2018;9:34090-34102