

## 原 著 (第49回徳島医学会賞受賞論文)

# エストロゲン欠乏ラットの ER $\alpha$ および Sirt1の低下に伴う NLRP3/IL-1 $\beta$ /MMP-9経路の活性化と脳動脈瘤破裂との関連

山口 真 司, 山口 泉, 高 麗 雅 章, 島 田 健 司, 多 田 恵 曜,  
北 里 慶 子, 兼 松 康 久, 高 木 康 志

徳島大学大学院医歯薬学研究部 脳神経外科学

(令和4年10月26日受付) (令和4年11月2日受理)

### はじめに

脳動脈瘤は人口の約2-6%が有しており<sup>1,2)</sup>, 脳動脈瘤破裂によるくも膜下出血 (SAH: Subarachnoid hemorrhage) は, 半数以上が死亡あるいは重篤な後遺症をきたす転帰の悪い疾患である<sup>3)</sup>. 特に女性の閉経後に脳動脈瘤の破裂の頻度が増加することから<sup>4,5)</sup>, その詳細な病態を明らかにすることが重要である。

われわれは疫学的観点から, 卵巣摘出によるエストロゲン欠乏状態に高血圧や頸動脈結紮による血行力学的変化を誘導することにより脳動脈瘤破裂ラットモデルを確立した<sup>6)</sup>. 本モデルでは, ヒトと類似した特定部位 (前交通動脈や後大脳動脈) に高頻度で破裂脳動脈瘤を認め, 破裂好発部位の血管において炎症マーカーである interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) や細胞外マトリクス分解酵素である matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) の上昇を認めることを報告している<sup>6,7)</sup>.

Nod-like receptor family pyrin domain containing 3 (NLRP3) inflammasome は蛋白複合体であり, 活性化により IL-1 $\beta$ や MMP-9を産生し, 炎症を惹起する<sup>8)</sup>. NLRP3と脳梗塞や心血管疾患の関連は報告されているが<sup>9,10)</sup>, 脳動脈瘤破裂との関連の報告はほとんどない。一方, sirtuin 1 (Sirt1) は酸化型 Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>) 依存性脱アセチル化酵素であり, 心血管疾患における炎症反応の重要な制御因子であると報告されている<sup>11)</sup>. しかし, 脳動脈瘤破裂において NLRP3と Sirt1の役割については, まだ解明されてい

ない。そこで, エストロゲン欠乏状態では, エストロゲン受容体 (estrogen receptor: ER) のダウンレギュレーションを介した Sirt1の低下による NLRP3の活性化が, 脳動脈瘤破裂を促進すると仮説を立て, 検討を行った。

### 方 法

すべての動物実験は, 徳島大学大学院の研究所倫理委員会の承認を受け, National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals に準拠して実施した。

### 脳動脈瘤ラットモデルでの検討

10週齢の Sprague-Dawley 雌ラット (230-260g, 48匹) を卵巣摘出の有無で無作為に卵巣摘出群 (OVX+ラット) と非摘出群 (OVX-ラット) の2群に分けた。その後, 頸動脈結紮, 高塩分食の給餌と両側後腎動脈結紮を行い, 脳動脈瘤を誘導した。すべてのラットは, 脳動脈瘤の誘導後より6週から19週の間 (90日間) で脳動脈瘤破裂の観察を行った (Fig. 1A)。1週間以内に手術の影響で死亡したラットは, 本研究から除外した (各群5匹)。観察中にラットが死亡した場合や神経学的な異常行動を示す, あるいは, 30g/日 (体重の約10%) を超える体重減少を示した場合には脳動脈瘤破裂が疑われ, 安楽死後に顕微鏡で脳動脈瘤破裂による SAHの有無を確認した。血圧測定は, tail-cuff auto-pickup 法 (Softron, 東京, 日本) を用いて, 高血圧誘導前, 誘導後2週間, 6週間,

10週間後に実施した。

#### エストロゲン受容体モジュレーター Bazedoxifene の有効性評価

Bazedoxifene (BAZ) を投与することによる ERs, Sirt1, NLRP3の発現の変化について脳動脈瘤ラットモデルで検討し, 脳動脈瘤破裂の頻度への影響を解析した。36匹の OVX+ラットを脳動脈瘤誘導後6週目に無作為に2群に分け, 一方には以前の研究に基づき<sup>12)</sup>1.0 mg/kg/dayのBAZを(1日1回, 経口)投与し, もう一方は vehicle control 群とした。

#### 免疫組織化学的評価

脳動脈瘤破裂の観察とは別のラット群を準備し, 年齢を合わせた sham, OVX-, OVX+ラットとBAZを投与したOVX+ラット(各5匹)を脳動脈瘤誘導後10週目に4%パラホルムアルデヒドで灌流後, 破裂好発血管である左後大脳動脈を脳組織とともに採取し, 切片を作成した。切片は elastica van Gieson で染色し, 血管構造の変化を観察した。ER $\alpha$  (abcam, rabbit, ab32063), ER $\beta$  (rabbit, ab3576), NLRP3 (rabbit, ab214185), IL-1 $\beta$  (Cell signaling, rabbit, #12242), MMP-9 (rabbit, ab76003) に対する抗体を使用し, 可視化には DAB buffer tablet を使用し, 対比染色はヘマトキシリンで行った。免疫蛍光染色には, ER $\alpha$ , ER $\beta$ , NLRP3に加え, Sirt1 (mouse, ab110304) に対する抗体で切片を免疫反応させた。画像は, BZ-X710顕微鏡 (Keyence, Osaka, Japan) で検査し, 10000 $\mu\text{m}^2$ あたりの陽性面積を BZ-X710搭載の画像解析ソフトウェアで解析した。

#### 血管壁における mRNA 解析 (RT-PCR 検査)

別途に準備した年齢を合わせた sham, OVX-, OVX+ラット(各8匹)から脳動脈瘤誘導後10週目に破裂好発血管である左後大脳動脈を採取し, mRNA レベルを RT-PCR 検査を用いて比較した。MagNA Pure RNA isolation kit (Roche, Tokyo, Japan) と MagNalyser (Roche) を用いて各群の破裂好発血管の total RNA を分離・抽出した。Total RNA の cDNA への逆転写には Transcriptor Universal cDNA Master (Roche)

を, RT-PCR には LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan) を使用した。PCR 条件は, 95 $^{\circ}\text{C}$  10分, 95 $^{\circ}\text{C}$  10秒, 60 $^{\circ}\text{C}$  10秒, 72 $^{\circ}\text{C}$  8秒のサイクルを40回行い, ER $\alpha$ , ER $\beta$ , NLRP3, IL-1 $\beta$ , Sirt1, MMP-9およびグリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) の mRNA 発現量を測定した。結果は, GAPDH の mRNA 発現量に対して標準化した。

プライマーとして以下を用いた。ER $\alpha$  : Forward : 5'-TGC ACC ATC GAT AAG AAC C-3', Reverse : 5'-GTC TCC TGA AGT GCC CAT T-3'。ER $\beta$  : Forward, 5'-CTG CAT GGC TGA GCG ACA A-3', Reverse : 5'-AGA GAC TCA TGG GAC TCA GAT-3'。NLRP3 : Forward : 5'-TGG ATC TTT GCA GCG ATC AAC-3', Reverse : 5'-CAC TCC TCT TCA AGG CTG TC-3'。IL-1 $\beta$  : Forward : 5'-TGC AGG CTT CGA GAT GAA C-3', Reverse 5'-AGC TCA TGG AGA ATA CCA CTT G-3'。Sirt1 : Forward : 5'-CCA GAA CAG TTT CAT AGA GCC, Reverse : 5'-CAC TTC ATG GGG TAT AGA ACT TG-3'。MMP-9 : Forward 5'-CCT GGA ACT CAC ACA ACG-3', Reverse : 5'-GAG GTC ATA GGT CAC GTA GG-3'。GAPDH : Forward : 5'-TAC ACT GAG CAC GTT G-3', Reverse : 5'-CCC TGT TGC AGT CAT A-3'。

#### ヒト脳血管細胞系での検討

ヒト脳血管内皮細胞 (human brain endothelial cells : HBECs) は, ScienCell Research Laboratories (Carlsbad, CA 92008, USA) から, ヒト脳血管平滑筋細胞 (human brain smooth muscle cells : HBSMCs) は, Cell Biologics (Chicago, IL, USA) から入手した。

エストロゲン欠乏状態の細胞培養には, エストロゲン除去したウシ胎児血清を添加した培養液 (phenol red-free minimum essential medium) を使用した<sup>13)</sup>。次に, HBECs および HBSMCs に $10^{-6}\text{M}$ の ER $\alpha$ 受容体作用薬である propylpyrazoletriol (PPT, Sigma, H6036) および ER $\beta$ 受容体作用薬である diarylpropionitrile (DPN, Sigma, H5915), Human AngiotensinII (Sigma A9525), 17 $\beta$ -estradiol ( $10^{-7}\text{M}$ ) を添加し, 24時間処理した後, Western Blot 解析のために細胞を回収した。vehicle control

は、17 $\beta$ -estradiol, PPT, DPN および Angiotensin II の非存在下でのエストロゲンを含むウシ胎児血清を添加した培養液を用いた。

#### Western Blot 解析

サンプルは、プロテアーゼ/ホスファターゼ阻害剤カクテル (Cell Signaling Technology 社, #5872) を含む RIPA buffer で均質化した。タンパク質濃度は、BCA kit (Thermo Fisher Scientific, USA) を用いて測定し、タンパク質 (30 $\mu$ g) を SDS-PAGE で分離し、polyvinylidene fluoride membranes (immune-blot PVDF membrane, IO-RAD) に移した。一次抗体として、ER $\alpha$  (rabbit, ab32063), ER $\beta$  (rabbit, ab3576), 内皮型一酸化窒素合成酵素 (endothelial nitric oxide synthase: eNOS) (mouse, ab76198), Sirt1 (mouse, ab110304), NADPH oxidase 4 (NOX4) (rabbit, ab133303), NLRP3 (rabbit, ab214185), IL-1 $\beta$  (Cell Signaling, mouse, #12242), MMP-9 (rabbit, ab76003),  $\beta$ -actin (Sigma-Aldrich, #A5441) を用いた。Amersham ECL prime Western blotting detection reagents (GE Healthcare, UK) で検出し、Lumino 画像分析装置 (Image Quant LAS4000 mini, GE Healthcare, UK) および NIH ImageJ 1.52 ソフトウェアを用いて解析した。

#### 統計解析

統計解析には Prism version 7.0 software (GraphPad) を用いた。脳動脈瘤破裂の発生頻度の解析には Fisher's exact test を使用した。SAH なし生存率は log-rank 検定で解析した。多群間のデータは、one-way ANOVA 解析に続いて、Kruskal-Wallis 検定を行った。2群間のデータは、Student's t-test を用いて解析した。データは平均値 $\pm$ SD で示し、P < 0.05の場合に統計的有意差があるとした。

#### 結 果

・破裂好発血管 (後大脳動脈) において NLRP3 の発現増加と ER $\alpha$  の発現低下を認めた。

OVX+ラットと OVX-ラットとも脳動脈瘤誘導処置を

行うと、その2週間後から、高血圧が誘導され、卵巣摘出の有無による血圧の差は見られなかった (Fig. 1B)。OVX+ラットは OVX-ラットに比べて体重の増加を認めた (Fig. 1C)。脳動脈瘤破裂は前交通動脈や後大動脈に発生し (Fig. 1D)、OVX+ラットは OVX-ラットと比較して脳動脈瘤破裂の頻度が有意に高く (47% vs 16%, p = 0.03; Fig. 1E), SAH による死亡率も高かった (Fig. 1F)。

OVX+ラットの破裂好発血管である後大脳動脈において、ER $\alpha$  発現低下と ER $\beta$ , NLRP3, IL-1 $\beta$ , MMP-9 の発現上昇を認めた (Fig. 2)。mRNA レベルでも、OVX+ラットの破裂好発血管では ER $\alpha$  の低下と NLRP3, IL-1 $\beta$ , MMP-9 の上昇を認めた (Fig. 3)。

・エストロゲン欠乏状態の脳血管細胞系において NLRP3 の上昇は Sirt1 の低下に関連した。

OVX+ラットの破裂好発血管で Sirt1 の低下を認めており (Fig. 3)、エストロゲン欠乏状態 (E2-) の HBECs と HBSMCs においても ER $\alpha$  と Sirt1 の低下、NLRP3 の上昇を認めた (Fig. 4A and B)。HBSMCs において、Angiotensin II の添加によって高血圧状態を誘導したが<sup>14)</sup>、Angiotensin II では、Sirt1 や NLRP3 の発現に影響は認めなかった (Fig. 4A)。このことより、高血圧よりエストロゲン欠乏の方が Sirt1 の低下や NLRP3 の上昇に影響していることが示唆された。

・エストロゲン欠乏による ER $\alpha$  と Sirt1 の低下は、NLRP3, IL-1 $\beta$ , MMP-9 の発現を増加させた。

エストロゲン欠乏状態の HBECs では、ER $\alpha$  と Sirt1 の低下は、eNOS の低下と NOX4 の上昇に関連しており、酸化ストレスの関与が示唆された (Fig. 4B)。また NLRP3 の上昇と一致して、IL-1 $\beta$  および MMP-9 の発現上昇を認めた (Fig. 4C)。

エストロゲン欠乏状態の HBECs では、エストロゲンである 17 $\beta$ -estradiol を添加することによって ER $\alpha$ , Sirt1, eNOS の低下と NOX-4, NLRP3 の上昇は改善した (Fig. 5A)。エストロゲン欠乏状態の HBSMCs においても、ER $\alpha$ , Sirt1 の低下と NLRP3, IL-1 $\beta$ , MMP-9 の上昇は、17 $\beta$ -estradiol を添加することによって改善した (Fig. 5B)。

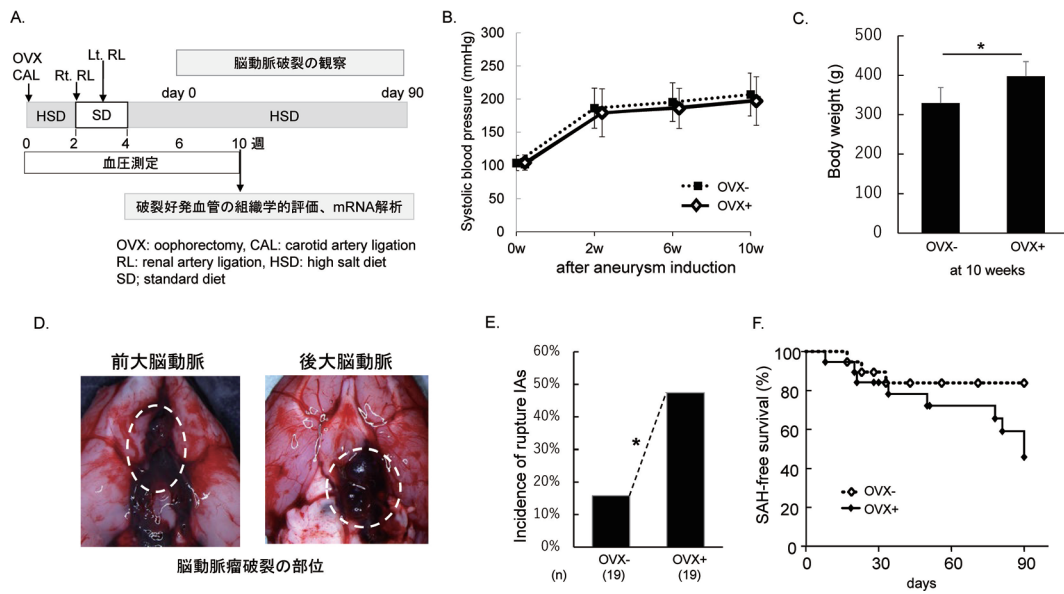


Figure 1 : OVX+ラットと OVX-ラットにおける脳動脈瘤の特徴  
 A : 実験プロトコル。B : 脳動脈瘤誘導前および誘導後 2, 6, 10週目の収縮期血圧。C : 脳動脈瘤誘導後10週目の体重 (各群16匹)。\* $p < 0.05$ , Student's t-test。平均±SD。D : OVX+ラットの前交通動脈と後大脳動脈の破裂脳動脈瘤。E : OVX+ラットと OVX-ラットの脳動脈瘤破裂の発生率。\* $p = 0.03$ , Fisher's exact test。F : OVX+および OVX-ラットにおける SAH (Subarachnoid hemorrhage) なしの生存率。

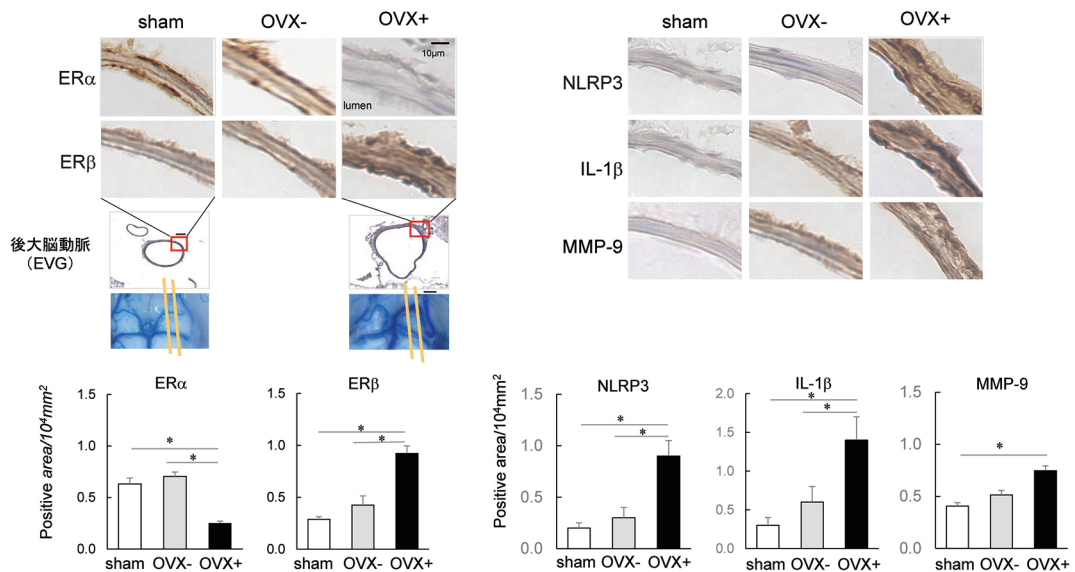


Figure 2 : ERα, ERβ, NLRP3, IL-1β, MMP-9の免疫組織染色とElastica van Gieson (EVG) 染色。切片は黄色の線で示すように左後大脳動脈で垂直に切断した。赤枠は血管が破裂しやすい部分を示す。陽性領域は BZ-X710で解析。平均±SD。\* $p < 0.05$ , Kruskal-Wallis 検定。

これらのことより, Sirt1および ERαの低下が酸化ストレスを引き起こし, 血管壁における NLRP3/IL-1/MMP-9経路の活性化をきたすと考えられた (Fig. 5C)。

・ERα受容体作用薬は, エストロゲン欠乏による ERαと Sirt1の低下および NLRP3の上昇を改善させた。エストロゲン欠乏状態の HBECs および HSMCs に



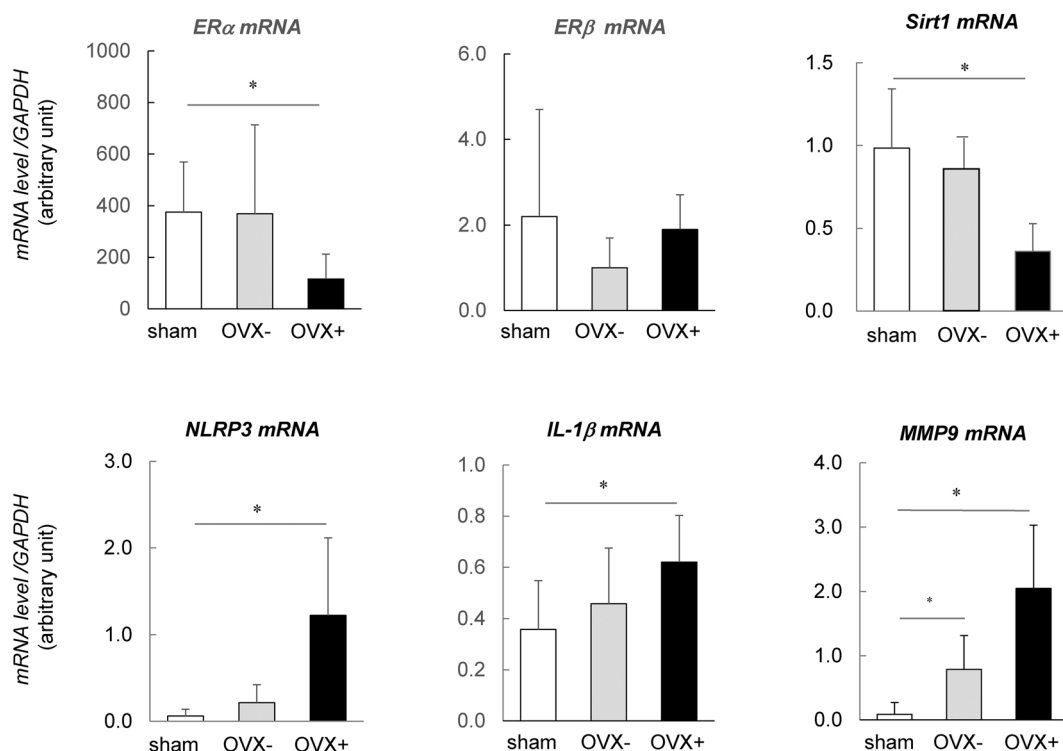


Figure 3 : OVX+ラット, OVX-ラット, sham ラットにおける ER $\alpha$ , ER $\beta$ , Sirt1, NLRP3, IL-1 $\beta$ , MMP-9の mRNA 解析 (RT-PCR 検査)。平均 $\pm$ SD (各群 8 匹)。\* $p$ <0.05, Kruskal-Wallis 検定。

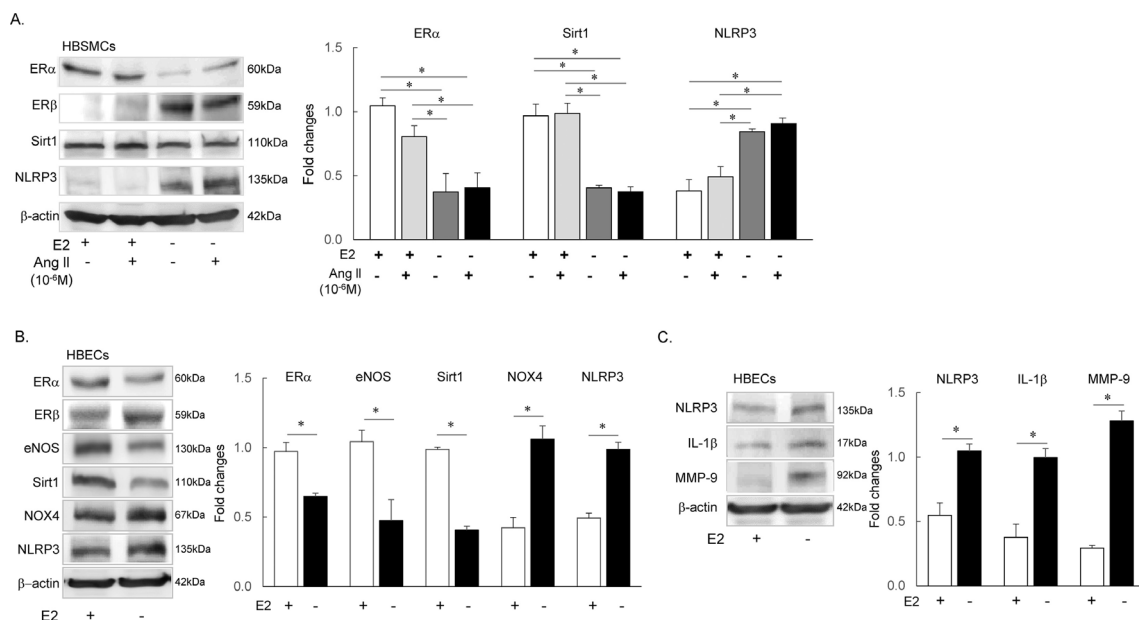


Figure 4 : HBECs, HBSMCs におけるエストロゲン欠乏の影響  
 A : エストロゲン欠乏状態 (E2-) で, Angiotensin II (Ang II, 10<sup>-6</sup>M) 添加または非添加した HBSMCs における ER $\alpha$ , Sirt1, および NLRP3 の Western Blot 解析。B : エストロゲンあり (E2+) と, またはエストロゲンなし (E2-) で培養した HBECs における ER $\alpha$ , eNOS, Sirt1, NOX4, および NLRP3 の Western Blot 解析。  
 C : HBECs における NLRP3, IL-1 $\beta$ , および MMP-9 の Western Blot 解析。平均 $\pm$ SD。\* $p$ <0.05, Student's t-test, Kruskal-Wallis 検定。

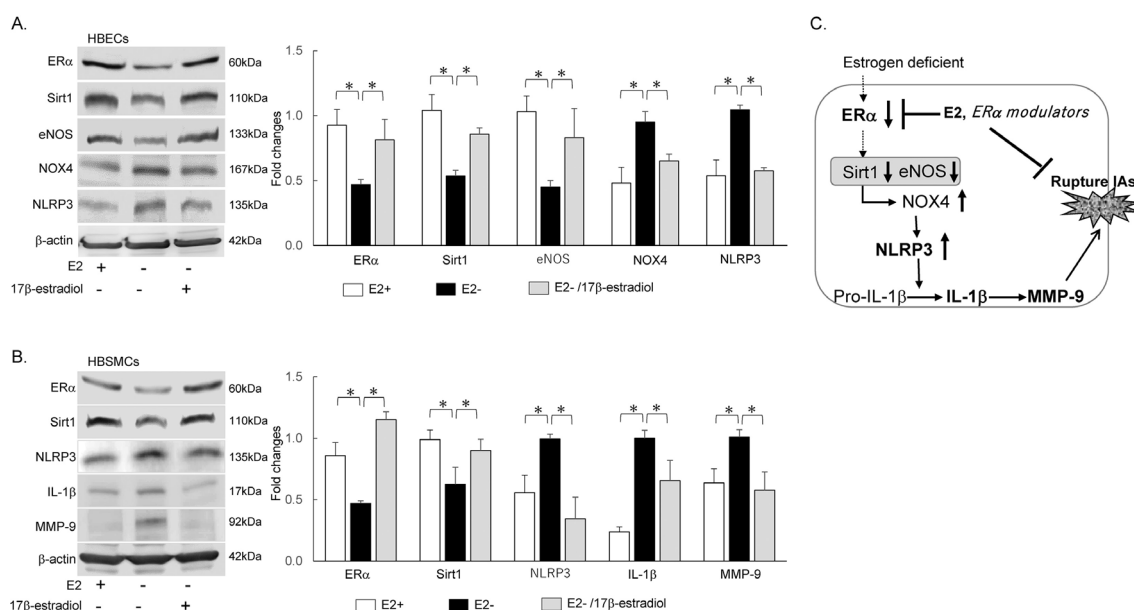


Figure 5 : エストロゲン欠乏状態 (E2-) での HBECS および HBSMCs に対する 17β-estradiol の影響。

A : HBECS における Western Blot 解析。17β-estradiol (10<sup>-7</sup>M) の添加により、エストロゲン欠乏状態で見られた ERα, Sirt1, eNOS の低下と NOX4, NLRP3 の上昇が改善した。B : HBSMCs における Western Blot 解析。17β-estradiol (10<sup>-7</sup>M) の添加によってエストロゲン欠乏状態で見られた ERα, Sirt1 の発現低下、ならびに NLRP3, IL-1β, MMP-9 の上昇が改善した。平均±SD。\*p < 0.05, Kruskal-Wallis 検定。C : 脳動脈瘤の血管壁におけるエストロゲン欠乏の影響の模式図。

において、ERα, Sirt1 の低下と NLRP3 の上昇は、ERα 受容体作用薬 (PPT) の添加により改善されたが (Fig. 6A and B), ERβ 受容体作用薬 (DPN) の添加では影響されなかった (data not shown)。エストロゲン受容体モジュレーターである BAZ を脳動脈瘤ラットモデルに投与することにより、エストロゲン欠乏状態によって観察された ERα と Sirt1 の低下と NLRP3 の上昇は正常化し (Fig. 6C), SAH の抑制により生存期間が改善された (Fig. 6D)。エストロゲン受容体モジュレーターによる ERα と Sirt1 の改善を介した脳動脈瘤の破裂抑制の可能性が示唆された。

## 考 察

本研究では、卵巣摘出によってエストロゲン欠乏を誘導した脳動脈瘤ラットモデルの破裂好発血管である後大脳動脈において、ERα と Sirt1 の低下と NLRP3/IL-1β/MMP-9 経路の活性化が関連していることを報告した。また、ERα と Sirt1 の低下、NLRP3 の上昇は、エ

ストロゲン欠乏に依存しており、Angiotensin II の添加には影響されなかった。これらのことはエストロゲン欠乏による ERα と Sirt1 の低下が、高血圧の影響とは別に、NLRP3 を活性化する可能性を示唆している。エストロゲン欠乏状態で培養した HBECS では、ERα と Sirt1 の低下により、NOX4 の上昇と eNOS の低下を認め、活性酸素の発生によって NLRP3, IL-1β, MMP-9 が上昇すると考えられた。これらの変化は、17β-estradiol, あるいは ERα 受容体作用薬である PPT を添加すると改善したが、ERβ 受容体作用薬である DPN では変化しなかった。以上より、脳動脈瘤破裂は、少なくとも部分的には、エストロゲン欠乏による ERα および Sirt1 の低下を介した NLRP3/IL-1β/MMP-9 経路の活性化に起因していることが示唆された。

ERα と ERβ は異なる細胞や組織に対してさまざまに作用し、NLRP3 と ERs との関係は経路や組織によって異なると報告されている<sup>15,16</sup>。Zhang らは、破裂した脳動脈瘤の血管壁に NLRP3 の発現が上昇することを報告している<sup>17</sup>、われわれの知る限りでは、脳動脈瘤にお

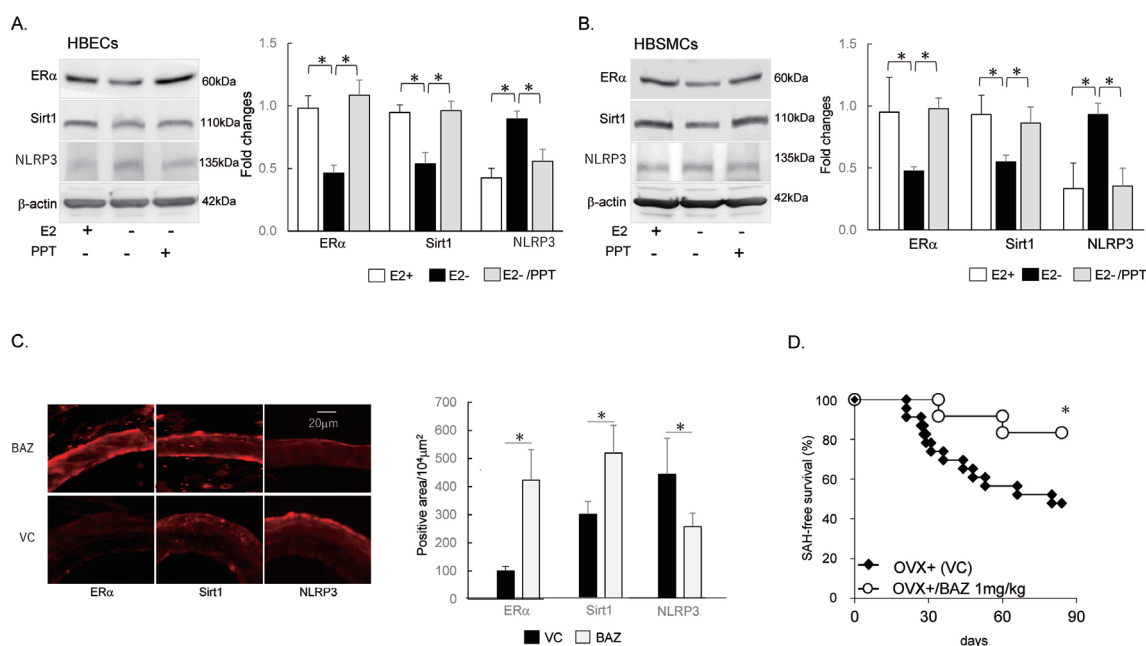


Figure 6 : HBECs, HBSMCs および血管壁におけるエストロゲン受容体モジュレーターの効果  
 A および B : ER $\alpha$  受容体作用薬である PPT (propylpyrazoletriol, 10<sup>-6</sup>M) を添加または非添加で培養した HBECs (A) および HBSMCs (B) における ER $\alpha$ , Sirt1, および NLRP3 の Western Blot 解析。平均 $\pm$ SD。  
 \*p<0.05, Kruskal-Wallis 検定。  
 C : vehicle control 群 (VC) および Bazedoxifene (BAZ, 1.0 mg/kg/日) を投与した脳動脈瘤ラットの血管壁での ER $\alpha$ , Sirt1, および NLRP3 の蛍光免疫染色。C : BAZ を投与すると、脳動脈瘤ラットモデルにおいて SAH (Subarachnoid hemorrhage) なしの生存期間が延長した。\*p < 0.05, log-rank test。

いて ERs 発現低下と関連した NLRP3 活性化の報告はみられなかった。Novella らの *in vitro* 研究では<sup>18)</sup>, 閉経初期のエストロゲンの暴露により炎症性サイトカインの発現が低下することを報告しており、エストロゲンの効果は時間依存的であることが示唆されている。本研究の脳動脈瘤ラットモデルでは、卵巣摘出術によりエストロゲン欠乏が誘導されており、卵巣摘出術後の早期に更年期障害に類似した病態をもたらしていると考えられた。Sirt1 の活性化は、ヒト臍帯静脈内皮細胞において NLRP3 の発現を抑制することが示され、さらに、ヒト血管平滑筋細胞において Sirt1 は、DNA 障害と内膜変性から保護し、動脈硬化を抑制すると報告されている<sup>19)</sup>。Sirt1 の低下が NLRP3 の活性化、IL-1 $\beta$  や MMP-9 の上昇を促進し、脳動脈瘤破裂の一つの要因になることが考えられた。

エストロゲンである 17 $\beta$ -estradiol の投与は、大動脈の Sirt1 発現を回復させ、eNOS を活性化し、卵巣摘出によ

る動脈の老化と動脈硬化の進展を遅らせ、エストロゲン受容体モジュレーターである BAZ の投与もまた、動脈の老化と動脈硬化の進展を抑制しながら Sirt1 の発現を増強したと報告されている<sup>20)</sup>。したがって、エストロゲンまたは BAZ の投与は、Sirt1 の低下によって引き起こされる有害な変化を減少させると考えられる。

本研究には、いくつかの問題点がある。脳動脈瘤は血管の分岐部などに未破裂脳動脈瘤が形成され、その後に破裂して、SAH をきたす。この脳動脈瘤ラットモデルの未破裂脳動脈瘤は短期間で破裂しやすいため、破裂した脳動脈瘤の数は数えることができたが、未破裂脳動脈瘤の数は数えることができなかった。さらに、脳動脈瘤形成および破裂が多因子性であることを考慮すると、われわれの研究で扱われていないメカニズムによる脳動脈瘤破裂への寄与を排除することはできない。同様に、HBECs と HBSMCs を用いた *in vitro* 試験では、エストロゲン欠乏状態を部分的に模倣したが、臨床現場で見ら

れるような状態を正確に再現しているわけではない。

## 結 語

エストロゲン欠乏状態の脳動脈瘤モデルにおいて、ER $\alpha$ およびSirt1の低下がNLRP3/IL-1 $\beta$ /MMP-9経路を活性化し、脳動脈瘤破裂に寄与していると考えられた。本研究から得られた知見は、閉経後早期のエストロゲンの調節、特に薬物治療によるER $\alpha$ の維持を行うことにより、脳動脈瘤の破裂予防に寄与できる可能性があると思われた。

## 文 献

- 1) Nakagawa, T., Hashi, K.: The incidence and treatment of asymptomatic, unruptured cerebral aneurysms. *J Neurosurg.*, **80**(2) : 217-23, 1994
- 2) Brown, R. D. Jr., Broderick, J. P.: Unruptured intracranial aneurysms : epidemiology, natural history, management options, and familial screening. *Lancet Neurol.*, **13**(4) : 393-404, 2014
- 3) Phillips, L. H., 2nd, Whisnant, J. P., O'Fallon, W. M., Sundt, T. M., Jr.: The unchanging pattern of subarachnoid hemorrhage in a community. *Neurology.*, **30**(10) : 1034-40, 1980
- 4) Algra, A. M., Klijn, C. J., Helmerhorst, F. M., Algra, A., *et al.*: Female risk factors for subarachnoid hemorrhage : a systematic review. *Neurology.*, **79** : 1230-6, 2012
- 5) de Rooij, N. K., Linn, F. H., van der Plas, J. A., Algra, A., *et al.*: Incidence of subarachnoid haemorrhage : a systematic review with emphasis on region, age, gender and time trends. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.*, **78**(12) : 1365-1372, 2007
- 6) Miyamoto, T., Kung, D. K., Kitazato, K. T., Yagi, K., *et al.*: Site-specific elevation of interleukin-1 $\beta$  and matrix metalloproteinase-9 in the Willis circle by hemodynamic changes is associated with rupture in a novel rat cerebral aneurysm model. *J Cereb Blood Flow Metab.*, **37**(8) : 2795-2805, 2017
- 7) Yamaguchi, T., Miyamoto, T., Kitazato, K. T., Shikata, E., *et al.*: Time-dependent and site-dependent morphological changes in rupture-prone arteries : ovariectomized rat intracranial aneurysm model. *J Neurosurg.*, **133**(5) : 1486-1494, 2020
- 8) Usui, F., Shirasuna, K., Kimura, H., Tatsumi, K., *et al.*: Inflammasome activation by mitochondrial oxidative stress in macrophages leads to the development of angiotensin II-induced aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, **35**(1) : 127-136, 2015
- 9) Cicolari, S., Catapano, A. L., Magni, P.: Inflammaging and neurodegenerative diseases : role of NLRP3 inflammasome activation in brain atherosclerotic vascular disease. *Mech Ageing Dev.*, **195** : 111467, 2021
- 10) Ridker, P. M., MacFadyen, J. G., Glynn, R. J., Koenig, W., *et al.*: Inhibition of interleukin-1 $\beta$  by canakinumab and cardiovascular outcomes in patients with chronic kidney disease. *J Am Coll Cardiol.*, **71**(21) : 2405-2414, 2018
- 11) Winnik, S., Auwerx, J., Sinclair, D. A., Matter, C. M.: Protective effects of sirtuins in cardiovascular diseases : from bench to bedside. *Eur Heart J.*, **36**(48) : 3404-3412, 2015
- 12) Maekawa, H., Tada, Y., Yagi, K., Miyamoto, T., *et al.*: Bazedoxifene, a selective estrogen receptor modulator, reduces cerebral aneurysm rupture in Ovariectomized rats. *J Neuroinflammation.*, **14**(1) : 197, 2017
- 13) Tamura, T., Jamous, M. A., Kitazato, K. T., Yagi, K., *et al.*: Endothelial damage due to impaired nitric oxide bioavailability triggers cerebral aneurysm formation in female rats. *J Hypertens.*, **27**(6) : 1284-1292, 2009
- 14) Young, C. N., Davisson, R. L.: Angiotensin-II, the brain, and hypertension : an update. *Hypertension.*, **66**(5) : 920-926, 2015



- 15) Leitman, D. C., Paruthiyil, S., Vivar, O. I., Saunier, E. F., *et al.*: Regulation of specific target genes and biological responses by estrogen receptor subtype agonists. *Curr Opin Pharmacol.*, **10**(6) : 629-636, 2010
- 16) Miller, V. M., Duckles, S. P.: Vascular actions of estrogens : functional implications. *Pharmacol Rev.*, **60**(2) : 210-241, 2008
- 17) Zhang, D., Yan, H., Hu, Y., Zhuang, Z., *et al.*: Increased expression of NLRP3 inflammasome in wall of ruptured and unruptured human cerebral aneurysms : preliminary results. *J Stroke Cerebrovasc Dis.*, **24**(5) : 972-979, 2015
- 18) Novella, S., Heras, M., Hermenegildo, C., Dantas, A. P.: Effects of estrogen on vascular inflammation : a matter of timing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, **32**(8) : 2035-2042, 2012
- 19) Gorenne, I., Kumar, S., Gray, K., Figg, N., *et al.*: Vascular smooth muscle cell sirtuin 1 protects against DNA damage and inhibits atherosclerosis. *Circulation.*, **127**(3) : 386-396, 2013
- 20) Sasaki, Y., Ikeda, Y., Miyauchi, T., Uchikado, Y., *et al.*: Estrogen-SIRT1 axis plays a pivotal role in protecting arteries against menopause-induced senescence and atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb.*, **27**(1) : 47-59, 2020

## *Activation of NLRP3/IL-1 $\beta$ /MMP-9 pathway via depletion of ER $\alpha$ and Sirt1 contributes to intracranial aneurysm rupture in estrogen-deficient rats*

*Tadashi Yamaguchi, Izumi Yamaguchi, Masaaki Korai, Kenji Shimada, Yoshiteru Tada, Keiko T. Kitazato, Yasuhisa Kanematsu, and Yasushi Takagi*

*Department of Neurosurgery, Graduate School of Biomedical Sciences, Tokushima University, Tokushima, Japan*

### SUMMARY

**Objective :** Subarachnoid hemorrhage (SAH) due to rupture of intracranial aneurysm is often a devastating event. Since the incidence of SAH increases, especially in menopause, it is crucial to clarify the detailed pathogenesis of these events. We tested our hypothesis that, under estrogen-deficient conditions, activation of vascular nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor family pyrin domain-containing 3 (NLRP3) inflammasomes via down-regulation of estrogen receptor (ER) and sirtuin1 (Sirt1) facilitates the ruptured intracranial aneurysms.

**Methods :** Ten-week-old female Sprague-Dawley rats with and without oophorectomy (OVX<sup>+</sup> and OVX<sup>-</sup> rats, respectively) were subjected to hemodynamic changes and hypertension and fed a high-salt diet. Using human brain endothelial cells (HBECs) and smooth muscle cells (HBSMCs), we tested the effect of estradiol, ER agonists.

**Results :** In OVX<sup>+</sup> rats, the frequency of intracranial aneurysm rupture was significantly higher than in OVX<sup>-</sup> rats ( $p=0.03$ ). In the left posterior cerebral artery prone to rupture in OVX<sup>+</sup> rats, the levels of the mRNAs encoding ER $\alpha$  and Sirt1, but not of that encoding ER $\beta$ , were decreased and the levels of the mRNAs encoding NLRP3, interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) were elevated. Immunohistochemistry, the expression profiles of these proteins were correlated with their mRNA levels. Treatment with an ER modulator, bazedoxifene, normalized the expression profiles of these proteins and improved SAH-free survival. In HBECs and HBSMCs grown under estrogen-free conditions, the elevation of NLRP3, IL-1 $\beta$ , MMP-9, and the depletion of ER $\alpha$  and Sirt1, were counteracted by exposure to an ER $\alpha$  agonist, but not an ER $\beta$  agonist.

**Conclusions :** The down-regulation of ER $\alpha$  and Sirt1 by estrogen deficiency may contribute to the activation of the NLRP3/IL-1 $\beta$ /MMP-9 pathway, facilitating the rupture of intracranial aneurysms.

**Key words :** estrogen deficiency, estrogen receptor, intracranial aneurysm, NLRP3 inflammasome, Sirt1