

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 24 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591592

研究課題名（和文） 頸部頸動脈狭窄症のプラークにおける IDO の役割と病態の解明

研究課題名（英文） Role of indoleamine-2,3-dioxygenase in atherosclerotic carotid artery stenosis

研究代表者

陶山 一彦 (SUYAMA KAZUHIKO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・客員研究員

研究者番号：60236057

研究成果の概要（和文）：

頸動脈狭窄症におけるトリプトファン代謝産物(IDO)の関与を手術症例において検査した。高分解能MRIなどの画像検査では臨床的に問題となる不安定プラークの検出は可能であるが、血液生化学的には現時点で信頼性が高いマーカーは見いだされていない。IDOの局在とプラークの形態・性状との関連について免疫組織化学的に解析中である。

研究成果の概要（英文）：

We studied clinical implication of indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO), a tryptophan metabolite, for plaque instability in patients undergoing endarterectomy for atherosclerotic carotid stenosis. Although radiological examination such as high-resolution MR plaque imaging could detect plaque instability, any of serological markers has not yet been established. Relevance of local existence of IDO and characteristics of carotid plaque is immuno-histochemically under investigation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 22 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
平成 23 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
平成 24 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,120,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：脳血管障害学

1. 研究開始当初の背景

(1) 頸部頸動脈狭窄症は食生活の欧米化に伴い近年本邦においても増加の一途にあるが、その本体は動脈硬化としての粥腫（プラーク）形成である。頸動脈プラークは脳梗塞

の原因として重要であり、症候の初発や再発を予防すべく、頸動脈内膜剥離術(CEA)やステント留置術(CAS)などの外科治療が行われている。狭窄度のほかプラークの性状や形態は症候と強く関係しており、潰瘍形成や頸動脈エコーでの低輝度病変などは症候性とな

りやすく、いわゆる不安定プラークと呼ばれ、病理学的には豊富な脂質コアと薄い線維性被膜を有し、炎症細胞浸潤やプラーク内出血が見られるものである。このようなリスクが高い病変を正確に診断し、病態を把握することは治療方針を決定する上で重要であるが、近年頸動脈狭窄症において画像診断と炎症マーカー等を組み合わせた臨床報告が散見される。これらはプラーク局所での炎症が病変の進展や症候の有無に関連し、免疫応答を修飾することで病態を改善させうる可能性を示唆している。

(2) Indoleamine-2, 3-dioxygenase (IDO) は、必須アミノ酸であるトリプトファンを基質としインターフェロン(IFN) γ や TNF- α により酵素誘導され、dendritic cell において iNOS とともに T cell modulator として機能している。一方プラークにおける炎症の関与として CD40/CD40L を介した dendritic cell/マクロファージと T cell との相互作用が注目されている。(CD4) T cell はプラーク内に常在し MHC クラス II に結合した断片として提示される蛋白抗原(酸化 LDL やクラミジアなど)を認識するが、プラークの進展やその破綻においてはこれらの活性化は必須であり、局所での調整機序の解明が待たれる。IDO に関しては血中関連物質の測定値が女性において初期硬化病変のマーカーになり得るという報告はあるものの、頸動脈病変における全般的意義は確立していない。

2. 研究の目的

局所免疫応答と組織学的・画像診断学的な観点から頸動脈狭窄症のプラーク不安定性・症候化における IDO の関与の報告はなく、これらを研究することで頸動脈プラークの形成・進展の分子メカニズム解明につながる可能性がある。当院で外科治療(CEA)を行う頸動脈狭窄症の症例から得られる手術標本と画像・臨床・生化学所見を比較検討する。IDO 局在とプラークの形態・性状との病理学的関連を探る。血中 IDO 関連物質を分析し、高感度(hs)-CRP などの炎症関連因子と比較して症候との関連を検討する。これらを通じて、頸動脈狭窄病変における IDO の意義を総合的に明らかにする。

3. 研究の方法

研究対象は当院で外科治療(CEA)を行う症候性・無症候性の頸動脈狭窄症の症例である。手術前に画像検査、生化学検査、臨床検査を

行い、手術で得られた病理標本(プラーク)において免疫組織化学的検査を行う。

(1) 高分解能 MRI を用いたプラーク画像診断と機能形態的評価

対象症例に 3T MRI (GE 横河 3T Signa HDx) を用いて T1 強調像、T2 強調像、proton 強調像、time of flight (TOF) 画像を撮影しプラークの評価を行う。image quality を高めるため sequence によっては脂肪抑制を併用する。ガドリニウム造影剤の使用で新生血管を描出し、また鉄分子を含有した造影剤(フェルカルボラン)を用いた 3D-GRASS 法でプラーク内のマクロファージの集積を描出する。血管内腔側の線維性被膜は主として TOF 画像で描出する。

(2) 病理標本に対する免疫組織化学的検査

摘出標本をホルマリン固定し H&E 染色、Azan 染色、EVG 染色、鉄染色を行い、プラークの形態(潰瘍など)と機能評価(脂質成分、線維成分、出血、壊死、石灰化、線維性皮膜などの性状分析)を行う。それぞれの病変は American Heart Association (AHA) の病理組織学的分類で評価する。免疫染色においては非特異的反応 blocking を行い、1 次抗体を作用させ、さらに蛍光ラベルした 2 次抗体を作用させ蛍光顕微鏡で観察する。マクロファージ、T cell、好中球、血小板、内皮細胞、血管平滑筋、微小血管(vWF)、ミエロペルオキシダーゼ、エラスターゼに対するモノクローナル抗体、ならびに neopterin に対するポリクローナル抗体を使用する。IDO はマウス抗ヒトモノクローナル抗体を用いる。dendritic cell は S-100/fascin 抗体を用いて同定し image analyzer での信号強度を評価する。画像はコンピューターに取り込み、定量化して統計学的解析を行う。本研究においては免疫担当細胞の組織内分布が重要であるため、2 重染色(マクロファージ/鉄、マクロファージ/IDO/neopterin)を行い、その局在を正確に評価する。

(3) 血中 IDO 関連物質・炎症マーカーの測定

必須アミノ酸であるトリプトファンは炎症巣で誘導された IDO によりキヌレニンへと代謝されるため、血清 L-kynurenine / L-tryptophan の測定比 (KYN/TRP) が IDO 活性を反映すると報告されている。本研究では対象症例の L-kynurenine, L-tryptophan を HPLC / spectro-photometer を用いて測定する。また血漿 neopterin を HPLC + fluorimetric detector を用いて測定する。

さらに他の炎症マーカーの血清 hs-CRP、IL-6、可溶性 CD40L、フィブリノゲンも測定する。

(4) 臨床データを合わせた総合的解析

対象症例を症候の有無や発症形式でグループ化し、神経学的評価、既往症ほかの背景因子、血液生化学検査、画像検査（MRI、脳血管撮影、造影 CT、頸部エコー等）および発症から手術までの時間、術中（モニタリング）所見等の臨床データを整理し、病理所見と合わせて比較検討する。周術期には WBA-Neo (ISK medical) を用いて血小板凝集能を測定し、合わせて検討を行う。血小板凝集能は 4 濃度の collagen, ADP を凝集惹起物質として用い凝集閾値係数 (PATI) として算出後に整数 grading で評価する。

4. 研究成果

(1) 3T MRI プラークイメージングでは脂肪抑制に優れた IDEAL 法を用いた T1 強調画像と 3D TOF が極めて有用であった。対象症例でそれぞれの sequence におけるプラーク内の ROI と胸鎖乳突筋の信号強度比を算出した。T1 強調画像においては信号強度比カットオフ 1.5 で不安定プラーク（脂質コアが 50%以上と規定）に対する感度 90%・特異度 100%、カットオフ 2.0 でプラーク内出血（抗 glycophorin A 抗体染色で 20%を超えるものと規定）に対する感度 70%・特異度 100%であり、他の画像診断法よりも信頼度が高かった。しかしながらプラーク不安定性の別の指標である fibrous cap の菲薄化・連続性の有無に関しては、いかなる sequence を用いても定量的評価は困難であった。

(2) 上記の結果をふまえ、おのおのの組織切片で抗 neopterin ポリクローナル抗体、抗 IDO モノクローナル抗体、抗 S-100/fascin 抗体を用いた組織化学的検査（image analyzer での信号強度評価）を行い解析中である。

(3) 対象症例において血清 L-kynurenine, L-tryptophan の測定比 (KYN/TRP) を算出した。KYN/TRP は体格指数 (BMI) と有意な相関が見られた。また動脈硬化指数 (AI) の cut off 4 とした場合に KYN/TRP が高い傾向が見られた。各臨床データに基づくグループ別での解析が進行中である。

(4) WBA-Neo を用いた血小板凝集能測定では、CEA 術前には 7%が血小板機能亢進（凝固非抑制）状態、14%過抑制状態であった。前者では

術後の虚血性合併症が多い傾向 ($P=0.07$) にあったが、出血性合併症の関連因子は明らかでなかった。これらのグループ別でも組織学的所見、および他の臨床データと合わせて総合的に解析中である。また手術は種々の生理学的 monitoring を併用して行われたが、特に near-infrared spectroscopy を用いた血流遮断時の局所酸素飽和度 (rsO₂) 持続測定（変動幅を ΔrsO_2 と定義）は他の parameter と比較し簡便で信頼性が高いものの、頭蓋内の側副血行や全身血圧に影響される事が判明した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- (1) 陶山一彦、永田 泉. 頸部頸動脈狭窄症の外科治療 (CEA). Brain Nerve 62: 1301-1313, 2010
- (2) 諸藤陽一、宗 剛平、日宇 健、川久保潤一、林健太郎、北川直毅、森川 実、陶山一彦、永田 泉. 頸動脈血行再建術における術前血小板凝集能測定の有用性. No Shinkei Geka 39(5): 459-463, 2011
- (3) 林健太郎、堀江信貴、森川 実、宗 剛平、竹下朝規、陶山一彦、永田 泉. 頸動脈ステント留置中に回収されたデブリスの同定: 頸動脈内膜剥離術病理標本と対比して. JNET 5: 99-105, 2011
- (4) Horie N, Morikawa M, Ishizaka S, Takeshita T, So G, Hayashi K, Suyama K, Nagata I. Assessment of carotid plaque stability based on the dynamic enhancement pattern in plaque components with multi-detector CT angiography. Stroke 43(2): 393-398, 2012
- (5) Tateishi Y, Tsujino A, Hamabe J, Tasaki O, Morikawa M, Hayashi T, Horie N, Hayashi K, Suyama K, Nagata I. "Snake fang" sign without carotid stenosis on Duplex ultrasonography indicates high risk of artery-to-artery embolic stroke. J Neuroimaging Epub ahead of print, 2012

[学会発表] (計 4 件)

- (1) 単一施設における頸動脈狭窄症に対する CEA/CAS の使い分け
陶山一彦、永田 泉、他 第 39 回日本脳卒中の外科学会 (2010.4 盛岡市)
- (2) 3T MRI による頸動脈プラークイメージング

陶山一彦、永田 泉、他 第10回日本
頸部脳血管治療学会 (2011.6 吹田市)

- (3) 頸動脈狭窄症に対する外科治療 -画像
および抗血栓療法からみたCEA/CASの使
い分けと周術期管理-

陶山一彦、永田 泉、他 第70回日本
脳神経外科学会総会 (2011.10 横浜市)

- (4) 頸動脈内膜剥離術における rSO₂
monitoring の pitfall

陶山一彦、永田 泉、他 第23回日本
脳循環代謝学会総会 (2011.11 東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

陶山 一彦 (SUYAMA KAZUHIKO)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
客員研究員
研究者番号：60236057

(2) 研究分担者

永田 泉 (NAGATA IZUMI)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
教授
研究者番号：10198327

宗 剛平 (SO GOHEI)
長崎大学・大学病院・医員
研究者番号：80530427

馬場 史郎 (BABA SHIRO)
長崎大学・大学病院・医員
研究者番号：30530430

斎藤 邦明 (SAITO KUNIAKI)
京都大学・大学院医医学系研究科・教授
研究者番号：80262765