

平成 22 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2009
 課題番号：19591475
 研究課題名（和文） 腹部大動脈瘤のコラーゲン構造解析と力学的ストレスのコンピュータシミュレート
 研究課題名（英文） Structural analysis of collagen fiber of arterial wall in patients with abdominal aortic aneurysm
 研究代表者
 重松 邦広（SHIGEMATSU KUNIHIRO）
 東京大学・医学部附属病院・特任講師
 研究者番号：20215966

研究成果の概要（和文）：大動脈の下腸間膜動脈レベルでは外膜コラーゲン分子構造が未熟で加齢により波状構造が平坦化するとともに中膜コラーゲンの方向性が加齢により強くなった。腹部大動脈瘤ではこれらの変化に加えて及びコラーゲン密度の低下は顕著であり、腹部大動脈瘤はコラーゲンの質の変化により形成されることが推測された。しかし中膜コラーゲンは加齢により方向性が強くなるのに対して腹部大動脈瘤では方向性が失われ、コラーゲン type I 占有率は加齢による上昇に反して腹部大動脈瘤では占有率が低下していることより、瘤形成及び増大には部位特異性や加齢性変化とは異なる要因の関与も示唆された。

研究成果の概要（英文）：The structure of adventitial collagen fiber of abdominal aorta is immature around the inferior mesenteric artery and the direction of the medial collagen fiber becomes more identical in proportion to the age. In patients with abdominal aortic aneurysm, additionally, the collagen density is remarkably decreasing. However, differently from the normal aorta, the direction of medial collagen was scattered and the type I collagen decreases in volume in AAA patients. These data suggest that AAA formation does not depend on the site specificity and aging but also other factors.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：血管外科学、腹部大動脈瘤、加齢変化、コラーゲン線維

1. 研究開始当初の背景

腹部大動脈瘤（abdominal aortic aneurysm: AAA）は 60 歳以上の男性の 4-8%、女性の

0.5-1.5%に認められるとの報告があるが、一旦破裂すると救命率の低い疾患である。しかしながらその治療方針は、AAA の最大径が

基準を超えたものを手術適応として、それに満たないものは経過観察をすることを原則とし、治療法は従来からの開腹人工血管置換術や近年急速に広まっているステントグラフト内挿術などのインターベンションによるものが唯一の方法であり、他に薬物療法による臨床試験でも動脈瘤増大が抑制されたとの報告があるが臨床応用には至っていない。これら新たな治療法の確立にはAAA形成機序の解明が不可欠である。

現在のAAA形成機序に関する研究の枠組みは主として①蛋白分解酵素 (matrix metalloproteinase: MMP) による大動脈壁の分解、②炎症及び免疫反応、③力学的ストレス、④遺伝の4つに分類されるが、未だに全容は解明されていない。

2. 研究の目的

動脈瘤形成に際しては様々な要因により動脈壁の力学的強度の低下を来して動脈径が拡大すると考えられる。動脈壁を構成する成分のうち力学的強度を規定する主なものにcollagenとelastinがあるが、前者は主に強度・後者は主に弾力度を規定しており、慢性的に動脈径が拡大する動脈瘤形成にはcollagenの力学的強度の低下が必須と考えた。しかし動脈瘤壁ではcollagenが増加することが報告されており、これは動脈瘤壁においては力学的強度を規定するcollagenが増加しているにも関わらず強度が低下していることになる。collagenは常に破壊・再構築を繰り返していることから、AAAにおいてはcollagenの再構築 (remodeling) に変化が生じたためにcollagenの質の変化を生じているという仮説を立てた。

動脈瘤壁で起きているcollagenのremodelingの変化を解析する方法として、collagenを特異的に観察可能であり、動脈の層別に解析することも可能である構造解析を視覚的に行うこととし、動脈壁の強度を保つ中膜及び外膜のcollagenの構造解析を行うこととした。

一般にAAA形成には加齢変化が強く関与するとされ、またその発生部位が腎動脈分岐部の末梢に頻発するなど部位による特異性があることも知られている。従って本研究では、A) 正常大動脈のcollagenは部位特異性および加齢性に構造変化を来す
B) AAAは動脈壁collagenの質の変化により形成される
という2つの仮説を立て、これらについて視覚的に解析し検証することとした。

3. 研究の方法

正常動脈検体 (normal aorta: 以下、NA群) は剖検症例の中から非血管疾患による男性死亡例15例で年齢構成は40歳未満 (NA若年群) が5例、40歳以上60歳未満 (NA中年群) が5例、60歳以上 (NA高齢群) が5例 (27-73歳: 平均49.5歳)。各症例より、上行大動脈1か所 (①大動脈弁より5cm末梢: 以下、上行大動脈)・腹部大動脈3か所 (②上腸間膜動脈分岐レベル・③腎動脈分岐部より2cm末梢・④下腸間膜動脈分岐レベル: 以下、それぞれSMAレベル・Inf RAレベル・IMAレベル) を半周性に約1cm幅で採取した。動脈瘤検体 (以下、AAA群) は東京大学医学部附属病院血管外科にて腎動脈下腹部大動

脈瘤に対する待機的開腹人工血管置換術を施行した症例より大動脈瘤の最大径部

(n=11) および可能な症例では瘤頸部 (腎動脈分岐部やや末梢) (n=5) より動脈壁を採取した。採取した標本は10%パラホルムアルデヒド溶液に24時間含浸した。全ての標本につきHE染色及び膠原線維・弾性線維を特異的に染めるEVG染色、膠原線維を染めるPSR染色を行った。動脈壁collagenの立体構造解析にあたり、以下の5種類の解析を行った。
①走査型電子顕微鏡による膠原線維立体構造の解析

IMAレベルに限定してNA若年群及びNA高齢群 (各n=3) とAAA群 (n=4) について動脈壁collagen立体構造の全体像及び微細線維構造を把握し、正常動脈の加齢性変化とAAAの構造を比較することを目的として走査型電子顕微鏡によりcollagenを構成する要素であるcollagen bundle, collagen fiber及びcollagen fibrilの立体構造を観察した。

②フーリエ解析による膠原線維束構造の定量解析

コンピュータ解析による2次元高速フーリエ変換は生体組織の画像解析に応用可能であり、動脈壁collagen bundleの構造解析にこの技術を用いて「方向性」及び「太さ」の2つの観点から定量評価した。

対象はNA群全例 (n=15) の各4部位とAAA群の最大径部 (n=11) と瘤頸部 (n=5) の中膜および外膜とする。これにより正常動脈collagen bundleの「方向性」と「太さ」の加齢性変化及び部位特異性を検討し、さらにAAAの構造と比較してAAA形成との関連を検討した。各標本のPSR染色スライドを偏光顕微鏡下に中膜及び外膜のcollagen bundleをそれぞれ5か所ずつ無作為にデジタルカメラで写真撮影し、コンピュータで2次元Fourier変換するとパワースペクトル像が作成される。これを元にしてcollagen bundleの方向性の指標としてOrientation VariationとOrientation Ratioの二つを求め、太さの指標としてBundle Cycleを求めた。

③外膜膠原線維束の波状構造の定性解析
大動脈外膜のcollagen bundleの波状構造に加齢性変化・部位特異性がみられるかを検討するため正常動脈全例 (n=15)・各4部位について定性的に3段階に評価した。

偏光顕微鏡下にPSR染色の各標本にて外膜collagen bundle構造を確認し、その波状構造の程度を3段階に分類した。

④光路差測定による外膜膠原線維構造の定量解析

collagen bundleよりもさらに小さなcollagenの分子レベルでの構造変化を定量化する方法として、偏光顕微鏡を用いた光路差測定を利用して、NA群全例 (n=15)・各4部位とAAA群の拡大部 (n=11) を対象として、retardation値を用いて動脈壁外膜collagen分子レベル構造の加齢性変化、部位特異性及び動脈瘤形成との関連につき検討した。

⑤免疫染色によるCollagen subtypeの局在変化の解析

動脈壁の力学的強度や伸展性を規定するcollagen type I及びcollagen type IIIの局在変化を免疫染色にて検討した。対象はNA群全例 (n=15)・各4部位とAAA群の拡大部 (n=10)、瘤頸部 (n=4) とし、正常大動脈の部位特異性・加齢性変化の有無を確認してAAA形成との関連を検討することとした。

4. 研究成果

①走査型電子顕微鏡による膠原線維立体構造の解析

大動脈 IMA レベルにおいて、中膜及び外膜いずれにおいても collagen fibril の単位では走査型電顕で観察可能な範囲で加齢性変化や動脈瘤での病的変化は明らかでないが、fibril が集束した collagen fiber や bundle の単位では①密度が疎になる、② bundle が平坦化するという加齢性変化があり、AAA ではさらにそれらが顕著になっていた。

②フーリエ解析による膠原線維束構造の定量解析

NA 群の上行大動脈及び IMA レベル大動脈の中膜においては加齢により collagen bundle の方向性は強くなるが、IMA レベル大動脈の AAA 群では逆に方向性は失われていた。また中膜及び外膜の collagen bundle の太さは NA 群に比べて AAA 群では有意に太くなっていた。

③外膜膠原線維束波状構造の定性評価

IMA レベルでは他部位と異なり若年では波状構造が強いが、加齢によりやや平坦化する傾向がみられた。

④光路差測定による外膜膠原線維束構造の定量解析

外膜 collagen の分子レベルの構造変化として、NA 群における retardation 値は IMA レベルでは他部位よりも有意に低値であり、AAA 群ではさらに低値であった。つまり大動脈 IMA レベルでは元来外膜の collagen 分子構造が他部位に比べて未熟（整然性が崩れている）であり、AAA の好発部位であることの説明がつく。

⑤免疫染色による中膜 collagen subtype 局在変化の解析

NA 群ではいずれのレベルでも加齢により type I 占有率は増加するが type III では有意差はない。正常に比べて AAA では type I 占有率が低下するため相対的に type III 比率は高くなっていた。collagen type I が動脈壁の力学的強度を規定することから、中膜における強度が AAA では低下していることが推測される。

以上から正常大動脈の IMA レベルでは外膜の collagen 分子構造が未熟で加齢により波状構造が平坦化し、中膜の collagen bundle の方向性が加齢により強くなるということより、正常大動脈の collagen は部位特異性及び加齢性に構造変化を来すという仮説 A) が正しいことが示された。

さらに同時に、正常大動脈の IMA レベルでの外膜の collagen 分子構造の未熟性、加齢による波状構造の平坦化及び collagen fibril 密度の低下は AAA でさらに顕著となっていることから、AAA は動脈壁 collagen の質の変化により形成されるという仮説 B) も正しいことが推測された。

しかし一方で、中膜 collagen bundle は加齢により方向性が強くなるのに対して AAA では方向性が失われており、また collagen type I 占有率は加齢により上昇するのに対して AAA では占有率が低下していることなどより、AAA 形成及び増大には部位特異性及び加齢性変

化とは異なる要因も関与していることが示唆された。

今後これらの立体構造変化の原因となるメカニズムをさらに明らかにすることにより腹部大動脈瘤の破裂リスクの詳細な評価および非侵襲的治療法が実現することが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① 宮田哲郎、血管壁硬化のさまざまな評価法、Mebio、査読なし、24(11)、2007、56-62
- ② 出口順夫、相川真範、宮田哲郎、MMP-13/collagenase-3 の動脈硬化プラークにおける役割、脈管学、査読あり、47(3)、2007、327-331
- ③ Takayama T, Miyata T, Nagawa H, True abdominal aortic aneurysm in Marfan syndrome, J Vasc Surg, 査読あり、49, 2009, 1162-1165

[学会発表] (計 2 件)

- ① 浦部豪、橋本拓弥、高山利夫、永吉実紀子、赤木大輔、西蔭誠二、木村秀生、出口順夫、重松邦広、宮田哲郎、増大傾向を示す腹部大動脈瘤の立体構造変化の検討、第 35 回日本血管外科学会、2007 年 5 月 25 日 (名古屋)
- ② 浦部豪、出口順夫、橋本拓弥、高山利夫、永吉実紀子、高澤豊、深山正久、西蔭誠二、木村秀生、重松邦広、宮田哲郎、名川弘一、加齢によるヒト正常大動脈・腸骨動脈壁の構造変化についての検討、第 48 回日本脈管学会、2007 年 10 月 25 日 (松本)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

重松 邦広 (SHIGEMATSU KUNIHIRO)
東京大学・医学部附属病院・特任講師
研究者番号：20215966

(2) 研究分担者

宮田 哲郎 (MIYATA TETSURO)
東京大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：70190791
小山 博之 (KOYAMA HIROYUKI)
東京大学・医学部附属病院・客員准教授
研究者番号：10241994
岡本 宏之 (OKAMOTO HIROYUKI)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：60348266
木村 秀生 (KIMURA HIDEO)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：60327070
深山 正久 (FUKAYAMA MASAHISA)
東京大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：70281293

(3) 連携研究者

なし