

## 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 6 月 10 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390282

研究課題名（和文）石灰化と粥腫不安定性よりみた内膜剥離術かステントかの治療選択基準の確立

研究課題名（英文）Establishment of surgical indication for carotid endarterectomy or carotid stenting based on calcification and instability of plaques

研究代表者

山田 和雄（YAMADA KAZUO）

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：90150341

研究成果の概要（和文）：最近、増加している頸動脈狭窄の手術適応、CEA と CAS の使い分け、無症候例の症候化機構解明を目的に研究を計画した。まず石灰化との関係では CEA は全例で対応可能だが、CAS は全周性石灰化例には困難であることを示した。また症候例でプラーク内血管新生が多いことを HIF1- $\alpha$  と VEGF の免疫染色で示した。また無症候例の症候化率を全例登録前向き調査で検討し、内科的治療のみでは 2.4%/年程度であることを示した。

研究成果の概要（英文）：Carotid stenosis is increasing in number in the Japanese population. Some of the carotid stenosis becomes symptomatic and the others remain asymptomatic. For establishment of surgical indication for carotid endarterectomy or carotid stenting, we have analyzed carotid plaques with special interest of calcification and fragile plaques. We routinely used 3D-CT angiography (3D-CTA) for evaluation of carotid stenosis. We therefore tested relation between calcified carotid plaques and surgical pathology and found that partly calcified plaques can be treatable by stenting but whole calcification plaque is hard to treat by stenting. Carotid endarterectomy can handle any of calcified plaques. To detect intraplaque neovascularization, we immunostained endarterectomy specimens with hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF1- $\alpha$ ) and vascular endothelial growth factor (VEGF). The plaques from the symptomatic cases were more stained with HIF1- $\alpha$  and VEGF than asymptomatic cases suggesting plaque hypoxia and neovascularization is an important factor for symptomatic changes. We collected 807 cases of asymptomatic carotid stenosis from 39 institutions in Japan and followed up for two years. We are on the way of collecting the data. At present status, about 50% of the cases was followed for 2 years, and we found that symptomatic rate for asymptomatic cases with medical treatment was 2.4%/year, which is similar to the US study (ACAS) or Britain study (ACST).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	10,200,000	3,060,000	13,260,000
2011年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2012年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：脳神経外科学

科研費の分科・細目：脳血管障害学、脳卒中学

キーワード：頸動脈狭窄、頸動脈石灰化、頸動脈粥腫、CEA、CAS、CTA、VEGF、HIF1 $\alpha$ 、血管平滑筋細胞、マクロファージ

## 1. 研究開始当初の背景

食生活の欧米化や診断機器の普及にともない、わが国でも頸動脈狭窄症は著しく増加し、これが原因となった脳梗塞も増加し、高齢者のADLを障害する原因の1つとなっている。この治療法として内科的治療では各種の抗血小板剤による血栓形成予防と、スタチンによる動脈硬化伸展の防止と退縮をめざした方法がとられている。

また積極的外科治療として、頸動脈内膜剥離術(CEA)と頸動脈ステント留置術(CAS)があり、わが国でも急速に広がっている。しかし、どのような病変に外科的治療が必要か、またCEAかCASかについては欧米では多くの大規模試験があるが、わが国ではまたデータが得られていない。

さらに無症候性の狭窄病変も数多く見つかるようになり、一部の例では症候化することも知られている。しかし、すべての無症候性病変を外科手術することは現実的ではなく、その適応に科学的根拠が求められている。私たちの研究室では従来より頸動脈病変の3D-CTAによる診断、CEA 摘出標本の病理学的検索を行ってきたので、これらの問題に対する科学的根拠を見つけるために以下の研究を計画した。

## 2. 研究の目的

最近増加している頸動脈狭窄症の治療法として、抗血小板剤やスタチンを中心とする内科的治療の他に外科的治療があり、主に進行した症候性の病変に用いられている。この外科的治療にはCEAとCASがあり、わが国ではCAS60%、CEA40%の比率で行われている。しかしそれぞれの治療法には適応と不適応があり、これをより科学的に術前検査から判別することをこの研究の第1の目的とした。

一方、無症候性であっても病変が高度狭窄であったり、量が多い脆弱な粥腫である病変では当初から外科的治療が計画されることもある。また粥腫の中には短期間に症候化する例も少なくない。本研究では術前画像診断とCEA例の摘出組織標本を対比検討して、手術適応と手術方法の選択に科学的選択基準を持ち込むことを第2の目的として本研究を計画した。

さらに最近増加している石灰化頸動脈病変に注目し、3D-CTAによる頸動脈の石灰化度と実際の病変の脆弱度を対比検討することを第3の目的とした。

また症候化をきたす原因として、組織内の新生血管造成の程度が注目されている。本研究では摘出標本のVEGFとHIF1 $\alpha$ の存在の程度を免疫組織学的に検索し、症候化の原因として組織内新生血管が関与する割合を明らかにすることを第4の目的とした。

最後に実際の臨床例で、50%以上の無症候性頸動脈狭窄患者の症候化率を明らかにするため、全国40施設の協力により、全例登録前向き調査を開始し、これまでに850例の登録を得た。今後2年間の解析により、わが国における無症候性頸動脈狭窄症の自然経過を明らかにすることができるものと考えている。

## 3. 研究の方法

### (1) 頸動脈病変の石灰化の程度と病理組織の対比検討

頸動脈狭窄症の術前検査として行う3D-CTAの元データを画像解析装置に移して画像解析を行うとともに、アガツトンカルシウムスコアを計測した。このスコアと実際の組織内石灰化の程度を対比検討した。また石灰化周囲の粥腫や線維性肥厚部分での病理学的特徴を検討した。

### (2) 症候化の原因としての粥腫内血管新生解析

粥腫内の血管新生を解析するため、組織低酸素に注目し、hypoxia inducible factor 1 alpha (HIF1 $\alpha$ )とvascular endothelial growth factor (VEGF)の組織内分布を免疫組織染色で解析し、新生血管造成の原因としての組織低酸素を解析した。またこの結果と症候性か無症候性かの解析、MRIでの頸動脈の粥腫の程度解析と対比検討し、症候化に関わる粥腫内血管新生の関与を検討した。

### (3) 無症候性病変の前向き観察研究

無症候性頸動脈狭窄症の治療に関するわが国の現状を知るため、39施設の共同参加による全例登録前向き観察研究を計画した。登録施設では、45歳以上、50%以上の頸動脈狭窄を有し、最近6ヶ月以内に同側のTIAや脳梗塞のない患者を全例登録し、前向きに経過観察することにした。登録期間は2009年4月1日-2

011年9月30日までの2.5年であり、全体で807例の登録を得た。登録後2年間でフォローアップ期間とし、登録後6ヶ月、1年、2年に定期観察した。本研究では前例匿名化し、登録施設でのみ連結可能データとして扱い、中央事務局では完全に匿名化された状態で、データを分析した。また研究の概要は名古屋市立大学脳神経外科のホームページで公表している。

#### 4. 研究成果

##### (1) 頸動脈病変の石灰化の程度と病理組織の対比検討

3D-CTA で示される様々な形の石灰化病変と CEA で摘出された組織の対比検討した結果、3D-CTA で豆粒形石灰化像を示す病変は、内膜内に層状に存在するカルシウム沈着や散在性の砂粒状石灰化病変を反映することを明らかにした。一方、3D-CTA で島型に見える石灰化病変は、組織学的には内膜下の内弾性板や中膜内に多数存在する層状のカルシウム沈着や、無構造の石灰化砂粒であることを明らかにした (*J Stroke Cerebrovasc Dis 2013*)。

さらに多数例の石灰化をアガツトンスコアで数値化し解析すると、石灰化部分の容積が大きいもの (>500mm<sup>3</sup>) ほど硬い石灰化病変が多く含まれることを明らかにした。この結果から術前3D-CTA をスコア化することにより、ある程度、ステント可能性を推定できるようになった。

##### (2) 症候化の原因としての粥腫内血管新生解析

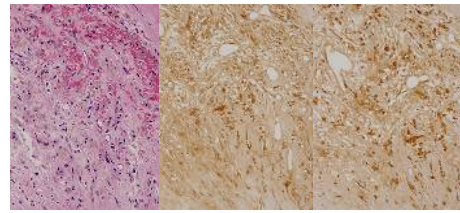
組織低酸素状態の指標として用いた hypoxia inducible factor 1 alpha (HIF1 $\alpha$ ) の抗体は十分組織内での発現が免疫組織学的に確認できた。また同時に染色した vascular endothelial growth factor (VEGF) も免疫組織学的に検出可能であった。これらの低酸素関連物質は粥腫内の修飾型平滑筋細胞とマクロファージのどちらにも発現が見られた。そこで症候性病変8例と無症候性病変5例についてこれらの発現を対比検討した。

##### 無症候性病変の VEGF と HIF1 $\alpha$ 免疫染色



H. E      VEGF      HIF1 $\alpha$

##### 症候性病変の VEGF と HIF1 $\alpha$ 免疫染色



H. E      VEGF      HIF1 $\alpha$

その結果、上図のように無症候性病変と比べて症候性病変で有意に HIF1 $\alpha$  と VEGF の発現が亢進していた。このことから粥腫内の低酸素状態が粥腫内血管新生を引き起こし、症候化と関連することが示唆された (Nagoya Med J 2011)。しかし術前の MRI による粥腫の輝度と HIF1 $\alpha$  や VEGF の発現度とには有意差は得られなかった。実際の組織変化を術前に推定できれば、臨床的有用性が高まると考えられ、現在検索中である。

##### (3) 無症候性病変の前向き観察研究

2012年11月30日の中間解析の段階で、807例の内訳は観察群88例 (11%)、内科的治療群535例 (66%)、外科治療群183例 (23%) であった。年齢は平均73歳、男性が80%をしめた。

診断方法は超音波が77%、CTAが26%、DSAが15%、MRAが11%であったが、外科治療群についてはDSA48%、CTA30%をしめた。危険因子としては高血圧81%、脂質異常65%、糖尿病40%、喫煙34%、狭心症23%などがみられた。頸動脈の狭窄度はECST法で63%、NASCET法で62%程度であったが、外科治療群では69%程度を示した。超音波の性状では観察群や内科的治療群で等輝度～高輝度を示す傾向が見られ、外科治療群では低輝度や混合輝度の割合が増加した。

経過観察は6ヶ月後で72%、1年後で59%、2年後で46%が行われている段階である。この段階で死亡は0.5%/年で、病変とは関連がなかった。全虚血イベントは30例 (1.9+%/年) にみられた。群別では観察群1.1+%/年、内科的治療群2.4+%/年、外科治療群0.8+%/年であった。

現在、最終データを集積しつつあり、上記のデータはあくまで中間解析のデータであるが、これまでの内科的治療群の虚血発作率2.4+%/年はACSTの2.34%/年、ACASの2.2%/年とほぼ同程度のものではあった。今後、最終データの解析により、わが国の無症候性頸動脈狭窄の病像がより明らかになるものと思われる。

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7件)

① Katano H, Mase M, Nishikawa Y, Yamada K: Surgical treatment for carotid stenosis with highly calcified plaques. *J Stroke Cerebrovasc Dis* (2013 E-pub)

② Torigai T, Mase M, Katano H, Yamada K, et al: Usefulness of dual and fully automated measurements of cerebral blood flow during balloon occlusion test of the internal carotid artery. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 22:197-204, 2013

③ Katano H, Mase M, Sakurai K, Miyachi S, Yamada K: Reevaluation of collateral pathways as escape routes from hyperemia/hyperperfusion following surgical treatment for carotid stenosis. *Acta Neurochir (Wien)* 154:2139-2148, 2012

④ Katano H, Ohno M, Yamada K: Protection by physical activity against deleterious effect of smoking on carotid intima-media thickness in young Japanese. *J Stroke Cerebrovasc Dis* (E pub 2011)

⑤ Miura T, Matsukawa N, Katano H, Yamada K: Plaque vulnerability in internal carotid arteries with positive remodeling. *Cerebrovasc Dis Extra* 1:54-65, 2011

⑥ Osawa T, Mase M, Tanikawa M, Fujita M, Katano H, Aoyama K, Ohno T, Sakurai K, Sasaki S, Yamada K: Hypoxia-inducible factor-1 alpha and vascular endothelial growth factor in the carotid atheroma are expressed more in symptomatic cases than in asymptomatic cases. *Nagoya Med J* 51:41-54, 2010

⑦ Katano H, Yamada K: Carotid endarterectomy for stenosis of twisted carotid bifurcations. *World Neurosurgery* 3:147-154, 2010

[学会発表] (計2件)

① 山田和雄: わが国における無症候性頸動脈狭窄症の現状調査 (CASTER 研究の中間報告より)、第42回日本脳卒中の外科学会シンポジウム、2012年4月28日、福岡

② 山田和雄: 無症候性病変の CAS/CEA の適応、第10回日本頸部脳血管治療学会シンポジウム、2011年6月10日、吹田

[図書] (計3件)

① 山田和雄、片野広之、間瀬光人: 手術の実際と工夫; 壁縫合、止血. 遠藤俊郎、永田泉 (編集) 頸動脈内膜剥離術プラクティス p166-171、メディカ出版、2013

② 片野広之、間瀬光人、山田和雄: 最近の CEA/CAS の治療成績. 遠藤俊郎、永田泉 (編集) 頸動脈内膜剥離術プラクティス p266-271、メディカ出版、2013

③ Katano H, Mase M, Yamada K: Evaluation for hardness of carotid plaque with volume score-Hounsfield unit matrix and calcium score. *Advances in Medicine and Biology* 29 pp261-279, Nova Science Publishers, NY 2011

[その他]

ホームページ等

無症候性頸動脈狭窄症の自然経過と治療成績に関する観察研究 (CASTER 研究) の研究プロトコル掲載ホームページ

<http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/noge.dir/CASTERprotocol.pdf>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 和雄 (YAMADA KAZUO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 90150341

(2) 研究分担者

片野 広之 (KATANO HIROYUKI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号: 30295612

間瀬 光人 (MASE MITSUHIITO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号: 60238920

梅村 淳 (UMEMURA ATSUSHI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員  
研究者番号: 00244567

相原 徳孝 (AIHARA NORITAKA)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号：00264739

谷川 元紀 (TANIKAWA MOTOKI)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号：20343402

(3)連携研究者  
なし