

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18日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590325

研究課題名（和文） 大動脈解離の発症機序におけるNa⁺/Ca²⁺交換体の関与研究課題名（英文） Role of Na⁺/Ca²⁺ exchanger in the mechanism of aortic dissection

研究代表者

坂田 則行（SAKATA NORIYUKI）

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：20134273

研究成果の概要（和文）：急性大動脈解離の発症機序を解明するために、急性大動脈解離症例の大動脈壁中膜平滑筋細胞のNa⁺/Ca²⁺交換体（NCX1）発現とアポトーシスおよび壁の力学特性を評価した。急性解離症例の大動脈壁は、非解離正常例に比べ壁ひずみ量が高く、この増加に壁弾性線維の減少が関係していた。中膜平滑筋細胞のアポトーシスがこの壁弾性線維の減少に関連している可能性があるが、Na⁺/Ca²⁺交換体（NCX1）の発現は関係していなかった。

研究成果の概要（英文）：To clarify the mechanism of the aortic dissection, we investigated the protein and mRNA expression of sodium/calcium ion exchanger and the mechanical properties of the aortic wall of patients with aortic dissection (AD). The aortic wall of AD showed a significantly higher elasticity and decreased elastin fibers than that of normal control. This was associated with apoptosis of medial smooth muscle cells, but not with the expression of sodium/calcium ion exchanger.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：人体病理学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：急性大動脈解離、中膜平滑筋細胞、Na⁺/Ca²⁺交換体、壁構成成分、アポトーシス、血行力学的因子

1. 研究開始当初の背景

| (1) 急性大動脈解離は予測なしに突然発症す

る疾患であり、依然救命率の向上が求められている。解離の発症機序は、大動脈中膜の脆弱性を基盤に内膜の亀裂により中膜が二層に剥離していくとされている。しかし、中膜の脆弱性が何によるものか、内膜亀裂の原因は何か未だ不明な点が多い。

(2) 高血圧は、急性大動脈解離のもっとも重要な危険因子である。最近、高血圧の発症機序の一つに血管平滑筋細胞における $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体による Ca^{2+} 流入による細胞内 Ca^{2+} の上昇が、血管トーンを増強させ、血圧上昇に関与していることが報告されている。

(3) 急性解離大動脈中膜の脆弱性には弾性線維の断裂、平滑筋細胞の消失、嚢状中膜壊死が関与している。その分子メカニズムの一つに平滑筋細胞におけるファイブリン-1 やエラスチン遺伝子の異常、マトリックスメタロプロテアーゼ-1, -11 の遺伝子発現の増加などが報告されている。しかし、高血圧に関連する血管平滑筋細胞の異常に関する報告は見られない。

(4) 解離発生に関わる血行力学的因子については、壁伸展性の低下や腔の拡張に起因する壁応力の増大が指摘されている。しかし、これらは主に画像データに基づく研究結果であり、摘出された大動脈壁自身の力学特性を評価した成績は見られない。さらに、壁の力学特性と壁構成成分との関連についても検討されていない。

2. 研究の目的

(1) 急性解離症例の大動脈中膜平滑筋細胞の $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体の発現を遺伝子および蛋白質レベルで調べる。

(2) 急性解離症例の大動脈中膜平滑筋細胞のアポトーシスを電顕的および免疫組織化学的に検索する。

(3) 大動脈壁の力学的特性を調べ、壁構成成分との関連を評価する。

3. 研究の方法

(1) $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体(NCX1)の蛋白質および遺伝子発現：急性解離群(AD)群(スタンフォードA型、8例、 66.7 ± 13.5 歳)と粥状硬化性大動脈(AAA)群(7例、 73.5 ± 8.54 歳)の大動脈中膜組織から総RNAを抽出し、NCX1mRNAの発現をreal time-PCR法で検討した。mRNA量は、ハウスキーピング遺伝子にGAPDHを用いて、ddCt法で算出した。発現量は、培養平滑筋細胞でのNCX1mRNA発現量に対する相対量で表示した。組織から

抽出した蛋白質をSDS-PAGEで電気泳動し、PVDF膜に転写したのち、抗NCX1抗体を用いWestern blot法でNCX1の蛋白質発現を検討した。

(2) $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体(NCX1)とアポトーシス関連蛋白質の免疫組織化学的検討および電顕的観察：手術で得られた大動脈組織を10%緩衝ホルマリンに固定し、パラフィン連続切片を作製した。抗NCX1抗体、抗cleaved caspase 3抗体、抗cleaved actin抗体を用いて免疫染色した。壁構成成分は、弾性染色、マッソン-トリクローム染色で検討した。一部は2.5%グルタル・アルデヒドで固定し、電顕的に観察した。

(3) 解離大動脈壁の力学特性の評価と壁構成成分との関連：急性解離(AD)群(スタンフォードA型、8例、 71.2 ± 12.0 歳)と剖検で得られた非解離正常(NC)群(8例、 71.5 ± 11.1 歳)の上行大動脈から動脈硬化性病変のない動脈壁を採取した。標本を2片に分け、1片は単軸伸展試験機にかけ、応力-ひずみ関係を調べた。他の1片はパラフィン包埋後、連続切片を作製し、Picro-Sirius染色とMovat染色を施行した。それぞれ、1mm幅の血管壁画像をコンピューターに入力し、デジタル画像ソフトを用いて、壁全面積に対するエラスチン、コラーゲンおよびプロテオグリカンの占める面積の割合を算出した。

4. 研究成果

(1) $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体(NCX1)の蛋白質および遺伝子発現：図1に大動脈中膜でのNCX1mRNA発現量の結果を示した。AD群でのNCX1mRNA発現量は 2.37 ± 2.59 で、AAA群の発現量 3.38 ± 2.16 に比べ低下していたが、両者の間には有意差は見られなかった。図2は、蛋白質発現をWestern blot法で比較したものである。蛋白質発現量はAD群で高発現した症例が一例みられた(図2.C)。しかし、AD群とAAA群の間に蛋白質発現量に明らかな差は見られなかった。

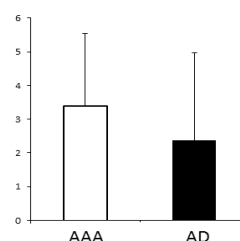


図1 NCX1mRNAの発現量の比較

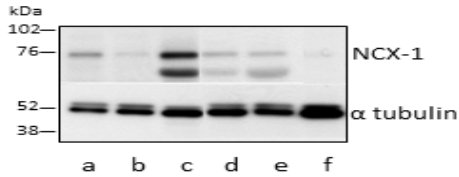


図2 Western blot 法による NCX1 蛋白質発現量の比較

(2) $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体(NCX1)とアポトーシス関連蛋白の免疫組織化学的検討および電顕的観察：図3は、急性解離例の大動脈中膜の光顕および免疫組織化学的所見と電顕的所見を示したものである。急性解離例の大動脈中膜には弾性線維の断裂部が観察され、その部の平滑筋細胞には核と細胞質が濃縮し、核クロマチンの網状構造が失われたアポトーシス細胞が少数観察された(図3.a, d)。この部では、免疫組織化学的に cleaved caspase 3 または cleaved actin 陽性の平滑筋細胞が出現していた(図3.b, c)。しかし、NCX1 陽性平滑筋細胞は、弾性線維の断裂部に関連なく大動脈中膜全体に認められた(図3.e)。

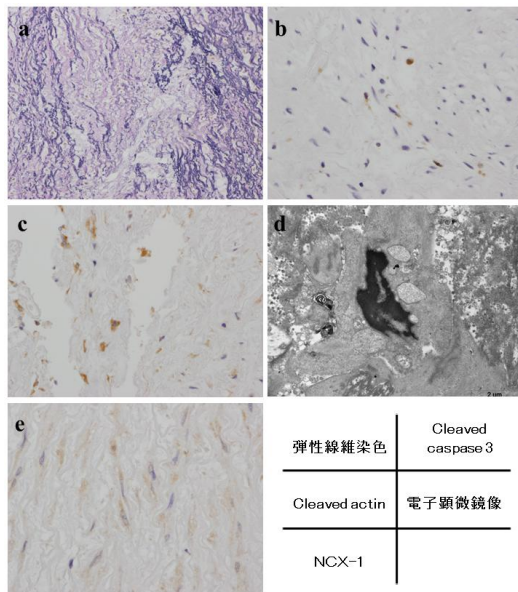


図3 急性解離大動脈壁の光顕、電顕および免疫組織化学的所見

(3) 解離大動脈壁の力学特性の評価と壁構成成分との関連：図4aは壁伸展性を応力50KPaのひずみ量で比較したものである。AD群のひずみ量はNC群に比べ有意に高かった。図4b~dは壁構成成分を見たものである。エラスチン量はAD群でNC群に比べ有

意に低下し、プロテオグリカン量は有意に増加していた。一方、コラーゲン量には両者の間に差が見られなかった。

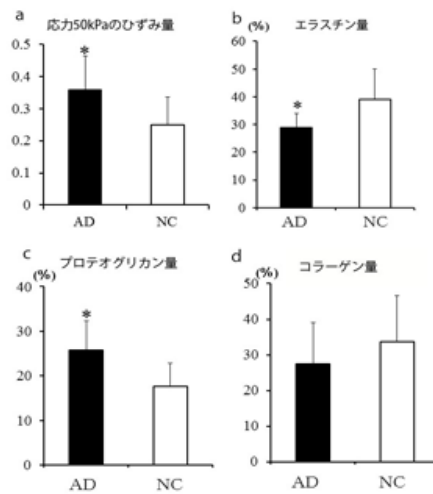


図4 大動脈壁の力学特性と壁構成成分
* : $p < 0.05$, one-way ANOVA

(4)まとめ：急性解離大動脈壁の力学特性が、非解離正常例に比べ高い伸展性を示したことは、高血圧によるひずみの増大が解離発症に重要な役割を演じていることを示している。この変化の基礎病変には弾性線維の断裂や減少があり、中膜平滑筋細胞のアポトーシスが関与していることが示唆された。一方、中膜平滑筋細胞における $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体の発現は、高血圧の維持には関与するが、解離機序への直接的関与は認められなかった。

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 12 件)

- ① Sakata N, Takeshita M, Morishige N, Tashiro T, Inflammatory abdominal aortic aneurysm with immunoglobulin heavy chain gene rearrangement, 福大医学紀要, 査読有, 36:191-196, 2012
- ② Sakata N, AGEs and atherosclerosis, Anti-Aging Medicine, 査読有, 9:89-95, 2012
- ③ 坂田則行, AGEs と動脈硬化、アンチ・エイジング医学、査読有、8:42-48、2012
- ④ Takano K, Yamashita S, Takemoto K, Inoue T, Sakata N, Kuwabara Y, Yonemitsu K, Characterization of carotid atherosclerosis with black-blood carotid plaque imaging using variable flip-angle 3D turbo spin-echo: comparison with 2D turbo spin-echo sequence, Eur J Radiol, 査読有, 81:e304-e309, 2012

- ⑤ Yamada H, Sakata N, Low pressure condition of a lipid core in an eccentrically developed carotid atheromatous plaque: a static finite element analysis, J Biorheol, 査読有、DOI 10.1007/s12573-012-0051-x, 2012
- ⑥ 坂田則行、今永至信、糖尿病における中膜障害とそのメカニズム、月刊糖尿病、査読無、3:32-39、2011
- ⑦ Ito N, Tashiro T, Sakata N, Morishige N, Nishimi M, Histological evaluation of skeletonized internal thoracic artery using force triad™, Thorac Cardiovasc Surg, 査読有, 59:416-420, 2011
- ⑧ Hirata Y, Sakata N, Inoue T, Yasumori K, Yasaka M, Okada Y, Histopathological features with angiographic correlates of internal carotid artery pseudo-occlusion: impact of plaque compositions, J Neurosurg, 査読有, 115:350-358, 2011
- ⑨ 高橋理恵、小山田剛、尾崎弘明、林英之、坂田則行、内尾英一、肥厚性硬膜炎による視神経症の3例、日眼会誌、査読有、115:602-610、2011
- ⑩ Sakata N, Minematsu N, Morishige N, Tashiro T, Imanaga Y, Histopathologic characteristics of a coronary-pulmonary artery fistula with a coronary artery aneurysm, Ann Vasc Dis, 査読有, 4:43-46, 2011
- ⑪ Yamada H, Yuri K, Sakata N. Correlation between stress/strain and the retention of lipoprotein and rupture in atheromatous plaque of the human carotid artery: a finite element study, Journal of Biomechanical Science & Engineering, 査読有, 5(4):291-302, 2010
- ⑫ Takemura Y, Hirata Y, Sakata N, Nabeshima K, Takeshita M, Inoue T, Histopathologic characteristics of a saccular aneurysm arising in the non-branching segment of the distal middle cerebral artery, Pathol Res Pract, 査読有, 206:391-396, 2010

[学会発表] (計9件)

- ①山田宏、坂田則行、田代忠、田山栄基、中山吉福、解離性大動脈壁の変形特性と組織学的特性の評価、第25回バイオエンジニアリング講演会、1/9-1/11、2013、つくば市
- ②坂田則行、山田宏、和田秀一、田代忠、急性解離大動脈壁の力学特性と壁構成成分の関係、第53回日本脈管学会総会、10/11-10/13、2012、東京
- ③Hamed EM, Yamada H, Sakata N, Finite element analysis of a ring-shaped blood vessel using the mechanical properties of its intima and media, 日本機械学会 M&M 材料力学カンファレンス、

9/21-9/24、2012、松山市

- ④山田宏、坂田則行、田代忠、和田秀一、上行大動脈の内膜・中膜層を二層に分離して得た帯状試験片に対する単軸伸展試験、日本機械学会 2012 年度年次大会、9/9-9/12、2012、金沢市
- ⑤和田秀一、坂田則行、Penetrating atherosclerotic ulcer(PAU)と大動脈解離—急性大動脈症候群の臨床病理学的特徴—、シンポジウム“動脈硬化性疾患の臨床と病理—臨床と病理の接点をさぐる—、第44回日本動脈硬化学会総会、6/19-6/20、2012、福岡市
- ⑥山田宏、坂田則行、田代忠、和田秀一、単軸伸展試験による非動脈硬化性上行大動脈瘤の伸展性の評価、第35回日本バイオレオロジー学会年会、5/31-6/2、2012、新潟市
- ⑦山田宏、坂田則行、田代忠、単軸伸展試験による大動脈解離症大動脈の力学特性評価、第51回生体医工学会大会、5/10-5/12、2012、福岡市
- ⑧Sakata N, Takeshita M, Nakayama Y, Histopathological and immunogenetic analysis of inflammatory abdominal aortic aneurysm, Symposium “IgG4-related Diseases”, the 7th Asia Pacific IAP Congress, May/20-May/24, 2011, Taipei, Taiwan
- ⑨山田宏、坂田則行、プラークを静水圧流体要素でモデル化した総頸動脈の応力・ひずみ有限要素解析、日本機械学会 第23回バイオエンジニアリング講演会、1/8-1/9、2011、熊本市

[図書] (計1件)

- ①坂田則行、今永至信 (分担)、シーエムシー出版、糖化による疾患と抗糖化食品・素材、2010、66-76

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂田 則行 (SAKATA NORIYUKI)
福岡大学・医学部・教授
研究者番号：20134273

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

岩本 隆宏 (IWAMOTO TAKAHIRO)
福岡大学・医学部・教授
研究者番号：20300973

田代 忠 (TASHIRO TADASHI)
福岡大学・医学部・教授
研究者番号：20268981