

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590844

研究課題名(和文) ヒト血管壁における組織脆弱性評価の研究

研究課題名(英文) Evaluation of human vascular wall tissue fragility

研究代表者

塚 正彦 (Zuka, Masahiko)

金沢大学・医学系・講師

研究者番号：00272956

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：平成23～25年度に行った100例以上の法医解剖事例について、大動脈、頸動脈、脳動脈さらに脈絡叢の組織材料、血清及び脳脊髄液のゼラチナーゼ分解活性の検討を行った。身元不明で開始して後に身元が判明した司法解剖事例から、大動脈及び冠動脈のびまん性内膜肥厚及び組織内ゼラチン分解活性が年齢推定に有効であることが分かった。血管壁組織脆弱性の視点から、血管病変の危険因子である高血圧をもたらす、未検査の続発性アルドステロン症の頻度を組織学的に調べ、充分注意が払われていないことに対して警鐘を鳴らした。動物実験では、血管のびまん性内膜肥厚は線維化の一種であるという考えから自己免疫疾患モデルマウスの解析を行った。

研究成果の概要(英文)：With regard to more than 100 cases subjected to forensic autopsy between 2011-2013, gelatinase degrading activity was investigated in aorta, carotid and cerebral arteries and choroid plexus tissue samples in addition to serum and cerebrospinal fluid. In forensic autopsies of initially unidentified cases in which subsequently identity was established, aorta and coronary artery diffuse intimal thickening and tissue gelatinolytic activity were found to be useful in the determination of age. From the view point of vascular wall tissue fragility, we histologically investigated the frequency of unexamined secondary aldosteronism, a cause of hypertension and recognized risk factor for vascular lesions, and based on our findings raised an alarm that sufficient attention is not being paid to this important issue. In animal experiments, based on the contention that vascular diffuse intimal thickening represents one type of fibrosis, analysis using an autoimmune disease model mouse was conducted.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：動脈硬化 プロテアーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

従来血管壁の破綻は、内膜に主座を置く粥状硬化症に基づくポジティブ・リモデリングまたは外膜主体に瘤状変化をきたすネガティブ・リモデリングを通して起こり、その機序は各々冠(心臓)動脈と脳血管とで全く別々に論じられてきた。また、担癌者の予後を大きく左右する脈管侵襲では外科切除材料を試料とした光学顕微鏡的評価のみに止まっている。つまり現状では虚血性心疾患、脳血管障害及び悪性腫瘍のいずれにおいても、「血管壁組織脆弱化に基づく生命維持の危機的状況」という共通の現象に対して個別のアプローチがとられている。研究代表者は大学院博士課程以来 20 年間動脈粥状硬化の生化学的解析を続ける一方、病理専門医として日常の診療を経験し、現在司法解剖を担当している。マトリックス・メタロプロテアーゼ(matrix metalloproteinase 以下 MMP)は中性域で働くプロテアーゼで、間質組織不安定性に関わるバイオマーカーであるが、粥腫(プラーク)内で基質の異なる MMP 活性が高まることが示され(塚 1996 年)、



プラーク内基質分解活性分布、塚 正彦 十全医学雑誌 単著 原図 1996 年:



左図は病理解剖で得た大動脈プラークを実体顕微鏡下で切り出し、組織培養上清を



enzyme assay で解析した結果である。上段色付部分は  $7.50 \pm 5.04$

U/mg weight 以上の高ゼラチン分解活性域 ( $p < 0.001$ )、同様に中段色付部分に高コラーゲン分解活性域および下段色付部分に高エラスチン分解活性域を示す。

さらにゼラチンを基質とした *in situ* zymography を富士フィルムと共同開発、ゼラチナーゼ活性の組織内の局在と担当細胞を同一組織切片上で明らかにすることに成功、film *in situ* zymography (以下 FIZ) の発明者として特許公開(発明者 塚正彦 2009-197; 論文 Appl Immunohistochem Mol Morphol 査読有 Zuka M 1 番目 2003)に至った。FIZ はポリエステルフィルムに非放射性(non-RI)基質(ゼラチン, 7  $\mu$ m 厚)を強固着させることで心臓・脳・悪性腫瘍等各種病変に応じた多様なインキュベーション時間への対応を可能とし、これまで感受性・特異性の向上に努めてきた。

## 2. 研究の目的

我が国の内因性急死では心疾患及び脳血管障害が死因である事例の合計が総数の半数以上を占め、悪性腫瘍伸展・治療に際する突然死にも脈管侵襲が関与する例が若干数含まれるとされる。本研究の目的は、血管壁組織の脆さに基づく予測不能な死のメカニズムを病理形態学的及び生化学的に検討し、法医診断の精度を向上させると共に、予防医学的側面から臨床医学との連携を深め突然死を未然に防ぐことである。

< 研究期間内で明らかにすること

### I. プラーク病変 >

1) 冠動脈を材料にゼラチナーゼ活性および石灰化病変解析のみならず患者・解剖例の血症板数及びヘマトクリット測定を通して凝固・線溶作用が血管壁脆弱性に関与している根拠 (Zuka M Proc Natl Acad Sci USA 2007 年) をより明確にする。

2) 脳動脈瘤は冠動脈のネガティブ・リモデリングに相当するとの仮定で、司法解剖での自然経過を経た死亡例に対し、形態学的及び糖鎖生物学的に両者の相違点を解析する。

< 研究期間内で明らかにすること

### II. 非プラーク病変、静脈 >

プラークのみならず、破綻が問題となりうる部位の新鮮血管組織材料から、生化学的に意義のある多くの情報を得ることが可能である。プラークを形成する動脈以外にも以下の 1)2) で知見を得ており、法医実務と並行した研究の展開が可能である。

1) 動脈硬化の初期病変であるびまん性内膜肥厚(diffuse intimal thickening 以下 DIT)第 91 次日本法医学会総会(2007 年)発表「大動脈びまん性内膜肥厚病変におけるゼラチナーゼ活性の年齢推定への応用(冠動脈及び大動脈を試料とする)」:法医学領域で身元不明死体の年齢推定に応用可能であると共に、成人病予防医学における「血管年齢(いわゆる血管の若さ)」に明確な定義を与える。

2) 静脈壁組織脆弱性:悪性腫瘍の細小静脈侵襲は、遺伝子改変動物実験で明らかにしたが、その応用として日常業務の法医解剖で屢々発見される未治療の悪性腫瘍の脈管侵襲を通じた伸展の評価あるいは深部大腿静脈血栓症の内皮細胞-血小板異常に基づく血栓形成の関与の程度を研究期間内で明らかにする。

<本研究の学術的特色・独創的な点及び予想される結果と意義>

法医学・病理・臨床が三位一体となり、従来、生前の臨床検査データが存在してさえ死因の決定が困難(20~30% 堀江らによる 1997年)とされてきた冠動脈症候群の形態診断をプロテアーゼ(MMP)活性という生化学的指標を加え、より確実にできる。動物実験では1) マウスを用いて上記血管壁組織の脆さの解析を行い2) ラット (Tsubokawa& Zuka, Am J Physiol 2010) 及びブタで再生医療モデルを検討中である。近年血管病変を対象とした画像診断等検査技術の進歩で、磁気共鳴(以下 MR) 及び光スペクトロスコピー(以下 OS)により「硬固で脆い」病変の解析が可能となり、線維化・分解のバランスの乱れ以外に粥腫(プラーク)の裂傷に関わる病変として石灰化が興味深い。法医学研究を主体として、関係施設との協力関係のもと血管組織解析がセンター化すれば以下の臨床及び予防医学的応用もなされ、その研究の意義は大きい。予防医学・臨床的領域へ: 社会的要請の強い災害時医療では深部静脈血栓症(エコノミークラス症候群)に続き地震関連死に繋がる循環器病の解析が期待される。

患者材料を取り扱う場合、以下 1~3) として血管壁脆弱性評価が本人に還元される。

1) 血管壁組織破綻(冠動脈・脳動脈・癌の脈管侵襲)の危険度を予測でき、対策が立つ。  
2) ゼラチナーゼ活性の抑制を目安に術後至適薬剤が決定される。

3) 循環器病検査の流れとして低侵襲の体外性画像診断や血中タンパク糖鎖型解析でスクリーニング後、必要最小限の組織採取による低コストのゼラチナーゼ解析が可能となる。

### 3. 研究の方法

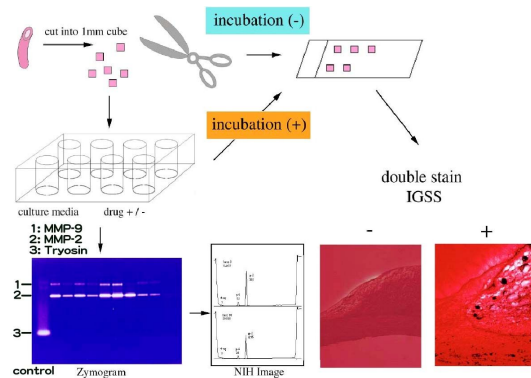
ヒト組織材料の流れの構築及び検査法の感受性・特異性の向上が本研究の基礎となる。

1) 検査の質すなわち感受性及び特異性の向上を図る。本来高感度であるゼラチナーゼ解析は様々な血管試料に対応しうるが乾燥重量等でその標準化に努める。

2) 病理・臨床への汎用化の戦略として、検査コスト削減の可能性を探る。

3) ヒト血管病変解析に並行し「最小材料から組織破綻の最大情報を引き出す」検査を一般化するための戦略を立てる。

ヒト組織材料の流れの構築及び検査法の感受性・特異性の向上に勤める。ゼラチン分解活性を示す分子が MMP-2(gelatinase A)及び MMP-9(gelatinase B)であることを、以下の SDS-gel zymography 等を用いて、その都度確認する。



(上図の説明)

総タンパク量を NORMALIZE した組織培養上清を試料とし、0.1%gelatinを基質とした SDS-gel zymography と抑制試験 (EDTA、セリンプロテアーゼインヒビターあるいはアスパラギン酸プロテアーゼインヒビター) を用いて MMP-2 および MMP-9 の分泌および活性化の程度を評価する。また FIZ を用いて基質分解が高い部分を組織学的に同定し、MMP による分解活性亢進に寄与する分子種や担当細胞には免疫染色を加える。

たとえば、右下のように

IGSS(immunogold-silver stain)法で黒く染色することで平滑筋アクチン抗原陽性細胞を、同様に可視化された高タンパク分解活性領域と共に、同一切片上で示すことができる。

### 4. 研究成果

平成 23~25 年度に行った 100 例以上の法医学解剖事例について、大動脈、頸動脈、脳動脈さらに脈絡叢の組織材料、血清及び脳脊髄液のゼラチナーゼ分解活性の検討を行った。身元不明で開始して後に身元が判明した司法解剖事例から、大動脈及び冠動脈のびまん性内膜肥厚及び組織内ゼラチン分解活性が年齢推定に有効であることが分かった。血管壁組織脆弱性の視点から、血管病変の危険因子である高血圧をもたらす、未検査の続発性アルドステロン症の頻度を組織学的に調べ、充分注意が払われていないことに対して警鐘を鳴らした。動物実験では、血管のびまん性内膜肥厚は線維化の一種であるという考えから自己免疫疾患モデルマウスの解析を行った。

## 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 2 件)

1. Zuka M, Ohshima T.  
Tracheal injury added to cervical bone destruction due to the impact of hitting the water surface: four immersed adult bodies.  
Forensic Sci Int. (査読有) 228, 2013, e62-6.  
doi: 10.1016/j.forsciint.2013.02.009.

2. Zuka M, Chinaka S, Matsumoto Y, Takayama N, Hitomi Y, Nakamura H, Ohshima T.  
Fatal and non-fatal cases of lime sulfide exposure and pathogenetic mechanisms underlying pancreatic injury: Case reports with an animal experiment.  
J Forensic Leg Med. (査読有) 19, 2012, 358-62. doi: 10.1016/j.jflm.2012.02.027.

〔学会発表〕(計 4 件)

1. Yamada K, Zuka M, Ito K, Suzuki Y, Kakuchi Y, Onoe T, Yamagishi M, Kawano M  
Inhibition of APRIL suppresses disease progression: Analysis from a novel mouse model for IgG4-related disease.  
International symposium- IgG4RD & associated conditions  
2014年2月18日 Sheraton Waikiki Hotel, Honolulu, U.S.A.

2. 塚 正彦、大島 徹  
副腎良性腫瘍を伴っていた自殺の2事例  
第97次日本法医学会学術集会  
2013年6月28日北海道札幌市ロイトン札幌

3. 塚 正彦、大島 徹  
同一家屋内での異状死を契機として同居人の健康が損なわれた2例  
第96次日本法医学会学術集会  
2012年6月8日静岡県浜松市アクトシティ浜松

4. 塚 正彦、大島 徹  
ビニール袋を被り窒息死した2事例  
第95次日本法医学会学術集会  
2011年6月16日福島県福島市コラッセ福島

〔図書〕(計 1 件)

1. 塚 正彦、大島 徹 他(分担)  
メジカルビュー  
集中講義 医事法学・法医学  
2012年, 80-85頁, 96-101頁.

〔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  
塚 正彦 (Masahiko Zuka)  
金沢大学・医学系・講師  
研究者番号: 00272956

(2)研究分担者  
大島 徹 (Tohru Ohshima)  
金沢大学・医学系・教授  
研究者番号: 40183024

(3)連携研究者  
( )

研究者番号: