

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590435

研究課題名(和文)大動脈瘤の病理組織学的病態解明と新規治療の開発

研究課題名(英文)Histopathological evaluation for pathogenesis of aortic aneurysm formation

研究代表者

羽尾 裕之(Hao, Hiroyuki)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40393243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：大動脈瘤の罹患患者は近年増加の一途をたどっている。しかし、現状では手術やカテーテル治療といった侵襲的な治療法しかなく、薬物治療の開発が待たれている。大動脈瘤の形成には粥状動脈硬化が背景にあることが多いが、病態の発症や進展の機序は不明な点が多い。そこで我々は手術時に得られた大動脈瘤壁の病理組織検体とマウスを用いた大動脈瘤モデルを用いて、大動脈瘤の形成における鉄代謝の関与を検討した。

大動脈瘤壁には鉄の沈着が高度に認められ、マウスモデルにおいては鉄を除去した餌による飼育で大動脈瘤の形成が予防された。生体内では鉄は必須であるが、過剰な鉄の存在は大動脈瘤の進展に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It has not been investigated whether iron plays a role in abdominal aortic aneurysm (AAA) formation through oxidative stress and inflammation. We examined whether iron is involved in the pathophysiology of AAA formation using human AAA walls and murine AAA models. Iron was accumulated in human and murine AAA walls compared with non-AAA walls. We next investigated the effects of dietary iron restriction on AAA formation in mice. Iron restriction reduced the incidence of AAA formation with attenuation of oxidative stress and inflammation.

Iron is involved in the pathophysiology of AAA formation with oxidative stress and inflammation. Dietary iron restriction could be a new therapeutic strategy for AAA progression.

研究分野：循環器病理学

キーワード：大動脈瘤 鉄代謝 動脈硬化 炎症

1. 研究開始当初の背景

研究者は血管平滑筋細胞の細胞生物学的特徴に注目し、動脈硬化病変の進展や血管形成術後再狭窄の病態に関する研究を行ってきた。これまでの研究成果から、血管壁には多様なフェノタイプの平滑筋細胞が存在し、一部のフェノタイプが動脈硬化や血管形成術後の再狭窄などの血管病変の形成に重要な役割を果たしていることを解明した。我々はブタ冠動脈の血管形成術後の新生内膜でスムーズリンの発現が減弱していることを報告した。剖検例の冠動脈切片でも、スムーズリンは内膜平滑筋細胞で発現が減弱しており、中膜の高分化な平滑筋細胞で豊富に存在していた。さらにブタ冠動脈の血管形成術後再狭窄病変から、低分化なフェノタイプの平滑筋細胞のマーカー蛋白として S100A4 を世界に先駆け同定した。S100A4 に対する抗体を作製しヒト動脈硬化病変で病理組織学的に検討すると、S100A4 は内膜や血管形成術後の新生内膜を構成する平滑筋細胞に分布していた。病理学的に大動脈瘤壁は中膜や内膜の細胞外基質の構成成分や性状が変化しており、平滑筋細胞のフェノタイプは瘤形成に重要な役割を果たしている可能性が示唆される。大動脈瘤壁を構成する平滑筋細胞のフェノタイプの変化に関する検討はされていなかった。

また、小胞体ストレスや鉄代謝は近年さまざまな疾患の病態に関与することが知られてきた。動脈硬化や血管のリモデリングにも小胞体ストレスや鉄代謝の関与が示唆されている。我々は人体病理学の専門性を生かして、急性冠症候群の剖検例を用いた冠動脈の粥腫の不安定化と小胞体ストレスによるアポトーシスの誘導が関与していることを報告した。粥腫の不安定化大動脈瘤における平滑筋細胞のアポトーシスの誘導は知られているが、アポトーシスに至るメカニズムのひとつである小胞体ストレスや鉄代謝の関与

はこれまで明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

大動脈瘤破裂は致死的病態であり中高齢者の死因のうち重要な位置を占め、今後も患者数の増加が予想されている。大動脈瘤は破裂により初めて診断されるか、未破裂で診断された時点で既に破裂のリスクの高い症例が多い。

大動脈瘤の病態には粥状動脈硬化が密接に関与しているが、動脈硬化病変が拡張病変へ進展するメカニズムは不明な点が多い。本研究は手術もしくは病理解剖で採取されたヒト大動脈瘤組織やマウスを用いた大動脈瘤モデルを用いて、大動脈瘤の病態形成と破裂のメカニズムを病理組織学的に検討し、大動脈瘤の予防や拡張の進展に対する新たな治療戦略の開発につなげるものである。

3. 研究の方法

(1)手術材料および剖検から得られたヒト大動脈瘤壁組織の病理組織切片を用いて、免疫組織化学によって鉄や鉄代謝関連分子の分布を検討した。

(2)ヒト大動脈瘤壁凍結組織から蛋白質および mRNA を抽出して、上記分子の発現および分布の定量をウェスタンブロット法、ノーザンブロット法、定量 PCR 法を用いて行った。

(3)マウス大動脈瘤モデルを作成し、大動脈瘤の発症頻度、拡張径や破裂の頻度を、通常の飼料と鉄除去を行った飼料とで比較した。

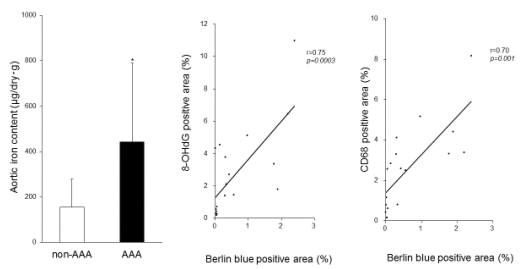
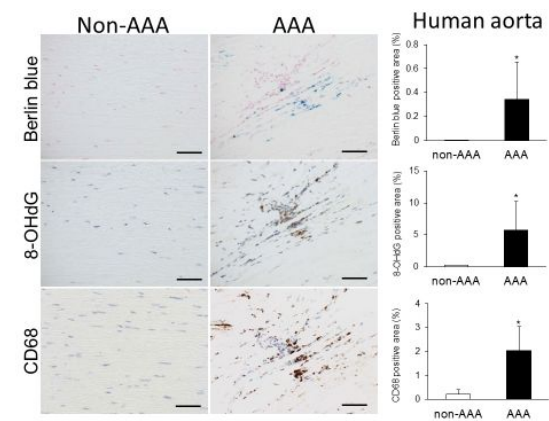
(4)通常飼料と鉄除去飼料により飼育したマウス大動脈瘤モデルから採取された大動脈瘤壁組織を用いて、鉄および鉄代謝関連分子の発現を検討した。

(5)培養マクロファージを用いて、大動脈瘤形成と進展における鉄代謝の分子メカニズムを解明した。

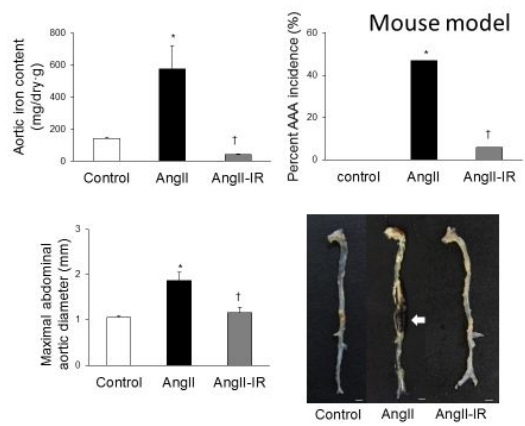
4. 研究成果

手術および剖検で得られた病理組織切片を用いて、大動脈瘤壁に鉄の過剰蓄積が認め

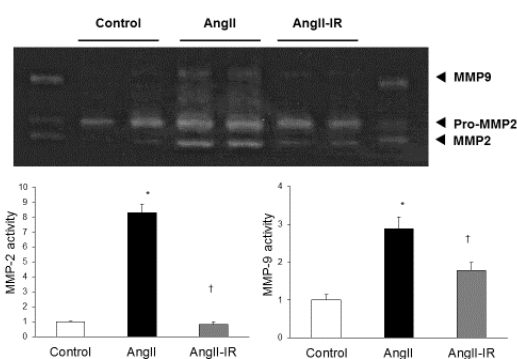
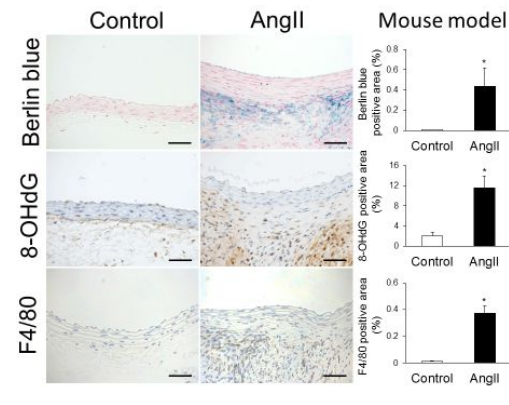
られることを初めて証明した。これらの鉄の過剰蓄積は大動脈瘤壁に浸潤しているマクロファージにみられ、酸化ストレスマーカーである 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine の局在と一致していた。また transferrin receptor 1 (TfR1) の発現が同部にみられ、鉄の取り込みで TfR1 が関与している可能性が考えられた。



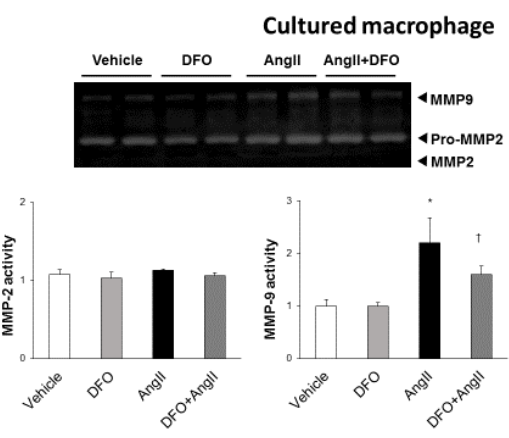
Apolipoprotein E (Apo E) 欠損マウスに対する Angiotensin II 持続投与による大動脈瘤マウスモデルを作成して、これらのヒトで認められた鉄の過剰蓄積と酸化ストレスの関与を検討したところ、ヒト大動脈瘤壁と同様の結果が得られた。そこで大動脈瘤マウスモデルに鉄制限餌を与えたところ、大動脈瘤の形成が鉄制限餌で劇的に抑制された。

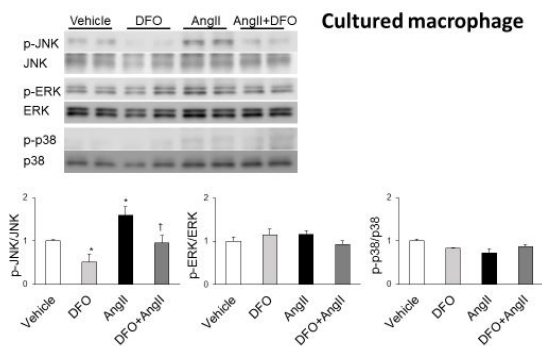


これらの鉄制限餌による瘤形成抑制作用は、IL-6 や TGF- β などの炎症性サイトカイン、コラーゲン、Matrix metalloproteinase (MMP) の発現抑制と c-Jun N-terminal kinase (JNK) のリン酸化の抑制を伴っていた。これらの因子の発現制御が瘤形成の抑制効果をもたらしたと考えた。



マクロファージ培養細胞を用いた in vitro における機能解析では、培養中に鉄のキレート剤を添加することで Angiotensin II による MMP-9 の活性化と JNK リン酸化の両者の有意な抑制が認められた。





本研究より大動脈瘤の非侵襲的治療戦略として、鉄制限や鉄キレート剤が有用である可能性が示唆された。

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3件)

1. Sawada H, Hao H, et al. Aortic iron overload with oxidative stress and inflammation in human and murine abdominal aortic aneurysm. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 35: 1507-1514, 2015
2. 羽尾裕之：大動脈瘤および大動脈解離の病理．日本血管外科学会雑誌 23: 957-963, 2014.
3. Hao H, et al. Distribution of myofibroblast and tenascin-C in cystic adventitial disease: Comparison with ganglion. *Pathology International* 63: 591-598, 2013.

[学会発表](計5件)

1. Sawada H, Hao H, et al. Iron involvement in human abdominal aortic aneurysm. The 18th International Vascular Biology Meeting, Kyoto, 2014. 4
2. Sawada H, Hao H et al. Involvement of iron accumulation in human abdominal aortic aneurysm. American College of Cardiology 63rd Annual

Scientific Session, Washington DC, 2014. 3

3. Sawada H, Hao H, et al. Iron restriction reduces abdominal aortic aneurysm formation in angiotensin II-infused apolipoprotein E deficient mice. American Heart Association Scientific Sessions 2013, Dallas, 2013. 11
4. 澤田悠, 羽尾裕之, 他. 腹部大動脈瘤における鉄の関与 (日本心臓病学会ポスター賞受賞演題). 第61回日本心臓病学会学術集会, ホテル日航熊本(熊本県熊本市) 2013.9
5. 羽尾裕之：大動脈瘤及び大動脈解離の病理(教育講演2) 第41回日本血管心臓外科学会学術総会, 大阪国際会議場(大阪府大阪市), 2013.5
6. 研究組織
 - (1)研究代表者
羽尾 裕之(HAO, Hiroyuki)
兵庫医科大学・医学部・准教授
研究者番号：40393243
 - (2)研究分担者
なし
 - (3)連携研究者
なし