

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591872

研究課題名(和文)分子免疫病理学的アプローチによるNotch経路解析－炎症性血管疾患治療への応用

研究課題名(英文) Analysis of Notch signaling pathway from the point of pathological and immunohistochemical view - application in the treatment of inflammatory vascular disease

研究代表者

小林 昌義 (KOBAYASHI, Masayoshi)

藤田保健衛生大学・医学部・准教授

研究者番号：60329381

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：バージャー病動脈を用い、B-リンパ球の発現をCD3、CD4抗体で、Notch経路をNotch1、3受容体抗体、そのリガンドJagged-1、Delta-1、4、下流転写因子Hes-1の発現で免疫組織化学的に検討。CD3、4は血栓、内膜に発現。Notch-1、3は血栓内炎症性浸潤細胞に発現。Jagged-1、Delta-1、4、Hes-1は中膜平滑筋、vasa vasorum内皮細胞、血栓内炎症性浸潤細胞に発現。

バージャー病ではNotch経路の活性化が上下流リガンド発現で確認され、この経路が炎症性細胞浸潤、平滑筋細胞増殖、誘導、動脈閉塞機転に関わっていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Under pathological conditions, Notch signal pathway is involved in the inflammatory process in arteriosclerosis, atherosclerosis and angiogenesis under ischemic conditions. From the point of this process, arteries affected Buerger's disease based on Shionoya's criteria were analyzed with use of anti CD3, CD4 antibodies to evaluate the T and B lymphocyte expression and anti-Notch-1 and 3, anti-Jagged-1, anti-Delta-1 and 4, and anti-Hes-1 antibodies to examine Notch signal pathway, pathological and immunohistochemically. The distribution of CD3 and 4 is recognized in both the organized thrombus and intima, significantly. Notch-1 and 3 were expressed at the inflammatory infiltrating cells in the thrombus. Jagged-1 and 4, Delta-1 and 4, Hes-1 and 2 were expressed at smooth muscle cells in the media, endothelial cells at vasa vasorum, and inflammatory infiltrating cells in the thrombus. Notch signal pathway could be related the mechanism of Buerger's diseased arteries.

研究分野：血管外科

キーワード：バージャー病 炎症性血管疾患 免疫組織化学 病理学 Notch経路 Notch signal Notch pathway

1. 研究開始当初の背景

炎症性血管炎の治療成績向上のために、血栓形成、炎症機転、内膜増殖および血管平滑筋活性化の新しい制御機構の探索が必要である。そこで血管平滑筋および細胞性免疫機序のひとつである細胞性免疫を制御する新しいシグナルとしてNotchシグナルに注目した。

バージャー病は非動脈硬化性、炎症性、分節的閉塞性動脈疾患であり、血管径の狭小化、血栓による血流の減少、途絶の結果、各組織特に上肢、下肢の組織虚血を引き起こすがいまだその発症原因、機序が不明であり、治療に難渋することも少なくない。急性期病変として血栓、内膜に炎症が惹起される。疫学的には欧米や日本では減少している疾患であるが、本邦以外のアジア、中東、東ヨーロッパでは未だに多いと言われている。その診断基準は多種多様であり世界的に統一された基準が無いのが現状であり、補助診断には病理学的診断が有用であることが解ってきた(J Vasc Surg 29 451-458, 1999)。実際の臨床の場では喫煙が危険因子であることが明白であり、禁煙することにより症状の進行が抑制され、安定することが我々の報告でも明らかである(Ann Vasc Surg 20 148-156 2006)。我々の施設での免疫組織化学的研究により、本疾患は他の閉塞性血管疾患、例えば閉塞性動脈硬化症、ベーチェット病、高安病(Histopathol 36 362-371 2000)、多発性血管炎(J Vasc Surg 38 170-174 2003)等とは異なり、その炎症の首座が血栓および内膜にあり、炎症性細胞浸潤(CD3 陽性 T リンパ球、CD68 陽性マクロファージ、S-100 陽性樹状細胞)を認め、内弾性板に沿って C3d、C4c といった補体、IgG、IgM などの免疫グロブリンの高度な発現が認められる動脈内膜炎であることが判明している(J Vasc Surg 29 451-458 1999)。これらの知見より内膜もしくは中膜での炎症性増殖病変の存在する血管疾患の発生原因、機序の解明することによりこれらの疾患の治療につながり、ひいては血管病変の制御に重要であると考えられる。つまりはこれら血管疾患における内膜、中膜レベルの炎症性、増殖病変における血管平滑筋の機能制御についての解明が重要であり、それらを解明することにより新しい治療標的が明らかになると思われる。

2. 研究の目的

本邦における血管外科領域で遭遇する炎症

性血管疾患には閉塞性病変が主体となるバージャー病がある。この疾患の歴史は非常に古い、その原因、発症機序に関しては未だながら不明な点が多く、それ故、治療に難渋することも多い。そのためバージャー病における血栓形成と平滑筋細胞の細胞内シグナルを解析して、内膜、中膜増殖病変および炎症機転の一つである細胞性免疫における Notch 受容体の役割をあきらかにし、この知見をもとに Notch シグナルの制御によるバージャー病の発症機序および治療法を開発することを本研究課題の目的とする。

3. 研究の方法

バージャー病罹患動脈における病理組織学的、免疫組織化学的手法を用いて、炎症性浸潤細胞の発現、Notch シグナルの発現を検討、評価する。さらにはその活性化を検討するため Notch-1、3、そのリガンドである Jagged-1 下流側の転写因子である Hes-1 細胞性免疫で重要な役割をする CD3、CD4 T リンパ球、その分化、誘導に關与する Delta-like1、4 の発現をも確認する。

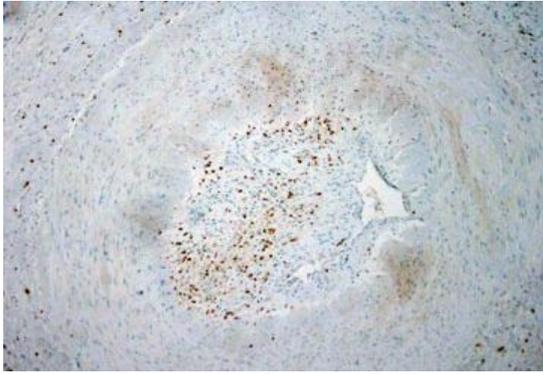
4. 研究成果

(1) 本研究を行った3年間では新規バージャー病発症患者がおらず、新たなバージャー病罹患動脈を採取することはできなかつたため過去の検体を用いて病理学的、免疫組織化学的解析をせざるを得なかつた。

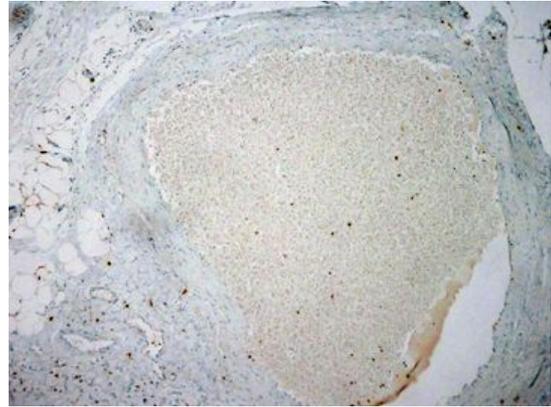
(2) 12患者から採取された20の下腿動脈パラフィン固定標本を用い、H-E(hematoxylin-eosin)染色およびEVG(Elastica-van Gieson)染色を行った。ついで炎症性浸潤細胞の検討のため CD3 (汎 T リンパ球)(Abcam社 anti-CD3抗体)、CD4 (helper/inducer T リンパ球)(Abcam社、anti-CD4抗体)を用いて、また、Notch signal pathway の活性化について病理学的、免疫組織化学的に検討するために Notch-1、3(abcam社、20倍、anti-Notch1抗体-Ch1p Grade、anti-Notch3抗体)さらにそのリガンドである Jagged-1、4 (Abcam社、50倍、anti-Jagged-1抗対、50倍、anti-Jagged-4抗体)、Delta-like-1、4 (Abcam社、200倍、anti-DLL1、4抗体)、その下流の転写因子である Hes-1、2 (Abcam社、200倍、anti-Hes1、2抗体)抗体を用いた。抗原の retrieval として microwave もしくはトリプシン処理を行った。

(3) 炎症性浸潤細胞の検討

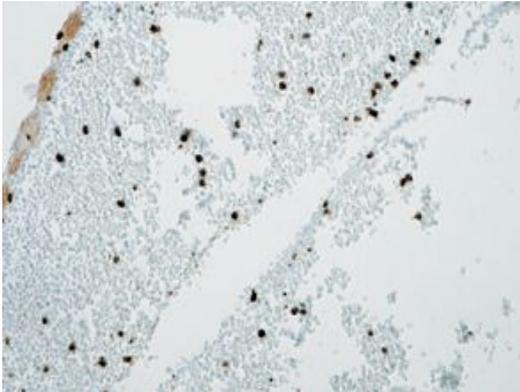
CD3、CD4については両者ともに閉塞した動脈内血栓および内膜にその強い発現を認めた。



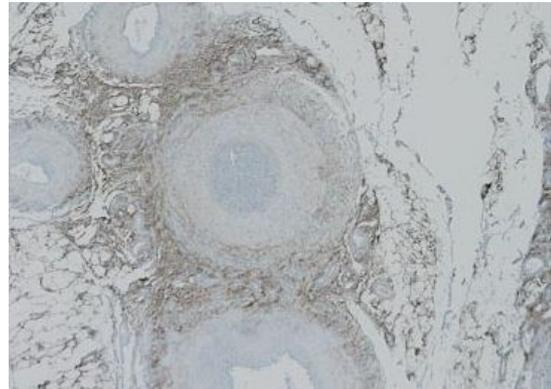
CD3 × 10 血栓、内膜に強く発現



Notch-3、× 10 倍、血栓中に発現

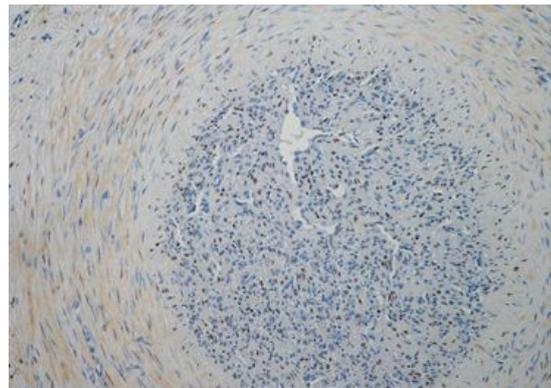


CD4 × 200 血栓に強く発現

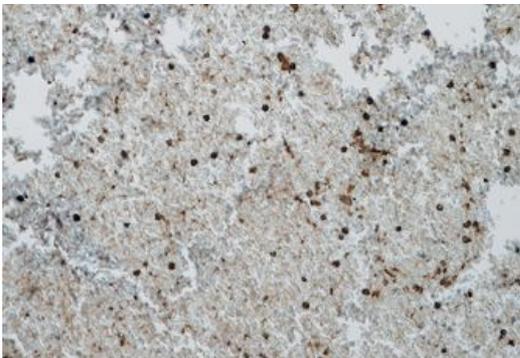


Jagged-1、× 10 倍、外膜の vasa vasorum、中膜に強く発現

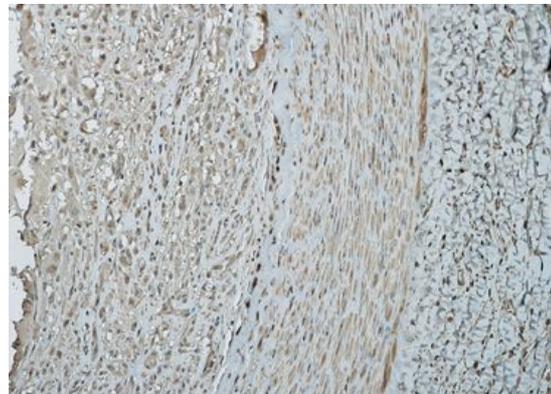
(4) Notch signal pathway 活性化の検討
Notch-1,3 受容体については使用した標本の活性が低下していたことから pretreatment を施行しても活性が回復困難であったためその発現は血栓内に浸潤する炎症性細胞に認めるのみであった。リガンドである Jagged-1、4、Delta-like-1、4、その下流の転写因子である Hes-1、2、については中膜に存在する平滑筋、vasa vasorum における内皮細胞、および内弾性板に沿うように侵入する平滑筋および血栓内の炎症性浸潤細胞にその発現を認めた。



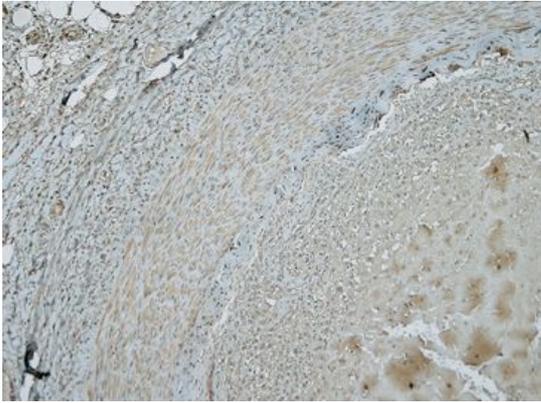
Jagged-1、× 20 倍、血栓の炎症性浸潤細胞、中膜の平滑筋に強く発現



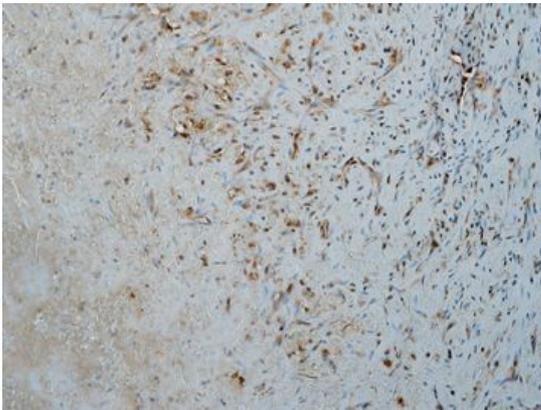
Notch-1、× 200 倍、血栓中の炎症性浸潤細胞に強く発現



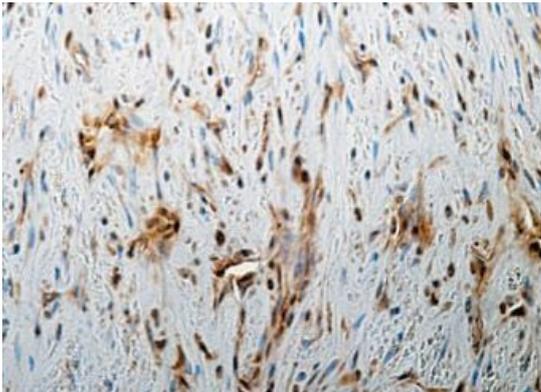
Delta-like-1、× 200 倍、中膜の平滑筋に強く発現



Delta-like-4、×200倍、中膜の平滑筋に強く発現



Hes-1、×400倍、血栓、中膜の平滑筋に強く発現



Hes-2、×200倍、中膜および内弾性板より浸潤する平滑筋に強く発現

(5) 今回の研究では病理学的、免疫組織化学的評価が可能な検体が少なかったため発現した細胞の定量的評価までには至らなかったが、バージャー病罹患動脈においてはNotch経路の活性化が、上流、下流におけるリガンドの発現をみることにより、血栓、中膜において確認されたことからこの経路が炎症性浸潤細胞および平滑筋の増殖、誘導、ひいては閉塞機転に関わっていることが示唆された。

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7件)

Masaya Nakashima, Hideaki Kobayashi, Masayoshi Kobayashi、Troubleshooting Optease inferior vena cava filter retrieval、Asian Cardiovascular and Thoracic Annals、査読有、22、2014、1-3

Masayoshi Kobayashi、Masayuki Sugimoto、Kimihiro Komori、Endarteritis Obliterans in the Pathogenesis of Buerger's disease From the Pathological and immunohistochemical Points of View、Circ J、査読有、78、2014、2819-2826
DOI: 10.1253/circj. CJ-14-0656

Hiroaki Tamai、Masayoshi Kobayashi、Kyouosuke Takeshita、Akio Kodama、Hiroshi Banno、Kiyohito Yamamoto、Kimihiro Komori、Possible involvement of notch signaling in the pathogenesis of Buerger's disease、Surg Today、査読有、44、2014、307-313
DOI: 10.1007/s00595-013-0566-9

Toshimitsu Sato、Masayoshi Kobayashi、A case of Infective Abdominal Aortic Aneurysm due to Hemophilus influenza Type B、Int. J. Angiol 査読有、21、2012、147-150
DOI:10.1055/s-0032-1315627

Hiroshi Banno、Hirofumi Morimae、Tsutomu Ihara、Masayoshi Kobayashi、Kiyohito Yamamoto、Kimihiro Komori、Late type III endoleak from fabric tears of zenith stent graft: report of a case、Surg Today、査読有、43、2012、1206-1209
DOI: 10.1007/s00595-012-0320-8

[学会発表](計19件)

小林昌義、野田美香、櫻井祐補、天野健太郎、樋口義郎、秋田淳年、栃井将人、石田理子、佐藤俊充、石川寛、服部浩次、渡邊孝、高木靖、当科における過去2年間の静脈血栓塞栓症(VTE)症例の検討、第34回日本静脈学会、2014年4月17日-18日、沖縄県名護市万国津梁館

樋口義郎、野田美香、櫻井祐補、天野健太郎、秋田淳年、栃井将人、石田理子、佐藤俊充、石川寛、服部浩次、小林昌義、伴野辰雄、高木靖、慢性血栓塞栓性肺高血圧症に対する血栓内膜摘除術の最近の手術成績、第42回日本血管外科学会、2014年5月21日-23日、青森県青森市リンクステーションホール青森

小林昌義、野田美香、櫻井祐補、天野健太郎、樋口義郎、秋田淳年、栃井将人、石田理子、佐藤俊充、石川寛、服部浩次、渡邊孝、高木靖、心臓・血管外科領域における陰圧吸引療法の有用性、第55回日

本脈管学会、2014年10月30日-11月1日、岡山県倉敷市倉敷市芸文館
小林昌義、野田美香、櫻井祐補、天野健太郎、樋口義郎、秋田淳年、栃井将人、石田理子、佐藤俊充、石川寛、服部浩次、渡邊孝、高木靖、心臓・血管外科領域における陰圧吸引療法の有用性、第43回日本創傷治療学会、2013年11月14日-16日、大分速見郡別府湾ロイヤルホテル
小林昌義、宮地紘樹、前川卓史、玉井宏明、高橋範子、渡辺芳雄、森前博文、藤田広峰、井原努、児玉章朗、坂野比呂志、成田裕司、山本清人、古森公浩、当科における人工血管グラフト感染に対する診断、治療、予後について、第112回日本外科学会、2012年4月12日-13日、千葉県千葉市幕張メッセ
小林昌義、宮地紘樹、前川卓史、玉井宏明、高橋範子、渡辺芳雄、森前博文、藤田広峰、井原努、児玉章朗、坂野比呂志、成田裕司、山本清人、古森公浩、Distal bypassにおける術式の工夫、第40回日本血管外科学会、2012年5月23日-25日、長野県長野市長野ビックハット
Kan Kaneko, Tatsuo Banno, Motomi Ando, Hiroshi Kondo, Masayoshi Kobayashi, Yasushi Takagi、Intra-aneurysm sac pressure measurement in patients with aneurysm expansion after endovascular aneurysm repair、VASCULAR 2012 CONFERENCE、ASVS、2012年10月20日-23日、Australia, Melbourne
小林昌義、櫻井祐補、天野健太郎、樋口義郎、近藤弘史、秋田淳年、石田理子、金子完、石川寛、佐藤俊充、高木靖、渡邊孝、安藤太三、深部静脈血栓症における新しい抗凝固剤-フォンダパリヌクスの治療経験、第53回日本脈管学会、2012年10月11日-12日、東京都千代田区東京ステーションコンファレンス

〔図書〕(計2件)

小林昌義、MCメディカ出版、超音波検査テクニックマスター 腹部・下肢編、2013年 263ページ
小林昌義 新興医学出版社、女性を診る際に役立つ知識、2012年、263ページ

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
藤田保健衛生大学
www.fujita-hu.ac.jp
常滑市民病院
www.tokonamecityhospital
名古屋大学医学部附属病院
www.med.nagoya-u.ac.jp

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 昌義 (KOBAYASHI Masayoshi)
藤田保健衛生大学・医学部・准教授
研究者番号：60329381

(2) 研究分担者

成田 裕司 (NARITA Hiroshi)
名古屋大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：00528739

山本 清人 (YAMAMOTO Kiyohito)
名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授
研究者番号：10298359

古森 公浩 (KOMORI Kimihiro)
名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授
研究者番号：40225587

(3) 連携研究者 なし
()

研究者番号：