

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 5 月 20 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591535

研究課題名（和文） 世界初の高血圧性誘発モデルによる大動脈解離の分子病態解明と病態マーカーの開発

研究課題名（英文） MOLECULAR MECHANISIM AND BIOMARKER OF AORTIC DISSECTION

研究代表者

佐藤 明 (SATO AKIRA)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：30528469

研究成果の概要（和文）：B型大動脈解離症例では、入院1週後の血清テネイシンC(TN-C)値がhs-CRP、D-ダイマー、FDP、解離部位の最大動脈径と正相関し、死亡例は有意に高値であり、血清TN-C値が、B型大動脈解離の短期予後を予測する有用なバイオマーカーであることが判明した。マウス解離モデルにおいてTN-Cはマクロファージ浸潤とVSMCs減少・エラスチン破壊が起こっている解離の移行部位で発現亢進し、主にVSMCsと重複していた。LacZをノックインしたTN-Cレポーターマウスでは、 β -gal染色にて中膜が染色され、さらに α SMAとの二重染色を行うと α SMA陽性細胞が同時に β -galも陽性となり、マウス大動脈解離壁のTN-C産生細胞はVSMCsであることが判明した。

研究成果の概要（英文）：We evaluated 42 patients with type B acute aortic dissection (AD), and serum TN-C levels significantly increased at 7 days and then gradually decreased to normal range at 28 days. Serum TN-C levels at 7 days correlated positively with peak C-reactive protein levels, FDP levels, D-dimer levels, and maximum aortic diameter at the dissection level on admission. Serum TN-C levels of 3 dead patients on admission were significantly higher than those of surviving patients. Serum TN-C levels were significantly elevated during acute stage and might be a novel biomarker to predict patient prognosis of type B acute AD.

In mouse model, TN-C was highly expressed in the medial layer of the dissected aortic wall, and was concordant with the area of the vascular smooth muscle cells (VSMCs) stained by α -SMA. In the TN-C reporter mouse knock-in with LacZ, the medial layer of the dissected aortic wall was stained by the β -gal, and furthermore α SMA-positive cells were also positive in β -gal. We found that the producing cells of TN-C were VSMCs in the dissected aortic wall.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：循環器内科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：B型大動脈解離、テネイシンCノックアウトマウス、バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

| (1) 我が国では大動脈解離が急増しており、

治療指針となる病態マーカーが求められているが、病態マーカー開発に必須となる分子病態の解明は、ほとんどされていない。また、大動脈解離は予兆無く発症し、適切な動物モデルもないため、発症時の現象を知る術が無いことが研究を妨げている。

①我々は、テネイシンC (TN-C) が心筋梗塞、心筋炎等の病態マーカーとして有用であることを証明してきた (JACC2006 ほか)。TN-C は傷害局所で分泌され炎症を制御する細胞外マトリクスタンパクであり、傷害部位の画像診断に適しており、血中に安定な形で分泌されるため血清バイオマーカーにも適している。血清 TN-C 値は、大動脈解離急性期に上昇し、死亡群でより高値を示すため、予後判定マーカーとして有用と思われる。

②TN-C ノックアウトマウスにアンジオテンシン I I と炎症刺激を加えると下行大動脈解離が誘発されることを発見し、これは世界初の高血圧性解離誘発モデルである

2. 研究の目的

(1)我々は、ヒト大動脈解離における TN-C 高値は重症かつ進行性の病態を反映すると考えるに至った。さらに、世界初の高血圧性解離誘発モデルを用いて、謎に包まれている大動脈解離の分子病態に迫ることができると着想した。本研究の目的は、B 型大動脈解離の病態進展予測マーカーとしての TN-C の有用性を検証すると同時に、現時点では全く不明である大動脈解離の分子病態についてマウスモデルを用いて解明することである。

3. 研究の方法

(1) B 型解離における血清 TN-C 値

①B 型解離の進展と血清 TN-C 値の関連を明らかにする。平成 22 年度から筑波大学循環器内科の関連病院 10 施設で入院となった B 型大動脈解離症例の登録を開始する。発症直後から 1 週間、1 ヶ月、6 ヶ月、以後 6 ヶ月毎に、血清 TN-C、hs-CRP、D-ダイマー、FDP、MMP-2、9 を測定し、CT による解離評価を実施する。

(2) マウス解離モデルの分子病態

TN-C ノックアウトマウスの腹部大動脈周囲に高濃度 CaCl_2 を塗布することで炎症と壁の硬化を誘発すると同時にアンジオテンシン II を持続投与すると 4 週間以内に下行大動脈に解離を生ずる。

①組織学的解析：摘出大動脈の病理組織 (H&E 染色、elastica Van Gieson 染色、Masson trichrome 染色)、電顕により、解離に伴う組織学的変化を解析する。

②分子解析：摘出大動脈のトランスクリプトーム解析から、解離前後の経過で発現が変化する「解離関連分子群」を同定する。大動脈の遺伝子発現解析については、別途開発中の統計的パターン認識 (Lancet 2003) を応用した解析手法を活用する。代表的な分子につ

いて定量的 RT-PCR により検証し、ウェスタンブロット、染色、*in situ* ハイブリダイゼーションにより組織発現を検討する。

③TN-C 遺伝子活性：TN-C 遺伝子の活性は侵害応答の指標となる。TN-C ノックアウトマウスでは TN-C 遺伝子座に *LacZ* (β ガラクトシダーゼ遺伝子) が組み込まれていることを利用し、 β ガラクトシダーゼ染色により、解離発症前後の大動脈において、侵害応答の局在と程度を解析する。

4. 研究成果

(1) B 型解離における血清 TN-C 値

B 型大動脈解離 42 症例に対して、入院時、1 週間、2 週間、1 ヶ月毎に、血清 TN-C 値、hs-CRP、D-ダイマー、FDP を測定し、CT による解離評価を行なった。

①大動脈解離症例では、血清 TN-C 値が有意に上昇し、1 週目がピークとなり、1 ヶ月後に正常域に戻った。(図 1)

②1 週後の血清 TN-C 値は、hs-CRP、D-ダイマー、FDP、解離部位の最大動脈径と正相関

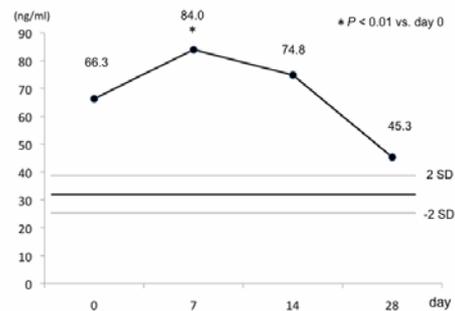


図1 B型解離における経時的な血清TN-C値の変化

し、死亡例は有意に高値であった。(図 2)

③剖検例において、大動脈解離部位の TN-C 免疫染色を行った。正常動脈壁では TN-C は

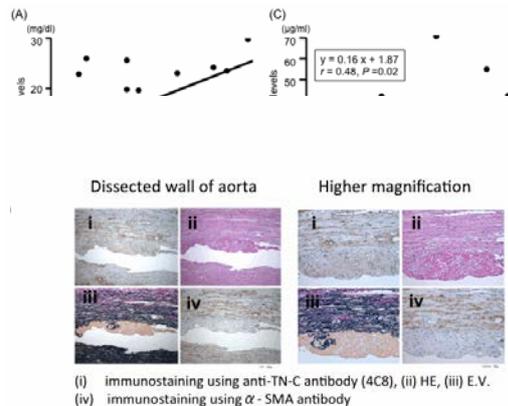


図3 剖検例：大動脈解離部位のTN-C免疫染色

発現せず、解離した中膜に高発現し、 α -SMA が染色される血管平滑筋に一致していた。

(図3)

以上より、血清 TN-C 値が、B 型大動脈解離の短期予後を予測する有用なバイオマーカーであることを明らかにし、論文印刷中である。

(2) マウス解離モデルの分子病態

①AngII+CaCl₂ 複合刺激で腎動脈下の大動脈径には KO, WT の有意差ないが、腎動脈上では解離+瘤が KO のみで形成された。(図4)

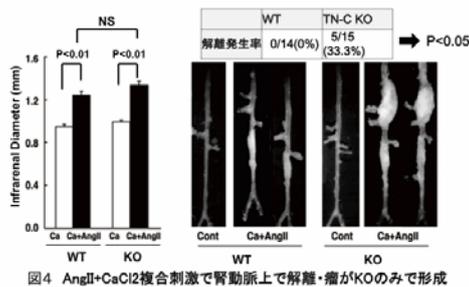


図4 AngII+CaCl₂複合刺激で腎動脈上で解離・瘤がKOのみで形成

② 上記の TN-C ノックアウトマウスの大動脈解離モデルでは、中膜平滑筋層の離解と一定の長さの偽腔の形成を認め、ヒトの大動脈解離に近似した所見を呈していた。

③TN-C ノックアウトおよび litter mate の野生型マウスより採取した大動脈平滑筋細胞の炎症性刺激に対する反応性を DNA マイクロアレイにより網羅的に比較すると、炎症性サイトカイン (Pentraxin3 など) やプロテアーゼ (Cathepsin など) の発現が上昇しており、TN-C により、平滑筋細胞の炎症性刺激に対する組織破壊的な反応が抑制されていることが示唆された。

③LacZ をノックインした TN-C レポーターマウスでは、無刺激の腎動脈下大動脈で TN-C 発現を認めた。これに対して、アンジオテンシン II (AngII), CaCl₂ 単独刺激ではそれぞれ解離発症部位である腎動脈上にも TN-C の発現が認められたが、CaCl₂+AngII 複合刺激により、さらに腎動脈上 TN-C 発現が増強しており、CaCl₂ と AngII の複合刺激が、腎動脈上の TN-C 発現を増強することがわかった。(図5)

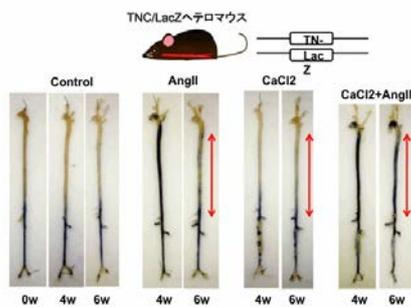


図5 AngII+CaCl₂複合刺激で腎動脈上TN-C発現が増強

④TN-C ノックアウトマウスと野生型マウスの摘出大動脈に一定圧をかけながら大動脈径を測定し、圧-直径変化率の計測により大動脈の機械的特性を算出すると、TN-C ノックアウトマウスで大動脈径の変化率が小さく、血管の柔軟性が低下していることが示唆された。(図6)

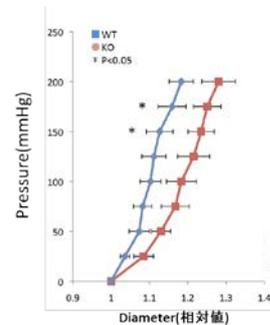


図6 TN-Cノックアウトマウスでは動脈壁柔軟性が低下

以上の結果より、TN-C はマウス解離モデルにおいて解離好発部位に解離促進刺激により解離前に発現が亢進するため有用なバイオマーカーである可能性が考えられた。また、血管柔軟性を保持する (マトリクス分解抑制や細胞外マトリクスである TN-C 自体による) ことで解離を抑制してい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2件)

- (1) Nozato T, Sato A, Hirose S, Hikita H, Takahashi A, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Aonuma K, Hiroe M. Preliminary Study of Serum Tenascin-C Levels as a Diagnostic or Prognostic Biomarker of Type B Acute Aortic Dissection. Int J Cardiol.2013 in press. 査読有
- (2) Kimura T, Yoshimura K, Aoki H, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Ikeda Y, Morikage N, Endo H, Hamano K, Imaizumi T, Hiroe M, Aonuma K, Matsuzaki M. Tenascin-C is expressed in abdominal aortic aneurysm tissue with an active degradation process. Pathol Int. 2011 Oct;61(10):559-64. 査読有

[学会発表] (計2件)

- (1) 木村泰三, 吉村耕一, 青木浩樹, 今中恭子, 吉田利通, 青沼和隆, 廣江道昭, 今泉勉, 松崎益徳: テネascin C は大動脈解離を予防する分子的ショックアブソーバーである 第58回マトリクス研究会 (大分) 6月11日, 2011
- (2) 木村泰三, 佐藤明, 青沼和隆: 大動脈瘤

分子病態における細胞外マトリックス
ネイシン C の役割の解明 第 5 回 高血圧
と冠動脈疾患研究会（東京）12 月 25 日、
2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 明 (SATO AKIRA)
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号：30528469

(2) 研究分担者

青沼 和隆 (AONUMA KAZUTAKA)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：10375488

今中 恭子 (IMANAKA KYOKO)
三重大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：00242967

吉村 耕一 (YOSHIMURA KOICHI)
山口大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：00322248

(3) 連携研究者

木村 泰三 (KIMURA TAIZO)
筑波大学・附属病院・病院講師
研究者番号：00636508