

令和元年6月12日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08675

研究課題名(和文) 不安定プラークに関わる内膜平滑筋細胞の未熟性の解明

研究課題名(英文) Elucidation of immaturity of intimal smooth muscle cells in plaque vulnerability

研究代表者

倉田 厚 (Kurata, Atsushi)

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10302689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々が提示した、プラーク不安定化の指標としての、動脈内膜h-Caldesmon/ α -SMA比率の低下が、血管内膜平滑筋の未熟性を意味することを、未熟奇形腫のグレード進展と奇形腫内血管におけるこの比率の低下が相関することから示した。また、剖検例で急性心筋梗塞が疑われた場合にはこの比率の低下が認められることを報告した。高安大動脈炎の時相進展とともにこの比率が低下することから、この比率は、時間経過によって変動することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々が提示した、動脈内膜平滑筋のh-Caldesmon/ α -SMA比率の低下は、血管平滑筋の未熟性を意味することが明らかになった。この比率の低下がプラーク不安定化と関与することから、将来の診断根拠、治療標的になることが示唆された。また、この比率は先天的に決まっているわけではなく時相により変動することが示唆されることから、食生活ないしは治療による介入によってこの比率を高めることが、動脈硬化性疾患である心筋梗塞や脳梗塞の予防につながる可能性が提示された。

研究成果の概要(英文)：We have previously reported that decreased ratio of h-Caldesmon to α -SMA in arterial intimal smooth muscle is associated with plaque vulnerability. In this study, we demonstrated that this ratio in immature teratoma decreased according as grade of immature teratoma advances; thus, this ratio is likely to indeed reflect vascular maturity. At autopsy, this ratio in the coronary arterial intima decreased in cases strongly suspected of death from acute myocardial infarction. Further, this ratio changed as the course of Takayasu arteritis, suggesting that this ratio is not determined by nature.

研究分野：人体病理学

キーワード：不安定プラーク 平滑筋 未熟性 h-Caldesmon 高安大動脈炎 未熟奇形腫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化性疾患は世界的にも死因の約 1/3 を占め、その大部分は動脈硬化性プラーク(粥腫)の破綻から生じる心筋梗塞や脳梗塞である。プラーク破綻の主因は、プラークの不安定性であり、脂質コアの増大と、脂質コアを覆う線維性被膜の菲薄化が指標とされる (Falk et al. *Circulation* 1995)。しかし、なぜ脂質コアが増大して線維性被膜が菲薄化するかについては解明されていない。プラーク不安定化の原因として、脂質コア側の MMP 分泌等に注目が集まっているが、因果関係を証明したものはない。(Finn et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010)。一方で、プラーク不安定化に関して、線維性被膜の主成分である内膜平滑筋に着目した研究はほとんどない。

一般に血管中膜には α -smooth muscle actin (α -SMA)に加え、smoothelin などの収縮関連の平滑筋マーカーが陽性で、成熟した収縮型平滑筋と呼ばれる。一方、内膜平滑筋は α -SMA を除く平滑筋マーカーは陰性な未分化状態であるとされ、代わりに酵素等を合成・分泌するとして合成(分泌)型平滑筋と呼ばれる。

ところで、研究代表者らは平滑筋系腫瘍の研究から、わが国で開発された収縮関連蛋白の h-caldesmon (Sobue et al. *J Cell Biochem* 1988) が血管平滑筋分化の中間的段階から発現するという知見を得た (Horita, Kurata et al. *Int J Gynecol Pathol*. 2011)。それを元に近年、剖検例の冠動脈を検索し、心筋梗塞例では非梗塞例に比して、内膜の α -SMA 陽性平滑筋のうち h-caldesmon 陽性となる細胞が有意に低下していることを見出した。(Horita, Kurata et al. *Cardiovasc Pathol*. 2015)。内頸動脈剥離術検体においても、同検体内の h-caldesmon/ α -SMA 比率が低下して平滑筋が未熟であるほど、同剥離術後 5 年以内に、対側の内頸動脈狭窄症や急性冠症候群などの動脈硬化性疾患による手術を受ける比率が高いことを後ろ向きコホート研究にて見出した (Hashimoto, Kurata et al. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015)。

2. 研究の目的

上述したように、血管内膜平滑筋の成熟度が h-caldesmon/ α -SMA という免疫染色での陽性細胞比率で表されると我々が報告した知見を元に、動脈硬化性プラークの破綻部位では内膜平滑筋の h-caldesmon 発現比率が低下していることを見出したが、これを果たして平滑筋の成熟度の低下であると断言できるかどうかはまだ確定していない。そのため、ヒト卵巣未熟奇形腫組織を用いて、その未熟度と奇形腫内血管平滑筋の未熟度とが相関するかを解析する。

次に、「動脈硬化性プラークの破綻部位では内膜平滑筋の h-caldesmon 発現が低下」していることの逆も真であるかを調査する。具体的には、突然死の剖検例などで、心筋梗塞死であったかどうかの判定に、冠動脈の免疫染色 h-caldesmon/ α -SMA が有用であるかを解析する。

また一方で、内膜平滑筋の h-caldesmon 陽性比率で示される指標が多様であることは先天性に決まっているのか、もしくは同一個体において時間経過によって変動するのかが不明である。これを確認するため、同一疾患における時相経過によって内膜平滑筋の h-caldesmon 発現比率の上昇がみられるかどうかを調査する。具体的には、高安大動脈炎の検体を用いて、その急性期・慢性期・癒痕期別に内膜平滑筋の h-caldesmon 発現比率の相違を解析する。

なお、毛細血管 pericyte にも平滑筋マーカーが陽性となることもあるため、希少疾患の成り立ちにも平滑筋の免疫染色が寄与することが出来るかを解明する。

本研究では、血管内膜平滑筋の成熟度が、h-caldesmon/ α -SMA という陽性細胞比率で表されると我々が報告した知見を元に、この比率が動脈の部位・原病・時相でどう変動するかを検討する点が学術的独自性・創造性が高いと考えられる。

3. 研究の方法

(1) ヒト卵巣奇形腫の、grade 0 (成熟奇形腫) および、未熟奇形腫の grade 1, 2, 3 の各々の症例を数例ずつ収集し、奇形腫内の血管を同定するために、CD31 および α -SMA 免疫染色を施行した。また、これら血管平滑筋の h-caldesmon 陽性率を算定し、各 grade 間での群間比較をした。

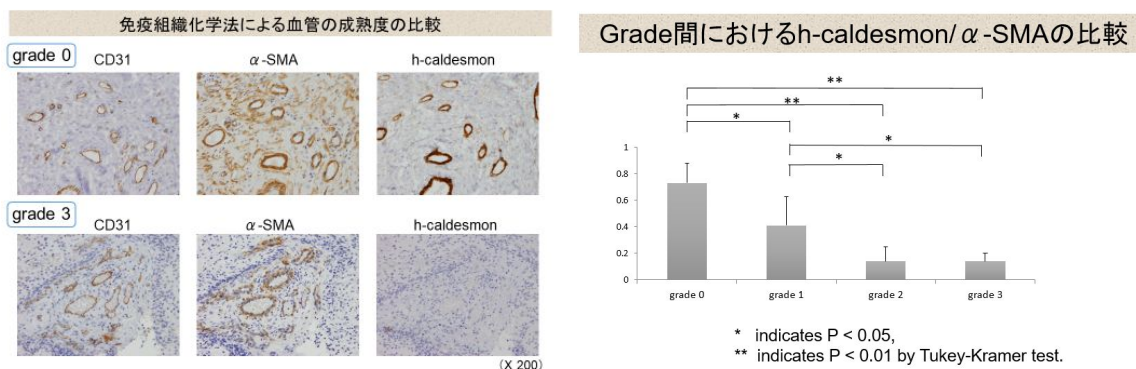
(2) ヒト剖検例において、臨床的に急性心筋梗塞死が疑われた突然死の症例を 2 例選んだ。詳細な検索にて一方は急性心筋梗塞が強く疑われたが、もう一方は心臓外の原因がむしろ疑われたもののその確定や心筋梗塞の否定は困難であった。各々の冠動脈にて、h-caldesmon/ α -SMA という陽性細胞比率を検索した。

(3) 高安大動脈炎の検体 9 例に関して、内膜および外膜の肥厚部長と中膜長を比較して、また炎症性細胞出現数も加味して、急性期・慢性期・癒痕期各々 3 例に分類した。これらの大動脈検体において、免疫染色を施行し、h-caldesmon/ α -SMA を算定し、各期別に比較解析した。

(4) 孤立性肺毛細血管腫 (SPCH) を 7 例収集し、その不分明な腫瘤境界を確定するために、また SPCH が反応性の毛細血管増生なのか真の腫瘍なのかを判別するために、 α -SMA の免疫染色を施行した。

4. 研究成果

(1) ヒト卵巣奇形腫において、grade の進展は未熟成分の多さを反映しているが、本研究にて、grade が進展するほど、奇形腫内血管の h-caldesmon/ α -SMA 比率は低下することが判明した(下図)。したがって、h-caldesmon/ α -SMA 比率は血管平滑筋の成熟の指標として有用と考えられることの傍証が得られた[雑誌論文 9 参照]。



(2) ヒト剖検例において、急性心筋梗塞が強く疑われた症例では冠動脈の h-caldesmon/ α -SMA 比率が低かったため、冠動脈プラーク破裂による急性心筋梗塞が生じたと考えられた。一方、心臓外の原因がむしろ疑われた症例では、h-caldesmon/ α -SMA 比率が高かったため、急性心筋梗塞を除外出来、その後の検索にて肺脂肪塞栓症を死因として見出すことが出来た。これらより、「動脈硬化性プラークの破綻部位では内膜平滑筋の h-caldesmon 発現が低下」していることの逆すなわち「内膜平滑筋の h-caldesmon 発現が低下していると動脈硬化性プラークが破綻した」も真である可能性が示唆された[雑誌論文 7 参照]。

(3) 高安大動脈炎の検体 9 例に関して、急性期の 3 例は、慢性期および癒痕期の 6 例に比して h-caldesmon/ α -SMA 比率は有意に低かった。これにより、内膜平滑筋の成熟度は先天性に決まっているというより、時間経過によって変動することが示唆された[雑誌論文 1 参照]。

(4) SPCH 症例 7 例全てにおいて、病変部血管は α -SMA 陽性であり、これらは血管内皮とほぼ区別困難な領域に陽性であったため、血管周皮細胞に陽性と判定された。背景の肺毛細血管は α -SMA 陰性であったため、SPCH の範囲確定に α -SMA 免疫染色が有用であったと同時に、SPCH は反応性の毛細血管増生ではなく真の腫瘍と考える根拠となった[雑誌論文 11 参照]。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 13 件)

1. Kurata A, Saito A, Hashimoto H, Fujita K, Ohno SI, Kamma H, Nagao T, Kobayashi S, Yamashina A, Kuroda M. Difference in immunohistochemical characteristics between Takayasu arteritis and giant cell arteritis: It may be better to distinguish them in the same age. *Mod Rheumatol*. (in press)
2. Umehara R, Kurata A, Takanashi M, Hashimoto H, Fujita K, Nagao T, Kuroda M. Fascin as a Useful Marker for Identifying Neural Components in Immature Teratomas of Human Ovary and Those Derived From Murine Embryonic Stem Cells. *Int J Gynecol Pathol*. (in press)
3. Kurata A. Building an understanding of the mechanisms of atherosclerosis leading to myocardial infarction. *Impact*. 2019;4:43-45.
4. Hashimoto H, Horiuchi H, Kurata A, Kikuchi H, Okuyama R, Usui G, Masuda Y, Kuroda M, Inoue S, Furushima K, Matsuhashi N, Harihara Y, Morikawa T. Intramucosal colorectal carcinoma with lymphovascular invasion: clinicopathological characteristics of 9 cases. *Histopathology*. 2019;74:1055-1066.
5. Kurata A. Differentiated thyroid cancer: Why does it affect predominantly women during the reproductive period and have higher incidence of mutual association with breast cancer? *Med Hypotheses*. 2019;122:5-7.
6. Kurata A, Yamada M, Ohno SI, Inoue S, Hashimoto H, Fujita K, Takanashi M, Kuroda M. Expression level of microRNA-200c is associated with cell morphology in vitro and histological differentiation through regulation of ZEB1/2 and E-cadherin in gastric carcinoma. *Oncol Rep*. 2018;39:91-100.
7. Kurata A, Nishida J, Koyama T, Miki T, Hashimoto H, Yamamoto K, Kuroda M. Case report of 2 sudden deaths after surgery for bone fracture: Usefulness of immunohistochemical analysis of coronary artery for identifying acute myocardial infarction. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96:e7006.
8. Hashimoto H, Kurata A, Kikuchi H, Masuda Y, Fujita K, Okuyama R, Inoue S, Horiuchi H, Kuroda M. L-type amino acid transporter 1 expression in esophageal carcinogenesis according to WHO and Japanese classifications of intraepithelial neoplasia. *Pathol Int*. 2017;67:247-255.

9. Hongo-Kohama M, Kurata A, Hashimoto H, Fujita K, Horiuchi H, Nagao T, Kuroda M. Vascular Smooth Muscle Cell Maturation Stage and Ki-67 Index are Diagnostic Biomarkers for Pathologic Grade of Ovarian Teratoma. *Int J Gynecol Pathol*. 2017;36:582-592.
10. Sato H, Tsukahara K, Motohashi R, Wakiya M, Serizawa H, Kurata A. Thyroid Carcinoma on the Side of the Absent Lobe in a Patient with Thyroid Hemiagenesis. *Case Rep Otolaryngol*. 2017;2017:4592783.
11. Hashimoto H, Kurata A, Fujiwara M, Hara K, Matsumoto J, Kusakabe M, Tachibana K, Nashiro T, Terado Y, Akahane M, Usui K, Suzuki Y, Kondo H, Kamma H, Kuroda M, Horiuchi H. Solitary Pulmonary Capillary Hemangioma of Adult Cases: Clinicopathologic Characteristics as an Unrecognized Entity. *Am J Surg Pathol*. 2016;40:1380-9.
12. Yamada M, Saito A, Yamamoto Y, Cosatto E, Kurata A, Nagao T, Tateishi A, Kuroda M. Quantitative nucleic features are effective for discrimination of intraductal proliferative lesions of the breast. *J Pathol Inform*. 2016;7:1.
13. Hashimoto H, Hara K, Matsumoto J, Nashiro T, Nagano M, Kusakabe M, Kurata A, Kuroda M, Suzuki Y, Horiuchi H. Necrotizing arteritis occurring in an intralobar pulmonary sequestration of a patient without systemic vasculitis syndrome. *Cardiovasc Pathol*. 2016;25:200-202.

〔学会発表〕(計 13 件)

1. 倉田 厚, 西田 淳, 小山 尊士, 齋藤 哲史, 三木 保, 山科 章, 黒田 雅彦. 突然死の剖検 3 例における心筋梗塞の有無の判定: 冠動脈平滑筋の免疫染色の有用性. 2018 年 11 月 10 日・第 23 回日本血管病理研究会・下関.
2. Matsumi H, Miki A, Kurata A, Fujita K, Kuroda M. Significance of CA125-positive histiocytes by immunocytochemistry of peritoneal washing and ascites cytology in diagnosis of endometriosis. The 7th Asian Conference on Endometriosis. 2018 年 9 月 14-16 日・台北・台湾.
3. 梅原 龍之介, 倉田 厚, 藤田 浩司, 高梨 正勝, 黒田 雅彦. ヒト卵巣およびマウス胚性幹細胞由来の奇形腫内神経管を同定するマーカーとしての fascin の有用性. 第 107 回日本病理学会総会・2018 年 6 月 23 日・札幌.
4. 橋本 浩次, 森川 鉄平, 菊池 宏幸, 倉田 厚, 奥山 力也, 増田 芳雄, 黒田 雅彦, 井上 茂, 堀内 啓. 脈管侵襲陽性粘膜内大腸癌の臨床病理学的特徴の検討. 第 107 回日本病理学会総会・2018 年 6 月 21 日・札幌.
5. 梅原 龍之介, 倉田 厚, 長尾 俊孝, 黒田 雅彦. 未熟奇形腫における神経管を同定するマーカーとしての fascin の有用性. 第 181 回東京医科大学医学会総会・2018 年 6 月 2 日・東京.
6. Kurata A. Histological characteristics of Takayasu arteritis. The 29th World Congress of World Association of Societies of Pathology and Laboratory Medicine. 2017 年 11 月 16 日・Kyoto.
7. 小濱 政子, 倉田 厚, 黒田 雅彦. 卵巣奇形腫の病理学的悪性度と奇形腫内血管の h-Caldesmon 陽性率との逆相関. 第 22 回日本血管病理研究会・2017 年 11 月 11 日・東京.
8. 倉田 厚, 齋藤 彰, 藤田 浩司, 橋本 浩次, 堀内 啓, 長尾 俊孝, 黒田 雅彦. 高安大動脈炎と巨細胞性動脈炎の出現細胞の免疫組織化学的差異. 第 22 回日本血管病理研究会・2017 年 11 月 11 日・東京.
9. 橋本 浩次, 倉田 厚, 藤原 正親, 原 啓, 名城 珠希, 増田 芳雄, 鈴木 良夫, 菅間 博, 黒田 雅彦, 堀内 啓. Solitary pulmonary capillary hemangioma の臨床病理学的特徴. 第 106 回日本病理学会総会・2017 年 4 月 28 日・東京.
10. 倉田 厚, 橋本 浩次, 黒田 雅彦. 不安定プラークを特徴づける内膜平滑筋細胞の未熟性. 第 38 回東京脈管研究会・2016 年 11 月 7 日・東京.
11. 倉田 厚, 橋本 浩次, 藤田 浩司, 堀内 啓, 黒田 雅彦. 内頸動脈内膜平滑筋の未熟性は、不安定プラークの指標となり、全身の動脈硬化性心血管イベントを予測する. 第 21 回日本血管病理研究会・2016 年 10 月 22 日・三鷹.
12. 橋本 浩次, 倉田 厚, 藤原 正親, 松本 順, 日下部 将司, 近藤 晴彦, 菅間 博, 黒田 雅彦, 堀内 啓. Solitary pulmonary capillary hemangioma の臨床病理学的特徴. 第 21 回日本血管病理研究会・2016 年 10 月 22 日・三鷹.
13. 小濱 政子, 倉田 厚, 藤田 浩司, 長尾 俊孝, 黒田 雅彦. 卵巣奇形腫の悪性度とその腫瘍血管の未熟度との相関についての免疫組織化学的検討. 第 105 回日本病理学会総会・2016 年 5 月 13 日・仙台.

〔図書〕(計 4 件)

1. 倉田 厚. 第 7 章 循環障害. 標準病理学 第 6 版, 北川 昌伸・仁木 利郎 監修, pp 171-206, 医学書院, 2019.
2. 倉田 厚. 大型血管炎 巨細胞性動脈炎 病態. 血管炎 (第 2 版) -基礎と臨床のクロストーク-, 有村 義宏 監修, pp 124-126, 日本臨床, 76 巻増刊号 6, 2018.
3. 倉田 厚. バージャー病 3 病理所見. 血管炎症候群の診療ガイドライン (2017 年改訂

版), pp 41-43, 2018.
〔産業財産権〕
出願状況 (計 1 件)

名称：成熟組織の製造方法、および臓器の製造方法
発明者：倉田 厚, 黒田 雅彦
権利者：同上, 東京医科大学
種類：特許
番号：特願 2019-71521
出願年：2019 年
国内外の別： 国内

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<https://tokyomed-molpathol.wixsite.com/kuroda>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：黒田 雅彦
ローマ字氏名：Kuroda Masahiko
所属研究機関名：東京医科大学
部局名：医学部
職名：主任教授
研究者番号 (8 桁)：80251304

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。