

令和元年6月8日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10629

研究課題名(和文)位相差X線CTと免疫染色法を用いたヒト動脈管組織の微細構造と機能解析

研究課題名(英文) Microstructural analysis of human ductal tissue using synchrotron-based x-ray phase-contrast tomography and immunohistochemical analyses

研究代表者

大嶋 義博(Oshima, Yoshihiro)

神戸大学・医学研究科・客員教授

研究者番号：10332660

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：動脈管組織の進展様式について位相差X線CT装置による三次元的微細構造解析とEVG染色による病理学的評価を行った。生体材料を非破壊の状態で解析、EVG染色と同等のコントラストをもって、三次元的に動脈管-正常大動脈壁境界を描出、内膜境界は中膜境界より遠位まで進展していることを明らかにした。さらに、免疫学的染色手法である、EP4受容体、TFAP2 発現を評価に加え、プロスタグランジン長期投与に伴って動脈管組織内弾性繊維が増加、平滑筋細胞は減少する結果を得た。位相差CT画像上でも、中膜の密度上昇がみられたことから、動脈管の閉塞機転が起こりにくく、PGE製剤の投与量を減量しうる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1. 生体材料を非破壊の状態で解析、EVG染色と同等のコントラストをもって、三次元的に動脈管-正常大動脈壁境界を描出した。加えて免疫染色により明らかとなった動脈管組織の進展と位相差CT画像から予測される同組織の進展はほぼ一致する事が判明した。同結果により、動脈管組織の正確な進展を3D mappingすることが可能で、大動脈縮窄症手術の際の切除範囲の決定に有意義な結果となった。

2. プロスタグランジンの投与期間により動脈管組織の微細構造が異なり、構造的変化、機能変化について初めて明らかにした。このことは、プロスタグランジンの投与開始時期、量など投与方法を再考すべきであることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：We have showed the features of human ductal tissue after prostaglandin E1(PGE1) infusion using synchrotron-based x-ray phase-contrast tomography (XPCT).

XPCT images demonstrated very detailed morphological changes in ductal tissue with a resolution comparable to that obtained in histological assessments. These findings serve to decide the resection line of ductal tissue.

We also investigated the correlation between the structural changes on XPCT images and the pattern of PGE1 infusion. The morphological and histopathological effect of PGE1 infusion for ductus arteriosus were clarified through novel modality XPCT and immunohistochemical analyses using EP4, TFAP2 and lysyl oxidase. Extended administration of PGE1 induces disorganized elastogenesis and reduction of smooth muscle in the ductal tissues. These results suggest the microstructural and functional change of ductal tissue after long-term PGE1 infusion. Lipo-PGE1 dosage should be decreased after a defined administration period.

研究分野：先天性心臓外科

キーワード：動脈管 大動脈縮窄 位相差X線CT 免疫学的染色

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

1. 研究開始当初の背景

大動脈縮窄症、大動脈弓離断症は先天的に大動脈弓から下行大動脈への経路が狭窄又は途絶する疾患群で、その発症原因の一つとして動脈管組織の大動脈側への過剰進展も挙げられるが、現時点では不明な点も多い。外科的修復術においては再狭窄を防ぐ為に動脈管組織の完全切除が推奨されているが、動脈管-大動脈組織の境界は肉眼的には不明瞭で、各術者の経験と直感に依存しているのが現状であり、過剰な切除は気管支軟化症、末梢肺動脈狭窄を引き起こす。また大動脈縮窄症の成人期合併症として高血圧、脳血管イベントがあり、修復術後の大動脈壁に肥厚、弾性低下等の構造変化が示唆されている。さらに近年日本特有の治療方針として、多くの施設で両側肺動脈絞扼術を先行し、プロスタグランディン製剤を1~3ヶ月程度投与した上で開心修復術を行う二次的治療法が選択されている。一方で、プロスタグランディン長期投与による動脈管の組織学的変化は現時点では解明されていない。これらの問題点を究明する為に我々は以下の組織診断法に着目した。

1. (1) 第一の方法として、位相差 X 線マイクロ CT 装置を用いた三次元的微細構造解析法である。本邦では兵庫県佐用郡に独立行政法人理化学研究所が運営する SPring-8(世界最大の巨大放射光施設)にて位相差 X 線マイクロ CT 装置が利用可能である。特徴として、通常 CT 装置の約 50 倍の優れた空間解像度と特に軟部組織の微細な密度変化を約 1000 倍、明瞭に描出することが可能であること、さらに生体材料を非破壊の状態で解析を行える利点がある (Hoshino M, J. Synchrotron Rad. 2014; 21: 1347-57)。

2. (2) 第二の方法として、近年注目されている、動脈管組織に特化した免疫学的染色手法である、EP4 と transcription factor AP-2-beta (TFAP2B)の免疫染色(Fig1.b)を用いて解析する。プロスタグランディン E₂(PGE₂)受容体の一つである EP4 は動脈管組織で特に多く発現し、PGE₂-EP4 を介するシグナルは動脈管の血管拡張と内膜肥厚を制御していることが明らかにされている (Yokoyama U, Minamisawa S, Circulation. 2014; 129:487-496)。また DNA 結合タンパクの一種である TFAP2B も動脈管閉鎖機転に作用し、TFAP2B の mutation は Char 症候群(家族性動脈管開存症)の病因とされている。

2. 研究の目的

(1)本研究の目的は大動脈縮窄症および大動脈弓離断症の手術時に切除される動脈管-大動脈峡部組織を上記手法により解析することで、本疾患群の発生機序における動脈管組織の影響と手術時至適切除範囲を明らかにし、また本疾患群におけるプロスタグランディン製剤の至適投与期間についても検討を行い、本疾患群の治療成績向上に繋がる知見を得ることである。

大動脈縮窄症/離断症例において動脈管組織の下大動脈側および大動脈峡部への進展境界を上記手法により三次元的に解析し、手術時の至適切除範囲を明らかにする。

さらに動脈管前後の大動脈壁成分の微細構造も解析することで、疾患の重症度、手術時期が大動脈壁に与える影響を明らかにする。

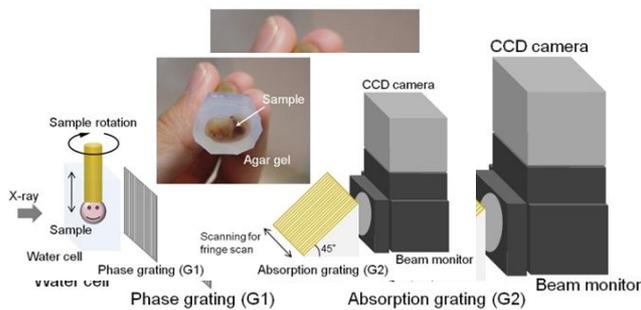
左心低形成症候群および類縁疾患において、プロスタグランディン製剤長期投与による動脈管組織の構造変化を血管壁強度と血管機能の両面から解析し、投与期間および投与量による影響を明らかにすることで、本疾患群に対する本邦独自のプロスタグランディン併用両側肺動脈絞扼術による二次的修復術の至適待機期間について知見を得る。

3. 研究の方法

本研究は兵庫県立こども病院の倫理委員会の承認を得ており、患者家族から、文書による同意が得られた大動脈縮窄・弓離断症候群と類縁疾患の患者を対象とし、手術時に切除された動脈管組織を 10%ホルマリンにて固定する。SPring-8 にある位相差 X 線 CT 装置にて撮像を行った後に薄切標本を作成し、HE 染色、EVG 染色、動脈管選択性の EP4, TFAP2B に対する免疫染色を行う。得られた画像を以下の点に焦点をあてて検討する。手術時の至適切除ライン。大動脈峡部への伸展が臨床像に与える影響。疾患の重症度、手術時期が正常大動脈壁に与える影響。

プロスタグランディン長期投与例では投与期間、投与量が動脈管組織にもたらす変化。

位相差 X 線 CT 装置による画像解析:本解析は Spring-8 中尺ビームライン実験施設 (BL20B2) に設置されている Talbot 型干渉計位相差 X 線 CT 撮影装置を用いて行う。動脈管組織を 2% アガロースゲルに包埋し、180 度回転する間に 900 投影の撮影を行う。各角度で干渉計を構成しているグレーティングを走査することにより 5 枚の異なる位相での撮影を行い位相回転計算により試料の位相像を得る (Fig.1)。



<Fig.1> SPring-8 Information/Vol.17

No.1, 33-7, February 2012 より

組織学的評価 Hematoxylin-Eosin(HE)染色、Elastica van Gieson(EVG)染色：CT 撮像後の試料を兵庫県立こども病院病理検査室にて厚さ 4 μm の薄切標本とし、その一部を HE 染色、EVG 染色を行い、CT 画像との対比を行う。

免疫学的染色法： で作成された標本の一部は東京慈恵会医科大学細胞生物学教室にて動脈管に選択的に発現するプロスタグランジン受容体の一つである EP4 受容体と transcription factor AP-2 に対する免疫染色を行う。

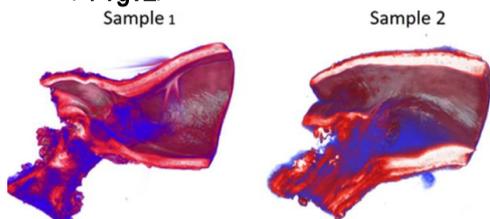
疾患、患者背景による検討項目： ～ で得られた画像の比較検討において、疾患による検討項目を以下に記す

- (1) 単純型もしくは心室中隔欠損を伴う大動脈縮窄症/大動脈弓離断症においては術前プロスタグランジンの投与がない、または短期間であり、動脈管組織の進展範囲の検討と大動脈壁の性状評価を中心に比較検討を行う。
- (2) 左心低形成症候群および類縁疾患は両側肺動脈絞扼術を先行し、比較的長期間のプロスタグランジン投与が行われており、プロスタグランジン投与期間による動脈管組織の構造変化を比較検討する。

4. 研究成果

位相差 X 線 CT 装置を用いた動脈管組織の三次元的微細構造解析を行い、位相差 CT 画像が EVG 染色による病理学的評価と同等の精度で三次元的に動脈管組織の進展を描出できることを明らかにした(Iwaki R, J Thorac Cardiovasc Surg 2016;152:1454-6.)。加えて、動脈管に特異的な免疫染色(EP4, TFAP2)により明らかとなった動脈管組織の進展と位相差 CT 画像から予測される同組織の進展はほぼ一致する事が判明。位相差 CT による動脈管組織の正確な広がり同定が可能であることが証明された(Fig. 2)。同結果により、動脈管組織の正確な進展を 3D mapping することが可能であり、大動脈縮窄症手術の際の切除範囲の決定に有意義な結果となった。但し、下行大動脈側では内膜境界と中膜境界には、両者にずれが存在する。術後再狭窄回避の観点からは至適切除線は中膜境界である可能性がある。

< Fig.2>



大動脈峡部における動脈管組織境界は明瞭ではなく弾性繊維と平滑筋細胞が入り混じる移行帯が存在し、かつ症例毎に個人差がある。この移行帯の存在が出生後にさらに狭窄病変が進行する原因である可能性がある。

プロスタグランジン長期投与症例では CT 画像上、動脈管内膜-中膜間での解離像や内膜組織の密度上昇を認める。免疫染色と CT 画像との整合性では EP4 染色とより一致する症例と、TFAP2B とより一致する症例が混在する。このことは、プロスタグランジン長期投与によって、動脈管組織の機能変化の可能性を示唆している。

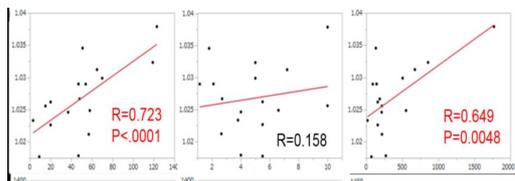
動脈管作動薬長期投与による動脈管組織の構造変化の解析では、同疾患群(左心低形成症候群)でのプロスタグランジン(PGE)製剤の投与期間と位相差 CT 所見における動脈管中膜の density が正の相関(Fig.3)を示し、加えて、中膜の density と動脈管中膜の弾性線維の量との間に正の相関(Fig. 4)が示された。本所見は、PGE 製剤が動脈管に与える影響の新知見であり、今後の PGE 製剤の使用法の変更、適正化に寄与する可能性がある(第 48 回日本心臓血管外科学会学術集会にて発表)。

PGE 投与と弾性繊維形成または平滑筋細胞分布度との関係

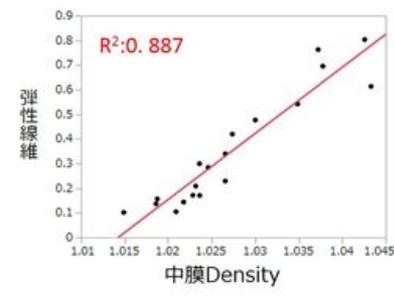
色素抽出法による弾性繊維形成と平滑筋細胞の分布について、検討した。PGE 製剤投与期間および総投与量と弾性繊維形成の間には、明らかな正の相関関係がみられた(Fig. 5)。また、PGE 製剤投与期間および総投与量と平滑筋細胞分布度との間には、明らかな負の相関関係が得られた(Fig. 6)。

<Fig. 3>

PGE 投与期間と 平均投与量と 総投与量と
中膜 density 中膜 density 中膜 density

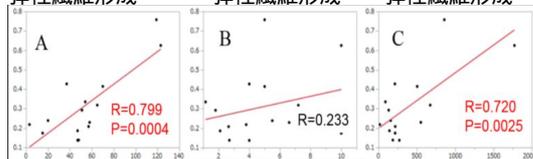


<Fig.4>



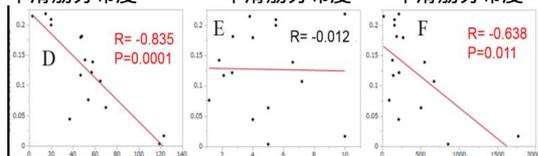
<Fig. 5>

PGE 投与期間と 平均投与量と 総投与量と
弾性繊維形成 弾性繊維形成 弾性繊維形成



<Fig.6>

PGE 投与期間と 平均投与量と 総投与量と
平滑筋分布度 平滑筋分布度 平滑筋分布度



免疫染色法による解析

- EP4 受容体 プロスタグランジン受容体の一つである EP4 受容体は、PGE 製剤を導入されていない動脈管組織標本において高頻度で見られ、PGE 製剤が 3 日以上使用された標本では、消失していた。
- LOX 発現 弾性繊維形成に重要な Lysyl oxidase (LOX) 蛋白の発現は、PGE 製剤が導入されていない動脈管組織標本においては観察されず、PGE 製剤が使用された全ての動脈管組織標本においてみられた。さらに PGE 製剤短期投与群において、長期投与群より有意に高頻度で発現していた。

これらのことから、PGE 製剤の長期投与により、動脈管組織に形態的、組織学的な変化が起きていることが明らかにされた。このことは、位相差 CT 画像上でも、動脈管内膜-中膜間での解離像や内膜組織の密度上昇がみられることから、伺える。免疫学的手法でも、PGE 製剤長期投与により、EP4 受容体の退縮と Lox の発現を伴った弾性繊維化と平滑筋退縮が起きていた。以上のことから、動脈管の閉塞機転が起りにくくなり、PGE 製剤の投与量を調整（減量）しう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)

- Kaneko Y, Shinohara G, Hoshino M, Morishita H, Morita K, Oshima Y, Takahashi M, Yagi N, Okita Y, Tsukube T. Intact imaging of human heart structure using X-ray phase-contrast tomography. Pediatr Cardiol 2017;38: 390-393.(査読有)
- Iwaki R, Matsuhisa H, Hoshino M, Oshima Y. Three-dimensional evaluation of ductal tissue in coarctation of the aorta using X-ray phase-contrast tomography. J Thorac

Cardiovasc Surg. 2016 Nov;152:1454-1456. (査読有)

3. Tsukube T, Yagi N, Hoshino M, Nakashima Y, Nakagawa K, Okita Y. Impact of synchrotron radiation-based X-ray phase-contrast tomography on understanding various cardiovascular surgical pathologies. Gen Thorac Cardiovasc Surg Oct; 63(10): 590-2. 2015 (査読有)
4. Iwaki R, Matsuhisa H, Minamisawa S, Akaike T, Hoshino M, Yagi N, Morita K, Shinohara G, Kaneko Y, Yoshitake S, Takahashi M, Tsukube T, Oshima Y. Effect of Long-Term Prostaglandin E₁ Administration on Changes in Human Ductus Arteriosus Morphology (投稿中)

[学会発表](計 5件)

1. Iwaki R, Matsuhisa H, Minamisawa S, Akaike T, Hoshino M, Yagi N, Morita K, Shinohara G, Kaneko Y, Morishita H, Takahashi M, Tsukube T, Oshima Y. Three Dimensional Evaluation of Ductal Tissue in Coarctation of Aorta Using X-ray Phase-Contrast Tomography. AHA scientific session. Chicago. 2018.11.10-14
2. 岩城 隆馬, 松久 弘典, 大嶋 義博, 赤池 徹, 南沢 亨, 星野 真人, 八木 直人, 森下 寛之, 金子 幸裕, 高橋 昌, 篠原 玄, 森田 喜代造, 築部 卓郎
位相差 X 線 CT を用いた大動脈縮窄症における動脈管組織進展の三次元的評価. 第 48 回日本心臓血管外科学会学術集会. 津. 2018.2.19-21
3. Iwaki R, Matsuhisa H, Minamisawa S, Akaike T, Hoshino M, Yagi N, Morita K, Shinohara G, Kaneko Y, Morishita H, Takahashi M, Tsukube T, Oshima Y. The Effect of Long-term Administration of Prostaglandin E₁ on Morphological Changes in Ductus Arteriosus. 8th Takao international symposium. 松江. 2017.10.6 -10.8
4. Iwaki R, Matsuhisa H, Oshima Y, Hoshino M, Yagi N, Minamisawa S, Akaike T, Morita K, Shinohara G, Kaneko Y, Morishita H, Takahashi M, Tsukube T, Okita Y. The Effect of Long-term Administration of Prostaglandin E₁ on Morphological Changes in Ductus Arteriosus. BCVS scientific session. Portland. 2017.7.10-7.17
5. 岩城隆馬, 大嶋義博, 松久弘典, 南沢 亨 プロスタグランジン長期投与が動脈管に及ぼす組織的变化の検討. 第 52 回日本小児循環器学会学術集会、東京 2016.7.6-7.8

[図書](計 0件)

[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：
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：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者

研究分担者氏名：星野 真人

