

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K09234

研究課題名(和文) 腹部大動脈瘤の拡大速度を規定する病理組織学的因子に関する前向きコホート研究

研究課題名(英文) A prospective cohort study of histopathological factors determining the rate of abdominal aortic aneurysm expansion

研究代表者

濱田 庸 (Hamada, Yoh)

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：20611958

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究助成の全期間にわたって、研究費獲得後に発生した新型コロナウイルス感染拡大によって、研究活動が大きく制限され、研究計画遂行に大きな支障が生じた。最近になって5類感染症となったもののその影響は、研究機関全体にわたって色濃く、症例の蓄積をすることが進まず、プログラム作成のための人的交流もほぼ実施できなかった。そのような中で数回神戸大学とのオンラインミーティングを行い、大動脈瘤内の複数部位での血圧測定を行い、そのデータを元にしたシミュレーションプログラムを作成するなどの着想を得る事ができたが、実現するの至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

前述したとおり、本研究助成の全期間にわたって、研究費獲得後に発生した新型コロナウイルス感染拡大によって、研究活動が大きく制限され、研究計画遂行に大きな支障が生じた。数回にわたりオンラインミーティングを開催する事はでき、前述したオンラインミーティングからプログラムソフト作成のきっかけをつかむ事が出来たものの、それを実践に移すための症例データ蓄積をすることができなかった。とはいえ、今後新規の科研費獲得ができた際には、その知見をもとに研究をより迅速に進めるための礎として利用できると考えている。

研究成果の概要(英文)：Throughout the entire period of this research grant, research activities were greatly restricted due to the spread of coronavirus infection that occurred after the research funding was obtained, causing major hindrances to the implementation of the research plan. Although it has recently been classified as a Class 5 infectious disease, its impact is strong throughout the research institution, and progress in accumulating cases has been slow, making it almost impossible to carry out personnel exchanges for program creation. In such circumstances, we had several online meetings with Kobe University, and came up with the idea of programing based on measuring blood pressure at multiple sites within the aortic aneurysm and creating a precise simulation program based on that data, but we were unable to realize it.

研究分野：血管外科

キーワード：腹部大動脈瘤

1. 研究開始当初の背景

大動脈瘤・大動脈解離診療ガイドラインでは、AAAの最大短径が男性で55mm、女性で50mmに達した場合、破裂を予防するためのステントグラフト内挿術やY型人工血管置換術等、侵襲的治療の適応とされている。evidence level A、推奨度はClass であり、実臨床において有用な指標といえる。一方、動脈瘤径の拡大速度については「半年間で5mm以上の拡大を認めるもの」という基準がある。しかしながら、evidence level C、推奨度Class aであり、動脈瘤の拡大速度と手術適応・破裂の関係については、生物学的に詳細に検討する余地が残されている。その一因として、AAAの拡大速度を規定すると考えられているMMP等の蛋白分解酵素や細胞外基質など生物学的因子に関する前向きコホート研究が存在しない事があげられる。そこで、申請者は動脈瘤を拡大速度別に分けて前向き観察を行い、破裂症例と比較する事で、MMP等の蛋白分解酵素や細胞外基質の発現量を、動脈瘤径の拡大速度をもととした手術適応に対する確固たるエビデンスを確立する事ができると考えた。

2. 研究の目的

【概要】

腹部大動脈瘤の手術適応に、「半年で5mm以上瘤径拡大するもの」があるが、エビデンスレベルは高くない。瘤径拡大速度の病理学的規定因子として、蛋白分解酵素の発現量増加、細胞外基質合成不全が提唱されているが、臨床前向き研究では明らかでない。本研究ではこの点に着目し瘤径を前向き観察する。拡大速度別に、半年で5mm以上、2mm以上-5mm未満、0mm以上-2mm未満、また、破裂性大動脈瘤を加えた4群の手術例で動脈壁を採取する。採取組織の蛋白分解酵素・細胞外基質発現量を独自の定量的免疫染色法で定量する。本手法は、新規高輝度蛍光粒子を用いて組織内の蛋白質発現量を「粒子数」で高確度に定量する事ができる(Gonda K, et al. 2017, Sci Rep.)。検出のダイナミックレンジはDAB染色の約1000倍と非常に高い。最終的に蛋白分解酵素・細胞外基質発現量と動脈瘤拡大速度、破裂との相関関係を明らかにし、手術適応に確固たるエビデンスを与える事を目的とする。

【本文】腹部大動脈瘤 (abdominal Aortic Aneurysm, AAA)は、進行性に拡大し破裂に至る致死性疾患である。大動脈瘤・大動脈解離診療ガイドラインでは、動脈瘤の最大短径が男性で55mm、女性で50mmに達した場合、破裂予防のためのステントグラフト内挿術やY型人工血管置換術等、侵襲的治療の適応とされており、実臨床において有用な指標といえる。更に半年間で5mm以上の拡大を認めるAAAも侵襲的治療の対象であるが、evidence level C、推奨度Class aと、AAAの拡大速度と破裂率・死亡率の相関関係については詳細に検討する余地が残されている(図1)。AAAの進行過程においては、大動脈瘤壁に発生する慢性炎症と細胞外基質を含む組織破壊が慢性的に持続し、大動脈壁の脆弱化から瘤径の拡大に至ると考えられている。その際に鍵となる内因性因子は、炎症性メディエーターと、細胞外基質代謝である。

INF-等の炎症性メディエーターについては、様々な実験モデルや臨床試験デザインなどにより、大動脈瘤拡大を促進するの否かについて否定的・肯定的な結論が様々な報告されており、拡大速度を規定する因子として検討するには難がある可能性が高い(図1)。

しかし、動脈瘤壁における、弾性繊維など細胞外基質の断裂・消失は、実臨床レベルにおける組織サンプルにおいて、特徴的な病理所見として共通して認められる(図1)。

ゆえにマクロファージや動脈壁の間質細胞から分泌される matrix metalloproteinase (MMP)などの蛋白分解酵素やエラスチンなどの細胞外基質と大動脈瘤径との相関関係について

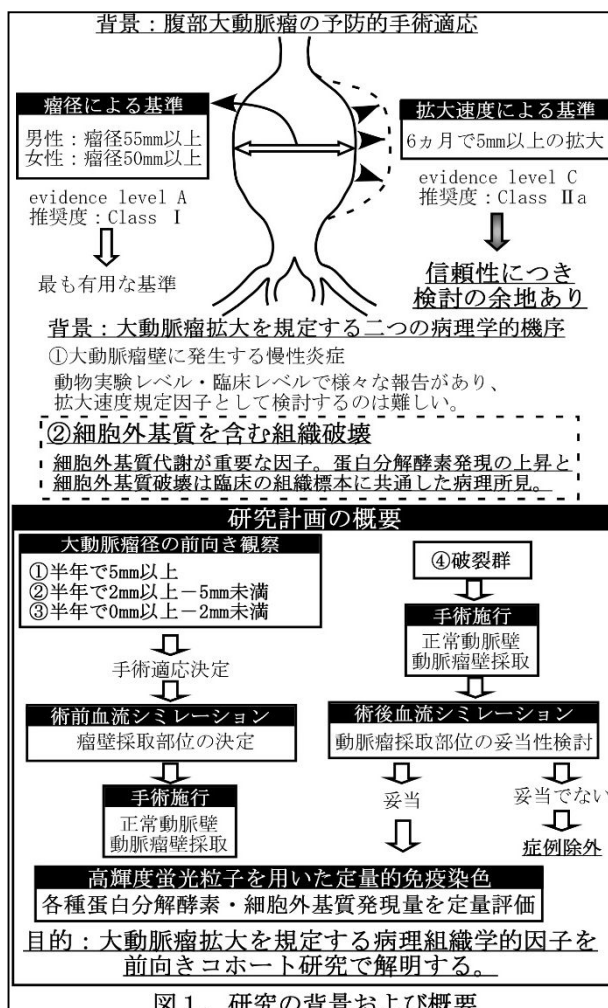


図1. 研究の背景および概要

て、古くから注目されている。我々のグループでも後ろ向き研究ではあるが、特に外膜側に存在する MMP-9 の発現が大動脈瘤の拡大速度との相関性が高い事を報告している(渡辺ら、2000年、日本血管外科学会誌)。また、細胞外基質合成不全の存在も動物実験レベルでは提唱されている。しかし、これらと大動脈瘤径拡大の相関関係を解明する前向きコホート研究は行われておらず、実行する事により、AAA 拡大速度を基にした予防手術の適応に確固たるエビデンスを与える事ができるのではないかと考えた。

3. 研究の方法

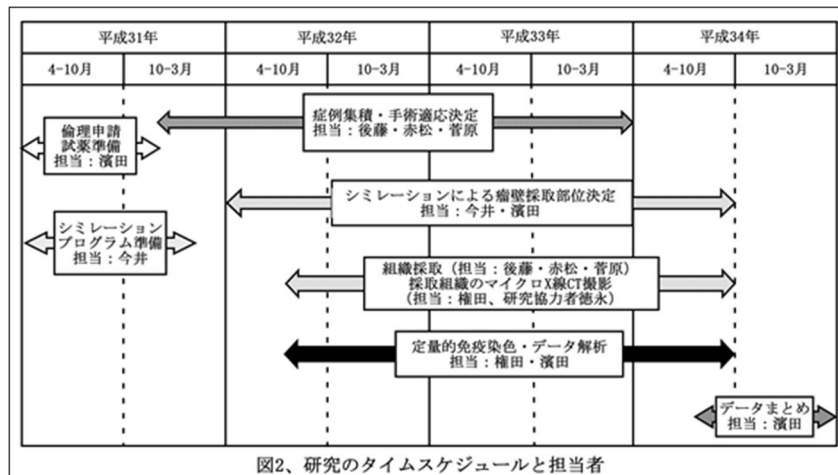
これまで、AAA の拡大速度・破裂を規定する病理組織学的因子として、特に各種蛋白分解酵素や細胞外基質発現量に関心が集まっていた。しかし、前向きコホート研究では相関関係は証明されていない。その理由として、先行研究では、もっとも血流応力のかかる部位を術前に同定し組織学的評価を行うのに至適な瘤壁採取部位を決定する事ができていない事、また、組織学的評価は確度の低い DAB 免疫染色や蛍光免疫染色で行っていることが挙げられる。瘤壁採取部位の決定は、動脈瘤が最も血流ストレスを受ける部位を反映するべきであり、DAB 染色や、蛍光免疫染色では、1細胞あたりや面積あたりの蛋白発現量を正確に定量評価する事は非常に困難である。本研究では、術前シミュレーションにより動脈瘤への血流応力が最もかかる部位を的確に予想し、瘤壁の採取部位を決定する事を第一の独自性とする(図1)。加えて、各種蛋白分解酵素や細胞外基質発現量を、DAB 染色の約 1000 倍のダイナミックレンジを持つ高輝度蛍光粒子を用いた特殊な定量的免疫染色法 (Gonda K, et al. 2017, Sci Rep.) により評価し、蛋白分解酵素発現量を 1細胞当たりの粒子数、細胞外基質の発現量を単位面積あたりの粒子数という定量的指標で評価する事を第二の独自性とする(図1)。

AAA の拡大速度・破裂を規定する病理組織学的因子を前向きコホート研究で証明する事ができれば、拡大速度を元にした予防的手術適応に確固たるエビデンスを与える事ができる。更に、各種蛋白分解酵素の阻害剤開発や細胞外基質増殖を目指したサイトカイン治療など、今までに例を見ない大動脈瘤縮小を目指した内科的治療の創造につながる可能性が高いと考えている。

本研究計画が受理された場合、臨床症例を対象とする前向きコホート研究であるため、まずは、倫理申請を行い倫理委員会にご承諾頂く。具体的には、AAA の患者群を拡大速度別に 半年で 5mm 以上、半年で 2mm 以上 - 5mm 未満、半年で 0mm 以上 - 2mm 未満の 3 群に分けてフォローしていく(図2)。現行のガイドラインの手術適応を満たし、開腹での Y 型人工血管置換術を選択された患者様につき、術前 CT データ、血圧、心電図、圧波形等を元に術前の血流シミュレーションを行い、最大応力のかかる瘤壁部位を決定する。手術中に中枢吻合部形成の際に切除する正常径の大動脈と、シミュレーションにて決定した瘤壁部位を採取する。破裂群に関しては、事前シミュレーションが不能である可能性が高く、正常径の大動脈と破裂孔周囲の動脈壁を採取し、後ろ向きに血流シミュレーションを行う。シミュレーションデータと実際の破裂孔が一致しない場合には、研究対象から除外する(図1)。

採取瘤壁はホルマリン固定前と固定後にマイクロ X 線 CT を撮影し、後に組織を全割して行う免疫染色の切片データとの照らし合わせ・3D 再構築ができるようにしておく。固定後の切片は、対照として DAB による免疫染色と高輝度蛍光粒子を使用した定量的免疫染色を行い、MMP 等の蛋白分解酵素発現量、細胞外基質発現量の定量スコアと大動脈拡大速度との相関係数を割り出し、AAA 拡大速度・破裂を規定する病理学的因子を同定する(図1)。

本研究計画は臨床症例を対象とする前向きコホート研究であり、倫理申請は研究代表者である濱田が行う。症例の集積・フォローは、分担研究者の後藤・赤松・菅原が行う。臨床で得られた大動脈瘤の臨床情報を元にして、分担研究者の今井教授(神戸大・工学部)が血流シミュレーションを行い、至適な瘤壁の部位決定を行う。術中の瘤壁採取については後藤・赤松・菅原が順次行う。組織固定前と固定後にマイクロ X 線 CT については分担研究者の権田と研究協力者の徳永が行う。その後、切片の DAB 染色、定量的免疫染色、データの統計解析は濱田・権田で行い、最終的なデータとりまとめは濱田が行う(図2)。



4. 研究成果

本研究助成の全期間にわたって、研究費獲得後に発生したコロナウイルス感染拡大によって、研究活動が大きく制限され、研究計画遂行 に大きな支障が生じていた。

したがって、当初は大動脈血流シミュレーションに関しては、オンライン会議を駆使して、大動脈瘤の拡大速度を規定する病理組織学的因子を解析するため、その技術の確立と習得、大動脈瘤症例の瘤径の経時的変化の観察、また、大動脈瘤壁の組織サンプルの蓄積、得た技術をもとにした大動脈瘤破裂症例のシミュレーションを実験的に進める予定であった。

しかしながら、最近になって 5 類感染症に格下げとなったもののコロナウイルス感染症の影響は、研究機関全体にわたって色濃く、研究代表者が所属する のが大規模医療機関である事も影響して、症例の蓄積は思うように進まず、研究費の使用もほとんど実施できなかった。大動脈瘤血流シミュレーションソフトを開発する予定であった神戸大学との共同研究も、数回のウェブミーティングを行ったものの、プログラムを完成させるには至らなかった。

したがって、残念ながら進捗を得る事ができなかった。前述したように、研究費獲得後に大きく社会情勢が変化し、患者様の情報を基盤とした研究において、症例の蓄積をすることができず、前提となったシミュレーションプログラム作成に関しても、人的交流が長期間制限された事は全く予定外であり、研究代表者の努力では如何ともしがたい状況であった。したがって、本研究に関しては、残念ながら研究継続をあきらめざるをえず、研究費を返還する事としている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|--|---|----|
| 研究分担者 | 後藤 均 (Gotoh Hitoshi) (00400333) | 東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師 (11301) | |
| 研究分担者 | 赤松 大二朗 (Akamatsu Daijiro) (40420012) | 東北大学・大学病院・講師 (11301) | |
| 研究分担者 | 今井 陽介 (Imiai Yousuke) (60431524) | 神戸大学・工学研究科・教授 (14501) | |
| 研究分担者 | 菅原 宏文 (Sugawara Hirofumi) (60451572) | 東北大学・大学病院・助教 (11301) | |
| 研究分担者 | 権田 幸祐 (Gonda Kohsuke) (80375435) | 東北大学・医学系研究科・教授 (11301) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|