

令和 5 年 6 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09119

研究課題名(和文) アミノペプチダーゼ蛍光プローブによる動脈硬化病変イメージングと血管外科治療の応用

研究課題名(英文) Novel method to evaluate nature of vessel wall in atherosclerosis by fluorescent probes reacting specific protease for vascular surgery

研究代表者

赤木 大輔 (Akagi, Daisuke)

東京大学・医学部附属病院・届出研究員

研究者番号：20464753

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：血管外科手術施行時は術者の経験と肉眼所見で「健全性」を判断している。しかし、動脈硬化や変性のある動脈に対する適切な客観性のある「健全性」の定義が必要である。特定の酵素に対して反応するアミノペプチダーゼと蛍光を組み合わせたプローブを用い、動脈組織中の酵素活性を調べた。健全と考えられる大動脈壁と拡張し破裂に危機に瀕している大動脈瘤壁を採取し、それぞれに300種類以上のプローブ中から反応性の違いを検出した。そして、二次元電気泳動であるDiced Electrophoresis Gel (DEG) 法を用い「健全」と考えられる動脈壁に認められる酵素の同定をおこなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で用いたプローブは、組織に噴霧するだけで短時間で酵素を特異的に検出できる画期的な技術である。時間的に制限のある手術や処置においても充分対応可能と考えられる。血管の健全性を担保する酵素の同定は学問的に動脈硬化、変性、加齢などの学術的研究に寄与するだけでなく、適切な手術術式の選択に寄与する可能性が高く、その社会的意義は高い。

研究成果の概要(英文)：At performing vascular surgery, "healthiness" in vasculature is determined by the surgeon's experience and gross findings. However, an appropriate and objective definition of "healthiness" for arteries with atherosclerosis or degeneration is needed. We examined enzyme activity in arterial tissue using a probe that combines fluorescence and aminopeptidase, which reacts to specific enzymes. Aortic walls that were considered healthy and aortic aneurysm walls that were dilated and in danger of rupturing were collected. Differences in reactivity were detected in each among more than 300 different probes. The Diced Electrophoresis Gel (DEG) method, a two-dimensional electrophoresis technique, was then used to identify the enzymes found in the "healthy" arterial wall.

研究分野：血管外科学 生化学

キーワード：アミノペプチダーゼ 動脈壁 動脈疾患 大動脈瘤 閉塞性動脈疾患

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

動脈硬化は全身性疾患であり、画像診断上あるいは術中の触診上一見硬化性変化が乏しい病変であっても実際は硬化性変化を認めることは多い。血行再建を行う血管外科手術において「健常」部に対し血管吻合操作を行うべく「健常部」を判断するが、術者の主観によらない「健常」の定義は現時点では困難である。その理由は生化学に立脚した客観的評価基準がないためである。本研究では特異的な酵素活性により緑色蛍光発光を得るアミノペプチダーゼ反応(HMRG; Hydroxymethyl Rhodamine Green)プローブに注目し動脈壁の性状による酵素反応に注目し血管性状と関連する生化学的性質の検討を行った。

### 2. 研究の目的

動脈硬化などの病的血管といわゆる「健常部」で酵素活性に対する反応性の異なるプローブの同定することにより、客観的な診断基準の確立を目指す。また、プローブに反応するターゲット酵素を同定する。この結果より、動脈疾患の学術的探査に寄与するとともに、このプローブを術中に使用するなどの臨床応用を目指すことを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 1) 臨床動脈サンプル収集

解析に供する血管切片の収集を行った。あくまで手術治療で切除された病変を対象とし、本研究のためだけの追加切除は施行していない。

#### 2) 動脈壁と反応するプローブ選択

##### (1) In vitro スクリーニング

大量のプローブから反応するプローブを選択するため、第一に 3 症例で採取された非拡張部動脈壁の内膜層をホモジナイズすることで得られた上清を 383 種類のプローブと混和し蛍光強度を測定した。蛍光検出器 Envision®により 1 時間での蛍光強度変化を指標とした。

##### (2) Ex vivo スクリーニング

次の段階として、ターゲット酵素の局在やプローブの膜透過性の影響を考慮し、血管壁のままに蛍光反応が得られるプローブ選択に移った。前段階で絞りこんだプローブを単一の標本にアプラインし蛍光反応を評価した。方法として候補である 20 種類のプローブを針の先端に充填させたスタンプを作成した。非拡張部血管壁の内腔側面よりスタンプを押しプローブを圧着させることにより反応させ、蛍光強度評価機器蛍光強度 Maestro®により蛍光強度を測定した。

#### 3) 動脈壁における in situ イメージング

大動脈瘤壁及び非拡張部動脈壁に対して、前段階で絞り込みされた 3 種類のプローブ浸漬ゲルを血管壁内腔側より適応し、Maestro®で蛍光強度を評価した。

#### 4) ターゲット酵素の同定と動脈壁における発現

(1) 二方向電気泳動法 (Diced Electrophoresis Gel; DEG) 法で分離を行い、質量分析法でターゲット酵素を同定した。

(2) ターゲット酵素の動脈壁における発現の確認検討  
免疫染色法やウェスタンブロットを用いて行った。

### 4. 研究成果

#### 1) 臨床動脈サンプル収集

開腹大動脈瘤切除術における瘤壁と非拡張部動脈壁を本研究に用いることとし、以下の検討に供した。標本は -80 度のフリーザーに匿名化の上凍結保存した。

#### 2) 動脈壁と反応するプローブ選択

##### (1) In vitro スクリーニング

3 症例で採取された非拡張部動脈壁の内膜層をホモジナイズすることで得られた上清をプローブと混和し蛍光強度を測定した。測定開始後 1 時間のタイミングでの蛍光強度変化を指標として 20 種類のプローブへ絞り込みを行った。

##### (2) Ex vivo スクリーニング

より反応の高い蛍光強度の高いプローブを 20 種類から 3 種類まで絞り込みを行った。

##### 3) 動脈壁における in situ イメージング

3 種類の HMRG プローブ全てにおいて瘤壁よりも非拡張部動脈で強い蛍光反応を示した。(図 1) その中で最も蛍光強度において Cut off 値が高く、感度/特異度が優れているプローブを最も効果的と判断した。このプローブは HMRG 基に methionine を付加したものである。

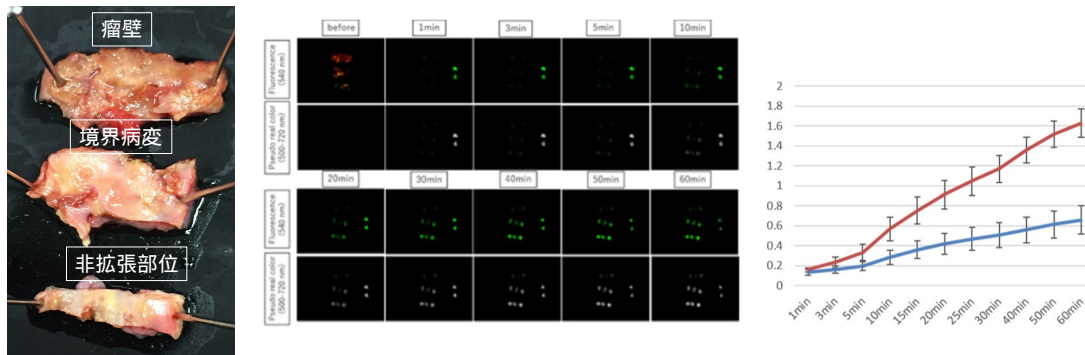


図1 イメージングの実際及び蛍光強度の経時的変(赤線；非拡張部位、青線；瘤壁)

#### 4) ターゲット酵素の同定と動脈壁における発現

##### (1) ターゲット酵素の同定

絞り込んだ methionine HMRG プローブのターゲット酵素を同定する目的で Diced Electrophoresis Gel 法 (DEG 法) を施行した。非拡張部動脈壁では Spot が 3 つ確認された。一方、動脈瘤壁では Spot は 2 個のみであり、いわゆる Spot.3 (図 2) が非拡張部(「巣上部に近いと考えられる」)動脈壁に特異的である可能性が示唆された。同 Spot3 は質量分析法にて Puromycin sensitive aminopeptidase と Bleomycin hydrolase である可能性が示唆された。

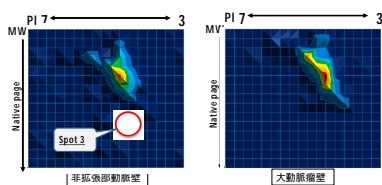


図 2 DEG 法による SPOT 発現

##### (2) 動脈壁における酵素発現

動脈壁において、Puromycin sensitive aminopeptidase と Bleomycin hydrolase がウエスタンブロットング法で発現を認めた。Activity を測定計測したところ、Puromycin sensitive aminopeptidase とより強い相関があると考えられた。

免疫染色では Puromycin sensitive aminopeptidase は吻合部動脈壁の内膜において瘤壁と比較し発現を認めた。一方、Bleomycin hydrolase は吻合部動脈内膜側における有意な発現は認めなかった。

以上の結果により、methionine-HMRG のターゲット酵素としては Puromycin sensitive aminopeptidase の可能性が最も強いと考えられる。この明らかとなった生物学的性質を基盤と、このプローブの蛍光強度の差を利用することで、血管性状を客観的に評価出来る可能性があると考えられた。

今後は、Methionine-HMRG を使用した動脈瘤手術における術中評価を目指した動脈壁診断システムの開発に加え、診断用薬剤としての創薬も念頭にいた展開が考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ichihashi S, Takahara M, Iida O, Suzuki K, Yamaoka T, Maeda K, Tobita K, Kobayashi T, Nakama T, Shingaki M, Ozaki S, Akagi D, Soga Y, Iwakoshi S, Fujimura N, Kichikawa K.	4. 巻 14
2. 論文標題 Clinical Impact of Stent Graft Thrombosis in Femoropopliteal Arterial Lesions.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JACC Cardiovasc Interv.	6. 最初と最後の頁 1137-1147
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jcin.2021.03.030.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hashimoto T, Akagi D, Yamamoto S, Suhara M, Sato O, Deguchi J.	4. 巻 73
2. 論文標題 Short interposition with a small-diameter prosthetic graft for flow reduction of a high-flow arteriovenous fistula.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Vasc Surg.	6. 最初と最後の頁 285-290
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jvs.2020.05.035.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tamura T, Akagi D, Tabuchi A, Yunoki Y, Yamane N, Kuwada N, Yamasawa T, Watanabe Y, Kanaoka Y, Tanemoto K.	4. 巻 62
2. 論文標題 A Case of Popliteal Artery Aneurysm Repair with Superficial Femoral Vein Graft	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Jpn Coll Angiol	6. 最初と最後の頁 15-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7133/jca.21-00024	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kuwada N, Akagi D, Watanabe Y, Kanaoka Y, Tanemoto K.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Endovascular Stent Graft Placement and Coil Embolization for Splenic Artery Aneurysm with an Anatomical Variant	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Angiol	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1055/s-0042-1742588	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hashimoto T, Akagi D, Yamamoto S, Suhara M, Sato O, Deguchi J.	4. 巻 73
2. 論文標題 Short interposition with a small-diameter prosthetic graft for flow reduction of a high-flow arteriovenous fistula	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Vasc Surg.	6. 最初と最後の頁 285-290
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jvs.2020.05.035.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 赤木大輔	4. 巻 60
2. 論文標題 血行再建術後内膜肥厚の基盤となる炎症制御に注目した治療戦略 抗炎症性脂質メディエーター (SPM) の可能性	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 脈管学	6. 最初と最後の頁 197-203
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 赤木大輔.
2. 発表標題 血管内治療ワークショップ (EVT-WS) が若手血管外科医育成に果たす役割 (心臓血管外科専門医指導医講習会).
3. 学会等名 第49回日本血管外科学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 赤木大輔.
2. 発表標題 当科におけるGVGに基づくCLTI治療戦略の検討.
3. 学会等名 第51回日本心臓血管外科学会学術総会.
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 赤木大輔.
2. 発表標題 静脈疾患の基礎と評価指標.
3. 学会等名 JET (Japan Endovascular Treatment Conference) educational course. (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 赤木大輔.
2. 発表標題 伏在静脈不全に対するペナシール治療の初期成績.
3. 学会等名 第41回日本静脈学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akagi D, Seo A and Nemoto Y.
2. 発表標題 Real safety and preventing retreatments in femoro-popliteal EVT with drug devices.
3. 学会等名 The 48th Annual Meeting of Japanese Society for Vascular Surgery. (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 赤木大輔.
2. 発表標題 「血管外科医の最前線 (2)」 ~ 中堅血管外科医から ~ 4年間で変わったこと、変わらなかったこと.
3. 学会等名 第15回Japan Endovascular Symposium (JES). (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 赤木大輔、瀬尾明彦、根元洋光.
2. 発表標題 外科的血行再建手術と血管内治療を併施した「ハイブリッドPAD治療」の実際と次世代への展開.
3. 学会等名 第61回日本脈管学会総会.
4. 発表年 2020年

〔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	高山 利夫  (TAKAYAMA TOSHIO)  (80802694)	東京大学・医学部附属病院・講師   (12601)	
研究分担者	保科 克行  (HOSHINA KATUYUKI)  (90571761)	東京大学・医学部附属病院・准教授   (12601)	
研究分担者	石原 聡一郎  (ISHIHARA SOICHIRO)  (00376443)	東京大学・医学部附属病院・教授   (12601)	

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
---------	---------