

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591861

研究課題名(和文) 腹部大動脈瘤の進展メカニズムの解明とその治療戦略の基礎構築

研究課題名(英文) Mechanisms of abdominal aortic aneurysm formation.

研究代表者

佐々木 健 (Sasaki, Takeshi)

浜松医科大学・技術部・技術専門職員

研究者番号：20397433

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：腹部大動脈瘤(AAA)は腎動脈分岐部から腸骨動脈の間に生じ、このAAAが破裂した場合は高い死亡率に達する重篤な疾患であるが、このAAAの形成・進展・破裂の機序はあまり研究が進んでいない。一方、AAAの形成に対して炎症細胞とそれ由来のプロテアーゼの関与が疑われている。本研究では、AAA病変における炎症細胞の浸潤とプロテアーゼの発現について検討した。

ヒトAAA病変において各炎症細胞の浸潤が認められ、それらの浸潤は正常腹部大動脈に比べて高度であった。一方、幾つかのプロテアーゼ発現もAAA瘤化部で高値を示した。

以上の結果から、AAAの形成・進展に炎症細胞とそれら由来のプロテアーゼの関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Abdominal aortic aneurysm (AAA) is a common disease among elderly individuals. It is suggested that inflammatory cells and proteases contribute to AAA formation. Therefore, we investigated the localization of inflammatory cells in AAA lesion. In addition, we examined the expression of proteases and their endogenous inhibitors.

Abdominal aortic tissue was harvested either from autopsy (control) or during open-repair surgery for AAA. Localization of macrophages, B cells, T cells and neutrophils were observed in AAA lesion, and significantly higher infiltration of these inflammatory cells into vascular wall of AAA was observed compared with control. More extensive immunostaining of MMPs and elastases was detected in AAA. These proteases expressed in inflammatory cells. On the other hand, expression of endogenous inhibitors against these proteases was decreased in AAA lesion.

These results suggest that inflammatory cells and some proteases may participate in AAA formation.

研究分野：循環器学

キーワード：腹部大動脈瘤 炎症細胞 B細胞 カテプシン MMP

1. 研究開始当初の背景

大動脈瘤は動脈の異常な拡張であり、特に腹部大動脈瘤(AAA)は腎動脈分岐部から腸骨動脈の間に生じるもので、大動脈瘤の中でも最も頻度が高い。このAAAは直径5-6cm以上になると破裂の危険が高まるとされており、破裂した場合は非常に高い死亡率に達する極めて重篤な疾患である。しかしながら、このAAAの形成・進展・破裂に関するメカニズムについてはあまり研究が進んでいないのが現状である。

マトリクスメタロプロテアーゼ(MMP)やカテプシン(CAT)は生体内で機能するプロテアーゼである。これらは血管壁に集簇した炎症細胞等から分泌され、血管壁を構成するエラスチンやコラーゲン等の細胞外マトリクス(ECM)を分解し、血管疾患の進行や組織のリモデリングに関与するとされ、特に粥状動脈硬化症において盛んに研究されている。研究代表者らも、これらのプロテアーゼと動脈硬化症との関係について研究し、その関与を示してきた。一方、AAAの病態とプロテアーゼの関係についての報告はなされていないものの、まだ研究が十分ではなく、その関与についても不明な部分が多い。しかし、これらのプロテアーゼはECMの分解を強力に促進すること、AAAでは血管壁を構成するECMの分解が見られ、それによる血管壁の脆弱化が予測されることなどから、これらのプロテアーゼがAAAの進展に大きく関与する可能性が疑われる。さらに、研究代表者の予備的な実験では、AAAの瘤化部に幾つかのプロテアーゼ(CAT S, CAT K, MMP-2, -9)の発現が認められ、それは非瘤下部よりも高いという、たいへん興味深い結果が得られている。加えて、研究代表者は現在MMP-2、CAT S、CAT Kの各プロテアーゼ遺伝子の欠損マウスを有し、AAAにおけるこれらプロテアーゼの関与を検討できる環境に置かれている。

2. 研究の目的

研究代表者は、本研究を遂行するにあたり次のような仮説を立てている。「AAAの進展、形成、破裂においては、その病変部周囲に多くの炎症細胞が浸潤・集簇し、それらが何らかの刺激(調節因子)により、MMPやCATのようなプロテアーゼを分泌する。この分泌されたプロテアーゼが動脈壁の骨格的な役割を担うECMを分解し、動脈壁の脆弱化を招く。その結果、動脈壁の抗張力が低下し、瘤化やその破裂が引き起こされる」という仮説である。

本研究は上記仮説を検証する目的で、以下の項目について実験を行った。

- ・ヒトの腹部大動脈瘤の病理組織における炎症細胞とプロテアーゼの同定
- ・腹部大動脈瘤モデル動物の病変部における炎症細胞とプロテアーゼの同定
- ・各プロテアーゼの調節因子の検討

以上の内容を、組織学的、分子生物学的により検討、解析し、AAAの進展メカニズムの解明を行なう予定である。

3. 研究の方法

浜松医科大学付属病院血管外科および病理部にて採取されたヒトAAAの病理組織を3μm厚で薄切し、HE染色、好中球及びマクロファージのマーカー抗体による免疫組織化学染色を行ない、その局在を検討した。また、それぞれの抗体に対する染色領域の比較を、正常腹部大動脈、AAAの非瘤化部、中間部、瘤化部との間で行った。さらに、それらの細胞で発現するプロテアーゼについても、免疫蛍光二重染色により同定を行なった。

4. 研究成果

HE染色ではAAA病変の外膜の中膜近位の領域において、炎症細胞の浸潤が多数確認された。一方、正常腹部大動脈ではこのような病理像が認められなかった(図1)。

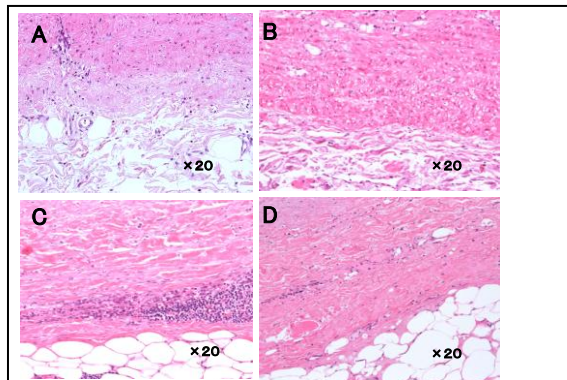


図1. AAAのHE染色像

正常腹部大動脈(A)、AAA非瘤化部(B)、AAA中間部(C)、AAA瘤化部(D); AAA中間部や瘤化部では炎症細胞の浸潤が認められた。

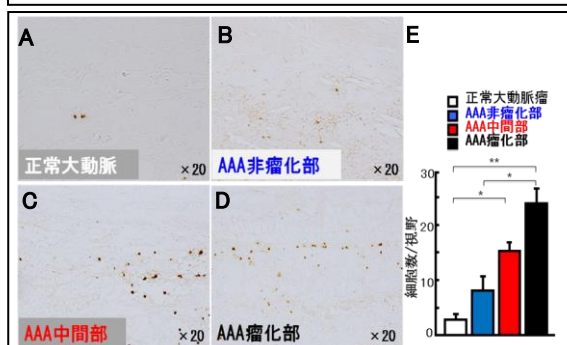


図2. 好中球の免疫染色像

正常腹部大動脈(A)、AAA非瘤化部(B)、AAA中間部(C)、AAA瘤化部(D)、各部位の好中球数の比較(E);好中球の浸潤細胞数はAAA中間部や瘤化部で有意に上昇していた。

好中球のマーカー抗体による免疫組織化学染色では、AAA病変の外膜の中膜近位領域に多数の好中球の浸潤が認められ、その数は中間部及び瘤化部で有意に高値を示した(図2)。また、抗マクロファージ抗体による免疫

組織化学染色では、好中球と同様に、外膜の中膜近位領域に多数のマクロファージの浸潤が確認され、その数は瘤化部で有意に高い値であった(図3)。

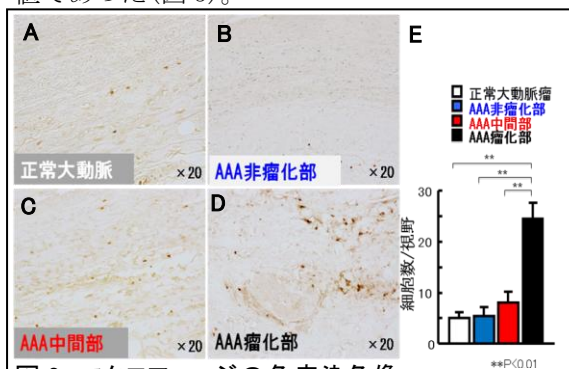


図3. マクロファージの免疫染色像

正常腹部大動脈(A)、AAA非瘤化部(B)、AAA中間部(C)、AAA瘤化部(D)、各部位のマクロファージ数の比較(E);AAA瘤化部ではマクロファージの浸潤細胞数が有意に高かった。

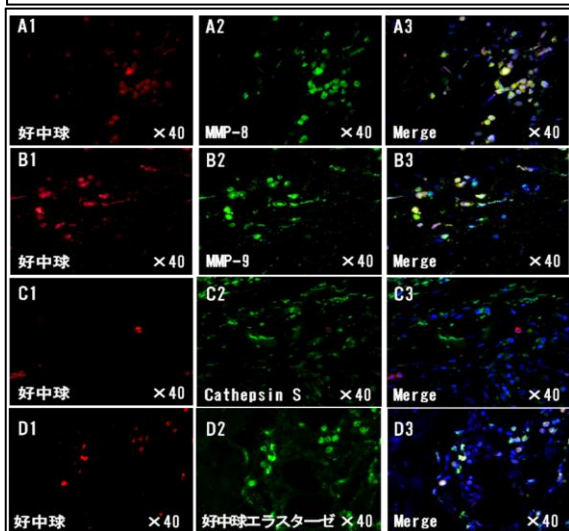


図4.好中球とプロテアーゼの蛍光二重染色

好中球マーカー抗体とMMP-8 (A1-3)、MMP-9 (B1-3)、Cathepsin S (C1-3)及び好中球エラスターゼ(D1-3)との蛍光二重染色。MMP-8、-9及び好中球エラスターゼの局在は好中球の局在と一致した。一方、Cathepsin Sとの局在の一致は殆ど見られなかった。

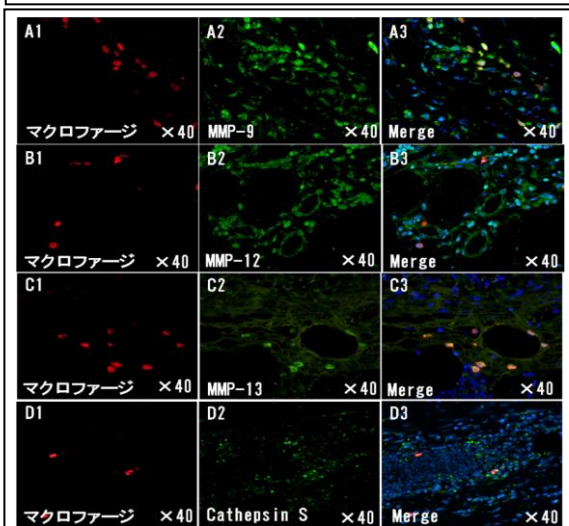


図5.マクロファージとプロテアーゼの蛍光二重染色

マクロファージマーカー抗体とMMP-9 (A1-3)、MMP-12 (B1-3)、MMP-13 (C1-3)及びCathepsin S (D1-3)との蛍光二重染色。MMP-9、-12、-13及びCathepsin Sの局在はマクロファージの局在と一致した。

各細胞でのプロテアーゼの発現について免疫蛍光二重染色を行ったところ、好中球ではMMP-8、-9、好中球エラスターゼと、マクロファージではMMP-9、-12、-13及びCathepsin Sと局在が一致する部分が認められた(図4-5)。

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24件)

1). Setoguchi T, Kikuchi H, Yamamoto M, Baba M, Ohta M, Kamiya K, Tanaka T, Baba S, Goto-Inoue N, Setou M, Sasaki T, Mori H, Sugimura H, Konno H. Microarray Analysis Identifies Versican and CD9 as Potent Prognostic Markers in Gastric Gastrointestinal Stromal Tumors. *Cancer Science* 102. 883-9 (2011), 査読有
doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.01872.x

2). Cheng XW, Kuzuya M, Sasaki T, Inoue A, Hu L, Song H, Huang Z, Li P, Takeshita K, Hirashiki A, Sato K, Shi GP, Okumura K, Murohara T. Inhibition of Mineralocorticoid Receptor is a Renoprotective Effect of an HMG CoA Reductase Inhibitor Pitavastatin. *Journal of Hypertension* 29. 542-52 (2011), 査読有
doi: 10.1097/HJH.0b013e328341cedf.

3). 川端弥生、佐々木健、鈴木直美、小島俊男. 薄切した保存標本におけるD2-40抗体を用いた免疫染色性の変化. *生物学技術研究会報告* 22. 75-78 (2011), 査読無

4). 佐々木健、葛谷雅文、成憲武、中村香江、鈴木直美、川端弥生、佐藤康二. マウス粥状動脈硬化病変における脂肪染色 en face 解析後のパラフィン切片作成と組織学的解析. *生物学技術研究会報告* 22. 71-74 (2011), 査読無

5). Zaima N, Sasaki T, Tanaka H, Cheng XW, Onoue K, Hayasaka T, Goto-Inoue N, Enomoto H, Unno N, Kuzuya M, Setou M. Imaging mass spectrometry-based histopathologic examination of atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* 217. 427-432 (2011), 査読有
doi:

10. 1016/j.atherosclerosis.2011.03.044.
- 6). Cheng XW, Song H, Sasaki T, Hu L, Inoue A, Bando YK, Shi GP, Kuzuya M, Okumura K, Murohara T. Angiotensin type 1 receptor blocker reduces intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein e-deficient mice. *Hypertension* 57. 981-989 (2011), 査読有 doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.168385.
- 7). Furuta N, Yaguchi C, Itoh H, Morishima Y, Tamura N, Kato M, Uchida T, Suzuki K, Sugihara K, Kawabata Y, Suzuki N, Sasaki T, Horiuchi K, Kanayama N. Immunohistochemical Detection of Meconium in the Fetal Membrane, Placenta and Umbilical Cord. *Placenta* 33. 24-30 (2012), 査読有 doi: 10.1016/j.placenta.2011.10.007.
- 8). Kozawa E, Nishida Y, Cheng XW, Urakawa H, Arai E, Futamura N, Shi GP, Kuzuya M, Hu L, Sasaki T, Ishiguro N. Osteoarthritic change is delayed in a cathepsin K knockout mouse model of osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism* 64. 454-464 (2012), 査読有 doi: 10.1002/art.33398.
- 9). Tanaka H, Zaima N, Sasaki T, Yamamoto N, Sano M, Konno H, Setou M, Unno N. Loss of lymphatic vessels and regional lipid accumulation is associated with great saphenous vein incompetence. *Journal of Vascular Surgery* 55. 1440-1448 (2012), 査読有 doi: 10.1016/j.jvs.2011.09.064.
- 10). Cheng XW, Shi GP, Kuzuya M, Sasaki T, Okumura K, Murohara T. Role for cysteine protease cathepsins in heart disease: focus on biology and mechanisms with clinical implication. *Circulation* 125. 1551-1562 (2012), 査読有 doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.066712.
- 11). 佐々木健、川端弥生、鈴木直美、古田直美、谷口千津子、森田真知子、伊東宏晃、金山尚裕、小島俊男、佐藤康二. 二種類のホルマリン色素除去法(Kardasewitsch 法及び Verocay 法変法)の比較検討 - 免疫染色への影響-. *生物学技術研究会報告* 23. 30-33 (2012), 査読無
- 12). Miyazaki K, Ohno K, Tamura N, Sasaki T, Sato K. CLP36 and RIL recruit α -actinin-1 to stress fibers and differentially regulate stress fiber dynamics in F2408 fibroblasts. *Experimental Cell Reserch*. 318. 1716-25. (2012), 査読有 doi: 10.1016/j.yexcr.2012.05.006.
- 13). Kohmura YK, Kanayama N, Muramatsu K, Tamura N, Yaguchi C, Uchida T, Suzuki K, Sugihara K, Aoe S, Sasaki T, Suganami T, Ogawa Y, Itoh H. Association Between Body Weight at Weaning and Remodeling in the Subcutaneous Adipose Tissue of Obese Adult Mice With Undernourishment In Utero. *Reproductive Sciences*. 20, 813-27. (2013), 査読有 doi: 10.1177/1933719112466300.
- 14). Sasaki T, Nakamura K, Sasada K, Okada S, Cheng XW, Suzuki T, Murohara T, Sato K, Kuzuya M. Matrix metalloproteinase-2 deficiency impairs aortic atherosclerotic calcification in ApoE-deficient mice. *Atherosclerosis* 227. 43-50 (2013), 査読有 doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2012.12.008.
- 15). Tanaka H, Zaima N, Sasaki T, Hayasaka T, Goto-Inoue N, Onoue K, Ikegami K, Morita Y, Yamamoto N, Mano Y, Sano M, Saito T, Sato K, Konno H, Setou M, Unno N. Adventitial vasa vasorum arteriosclerosis in abdominal aortic aneurysm. *PLoS One* 8. e57398 (2013), 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0057398.
- 16). Yamagishi S, Mikawa S, Furukawa H, Sasaki T, Ito T, Ueki T and Sato K. Spine Homeostasis as a Novel Therapeutic Target for Schizophrenia. *Clinical Pharmacology & Biopharmaceutics* S1. e001 (2013), 査読有 doi: 10.4172/2167-065X.S1-001
- 17). Ide Y, Waki M, Hayasaka T, Nishio T, Morita Y, Tanaka H, Sasaki T, Koizumi K, Matsunuma R, Hosokawa Y, Ogura H, Shiiya N, Setou M. Human breast cancer tissues contain abundant phosphatidylcholine (36:1) with high stearoyl-CoA desaturase-1 expression. *PLoS ONE* 8. e61204 (2013), 査読有 doi:10.1371/annotation/63c5359c-b1d2-44d8-944f-7bde0d6ec946.
- 18). Sasaki T, Ito T, Takemura A, Kato S, Sato K. The case of difficult infusion of formaldehyde solution in cadavers to embalm for anatomy teaching, and an improved method for infusion. *生物学技術研究会報告* 24. 66-69 (2013), 査読無
- 19). Sano M, Sasaki T, Hirakawa S, Sakabe

J, Ogawa M, Baba S, Zaima N, Tanaka H, Inuzuka K, Yamamoto N, Setou M, Sato K, Konno H, Unno N. Lymphangiogenesis and angiogenesis in abdominal aortic aneurysm. PLoS One 9. e89830 (2014), 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0089830.
eCollection 2014.

20). Sasaki T, Kawabata Y, Suzuki N, Tanaka H, Sano M, Kato K, Takemura A, Unno N, Kojima T, Sato K. The decrease in D2-40 immunoreactivity of stored paraffin sections and preservation methods to keep the D2-40 immunoreactivity. Biotechnic and Histochemistry 89. 412-418 (2014), 査読有
doi: 10.3109/10520295.2013.821166.

21). Sasaki T, Uebayashi A, Takemura A, Kato S, Sato K. Development of new services for technical specialist in the department of anatomy. 生物学技術研究会報告 25, 29-32 (2014), 査読無

22). Cheng XW, Sasaki T, Kuzuya M. The role of cysteinyl cathepsins in venous disorders. Thrombosis and Haemostasis 112. 216-218 (2014), 査読有
doi: 10.1160/TH13-10-0889.

23). Li X, Cheng XW, Hu L, Wu H, Guo-Ping, Hao CN, Jiang H, Zhu E, Huang Z, Inoue A, Sasaki T, Du Q, Takeshita K, Okumura K, Murohara T, Kuzuya M. Cathepsin S activity controls ischemia-induced neovascularization in mice. International Journal of Cardiology. 183, 198-208 (2015), 査読有
doi: 10.1016/j.ijcard.2015.01.058.

24). Sasaki T, Kamei J, Kawakami Y, Kawashima D, Kawada A, Takahashi T, Takeuchi A, Takemura A, Kato S, Sato K. The case that the cadaver acquired a massive tattoo on the back contributed to the education for allied health professional students. 生物学技術研究会報告 in press (2015), 査読無

[学会発表] (計 23 件)

1). 佐々木健、笹田久美子、岡田聡、中村香江、成憲武、鈴木亨、葛谷雅文、佐藤康二。ApoE 欠損マウスの大動脈石灰化における MMP-2 の関与。第 4 回大動脈瘤分子病態研究会。2011 年

2). 佐々木健、川端弥生、鈴木直美、古田直美、谷口千津子、金山尚裕、佐藤康二。二種類のホルマリン色素除去法 (Kardasewitsch 法及び Verocay 法変法) の比較検討。第 23 回

生物学技術研究会。2012 年

3). 川端弥生、佐々木健、鈴木直美、古田直美、谷口千津子、森田真知子、伊東宏晃、金山尚裕、佐藤康二、小島俊男。二種類のホルマリン色素除去法の比較検討 - 免疫染色への影響 -。第 6 回浜松医科学シンポジウム。2012 年

4). 佐々木健、森田真知子、佐藤康二。腹部大動脈瘤の形成・進展のメカニズムについて。第 6 回浜松医科学シンポジウム。2012 年

5). 佐々木健、伊藤武司、佐藤康二。系統解剖実習用の献体の保存方法とその防腐処置に難渋した例。平成 23 年度浜松医科大学・技術発表会。2012 年

6). 佐々木健、鈴木直美、川端弥生、谷口千津子、金山尚裕、佐藤康二。二種類のホルマリン色素除去法 (Kardasewitsch 法及び Verocay 法変法) の比較検討 - 免疫染色への影響 -。第 117 回日本解剖学会総会。2012 年

7). Masaki Sano, Mikako Ogawa, Takeshi Sasaki, Naoki Unno, Katsutoshi Miura, Satoshi Hirakawa, Minoru Suzuki. Longitudinal evaluation of subcutaneous lymphatics in secondary lymphedema model of a rat hind limb. 2011 World Molecular Imaging Congress. 2011

8). 佐々木健、森田真知子、佐野真規、田中宏樹、海野直樹、佐藤康二。腹部大動脈瘤における B 細胞の局在とレニン-アンジオテンシン系との関連性。第 72 回日本解剖学会中部支部学術集会。2012 年

9). 佐々木健。免疫染色技術の再確認 - より適した固定・包埋・抗原賦活法等の選択と web を使ったより良い抗体の選び方 (探し方) -。平成 24 年度 浜松医科大学・学内技術セミナー。2013 年

10). 佐々木健、伊藤武司、竹村綾奈、加藤娑智穂、佐藤康二。系統解剖実習用の献体の防腐処置に難渋した例とその対処法。第 23 回生物学技術研究会・第 34 回生理学技術研究会。2013 年

11). 佐々木健、竹村綾奈、加藤娑智穂、森田真知子、佐藤康二。腹部大動脈瘤の形成・進展と炎症性細胞の関連性 - 特に B 細胞に着目した研究 -。第 9 回浜松医科学シンポジウム。2013 年

12). 佐々木健。免疫染色や組織解析に使える小ワザ集 (研究会等で仕入れたものを中心に)。平成 24 年度 浜松医科大学・技術発

表会. 2013 年

13). Ayana Takemura, Takeshi Sasaki, Sachiho Kato, Machiko Morita, Hiroki Tanaka, Masanori Sano, Naoki Unno, Kohji Sato. Mechanisms of abdominal aortic aneurysm development. 第 18 回静岡健康・長寿学術フォーラム. 2013 年

14). Sachiho Kato, Takeshi Sasaki, Ayana Takemura, Kumiko Sasada, Satoshi Okada, Kae Nakamura, Xian Wu Cheng, Toyoaki Murohara, Masafumi Kuzuya, Kohji Sato. Matrix Metalloproteinase-2 Deficiency Impairs Aortic Atherosclerotic Calcification in ApoE-Deficient Mice. 第 18 回静岡健康・長寿学術フォーラム. 2013 年

15). 佐々木健、上林明日翔、竹村綾奈、加藤娑智穂、佐藤康二. Development of new services for technical specialist in the department of anatomy. 第 25 回生物学技術研究会 第 36 回生理学技術研究会. 2014 年

16). 佐々木健、朝生智之、上田駿介、上林明日翔、竹村綾奈、加藤娑智穂、森田真知子、佐藤康二. 腹部大動脈瘤の形成・進展のメカニズムに関する研究 -炎症細胞とプロテアーゼの関与について-. 第 12 回浜松医科大学シンポジウム. 2014 年

17). 佐々木健. 解剖学実習における技術職員の新しい取り組み. 平成 25 年度 浜松医科大学・技術発表会. 2014 年

18). 竹村綾奈、加藤娑智穂、佐々木健、森田真知子、佐野真規、田中宏樹、海野直樹、佐藤康二. 腹部大動脈瘤の形成・進展メカニズムに関する組織学的研究. 199 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2014 年

19). 竹村綾奈、佐々木健、加藤娑智穂、田中宏樹、佐野真規、海野直樹、上田駿介、朝生智之、上林明日翔、佐藤康二. 腹部大動脈瘤の形成・進展メカニズムに関する研究 -B 細胞の局在と腹部大動脈瘤との関連性-. 第 7 回大動脈分子病態研究会. 2014 年

20). Takeshi Sasaki, Ayana Takemura, Sachiho Kato, Shunsuke Ueda, Tomoyuki Asao, Asuka Uebayashi, Hiroki Tanaka, Masanori Sano, Naoki Unno and Kohji Sato. Mechanisms of abdominal aortic aneurysm formation. 第 19 回静岡健康・長寿学術フォーラム. 2014 年

21). 佐々木健、亀井淳哉、川上優、川島大喜、河田紋華、高橋巧、竹内文子、竹村綾奈、加藤娑智穂、佐藤康二. The case that the cadaver acquired a massive tattoo on the

back contributed to the education for allied health professional students. -The relationship between tattoo and human immune systems-. 第 26 回生物学技術研究会 第 37 回生理学技術研究会. 2015 年

22). 佐々木健、高橋巧、竹内文子、上林明日翔、竹村綾奈、加藤娑智穂、佐藤康二. 腹部大動脈瘤における B 細胞とそのサブセットに関する研究 -IRA-B 細胞について-. 第 15 回浜松医科大学シンポジウム. 2015 年

23). 佐々木健. 背部に広範な刺青の入った解剖体が医学教育に貢献した例. 平成 26 年度 浜松医科大学・技術発表会. 2015 年

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 1 件)

名称：大動脈瘤動物モデル

発明者：海野直樹、田中宏樹、瀬藤光利、真野勇記、佐野真規、財満信宏、佐々木健

権利者：浜松医科大学

種類：発明

番号：特願 2011-105426、特開 2012-235715

出願年月日：平成 23 年 5 月 10 日

取得年月日：平成 24 年 12 月 6 日

国内外の別：国際特許

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.hama-med.ac.jp/index.html>

http://www.hama-med.ac.jp/uni_education_igakubu_igaku_shinkeikaibou.html

http://www.hama-med.ac.jp/uni_research_kenkyu.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 健 (SASAKI, Takeshi)

浜松医科大学・技術部・技術専門職員

研究者番号：20397433

(2) 研究分担者

成 憲武 (CHENG, Xian Wu)

名古屋大学・未来社会創造機構・准教授

研究者番号：30378228

海野 直樹 (UNNO, Naoki)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20291958

(3) 連携研究者

なし