

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461068

研究課題名(和文) 腹部大動脈瘤と瘤周囲脂肪との炎症性クロストークの解明

研究課題名(英文) Crosstalk between aortic aneurysm wall and peripheral adipose tissue

研究代表者

桑木 賢次 (KUWAKI, Kenji)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90398313

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)：大動脈瘤は動脈硬化を主体とする慢性炎症であることが広く知られており、また臓器の炎症が局所脂肪へも波及することが明らかにされている。しかし脂肪の炎症と大動脈の炎症に及ぼす影響についての知見は少ない。本研究では大動脈瘤周囲の脂肪と皮下脂肪を比較し、どのような差があるかを検討した。

大動脈瘤の手術時に皮下脂肪および大動脈瘤周囲の脂肪を採取しそれらを解析した。その結果、炎症性サイトカインの一部のみ瘤周囲でやや高値であった。また炎症性マクロファージ(M2)の割合が瘤周囲でやや高い傾向を認めた。線維化関連因子や血管新生関連因子の発現に差は認めなかった。一方でアディポネクチンは瘤周囲で発現が減少していた。

研究成果の概要(英文)：Aortic aneurysm was one of the diseases caused by arteriosclerosis, which is related with chronic inflammation. Recent study demonstrated an interaction of inflammation between artery and per arterial adipose tissue. However little known about the relationship aneurysm and peri-aortic adipose tissue. In this study, we compared the cytokine expression of adipose tissue among subdermal (SD) and peri-aneurysm (PA). The adipose tissues were obtained during open abdominal aneurysm repair surgery. Expression of inflammation-related cytokines was higher in PA. Expression of M1-macrophage was also higher in PA. Expression of angiogenesis-related cytokines or fibrosis-related cytokines were not different. Furthermore, the expression of adiponectin was reduced in PA.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：腹部大動脈瘤 脂肪組織 炎症性サイトカイン アディポネクチン

1. 研究開始当初の背景

近年のメタボリックシンドロームの有病率の増加から、今後ますます動脈硬化病変を持つ患者数は増加し、それに伴い大動脈瘤などの動脈硬化性疾患もまた増加していくことが予想される。同じ大動脈瘤であっても好発部位には大きな差があり、胸部と腹部では1:3の割合で腹部に多く、さらに腹部の中でも腎動脈分枝下がその80-95%を占めている。その理由として、大動脈遠位部では大動脈壁の弾性板が減少しているため壁構造そのものが脆弱になっていること、血管が次第に細くなっていきながら腸骨動脈へと分岐する構造であること、さらに周辺組織の支持が少ないため屈曲しやすくその場合、動脈壁が血流によるストレスを受けやすいことなどが指摘されている。大動脈瘤の増大因子として、この壁の脆弱性などの解剖学的特長に加え、血圧などの物理的ストレスが要因とされている。

近年、臓器周辺脂肪がその近接臓器に少なからず影響を及ぼすことが明らかにされてきた。例えばメタボリックシンドロームの肝臓発現型である非アルコール性脂肪肝（NAFLD）においては皮下脂肪よりも内臓脂肪がその増悪の危険因子であることが報告されている。また本研究の共同研究者らの鶴田らによってヒト冠動脈における血管周囲脂肪を解析した結果、冠動脈有意狭窄部周囲ではマクロファージの炎症マーカーが非狭窄部位と比べて異なるパターンであることが示された（現在論文投稿中）。これらのことから臓器周囲（血管周囲）脂肪と臓器や血管内皮の炎症とが密接に関与していることが強く示唆されている。

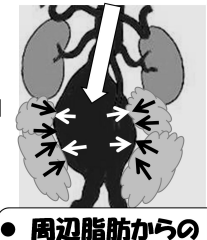
解剖学的に、胸部大動脈周囲には脂肪組織があまり存在しないが、腹部大動脈周辺には豊富に存在していることが知られている。これらの事実から、今回我々は動脈瘤の進展因子の一つとして大動脈周辺脂肪が関与

している可能性を考えた。

● 血流によるストレス



● 動脈壁の脆化

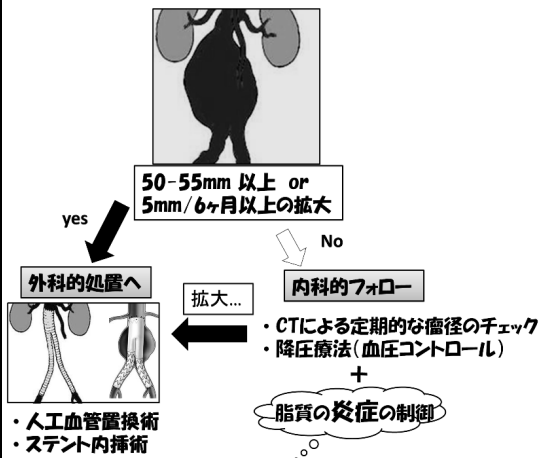


● 周辺脂肪からの炎症の波及？

本研究では、大動脈瘤の手術前に通常撮影されるCTを用いて大動脈周囲の脂肪を定量化する。次いで手術時において、1) 皮下脂肪、2) 大動脈周囲の脂肪組織、及び3) 切除された大動脈壁をそれぞれ採取し、それぞれの組織に含まれる炎症細胞を解析、皮下脂肪と大動脈周囲脂肪の間で組織に含まれる炎症サイトカインの発現量に差があるのかどうか、および血管周囲脂肪と大動脈瘤壁との間にこれらの炎症サイトカインや相互作用があるのかどうかを分子生物学的、組織化学的に検討するとともに、脂肪量と大動脈瘤の増大にどのような相関があるかを検証する

2. 研究の目的

現在の動脈瘤に対しての治療方針としては、拡大、もしくは急速な拡大傾向にある瘤に対しては外科的な除圧を行い、それ以下の場合、物理的ストレスの低減のため降圧薬の投与が第一選択とされる。しかしながらフォロー中に瘤の拡大を認めた場合はやはり手術適応となる（下図）。



新たな大動脈瘤径拡大予防の治療戦略の可能性

現在冠動脈疾患などの動脈硬化性病変においては、スタチンなどの脂質降下療法が一次予防、二次予防に対し有効であるという説が定着し、循環器病学会のガイドラインにも定められるようになった。同様に動脈硬化性の疾患である大動脈瘤においても、脂質や血糖のコントロールなども行われることがあるが、これはあくまで冠動脈疾患、脳血管疾患など付随する動脈硬化性疾患のリスク低減のためであり、瘤の拡大を抑制することを目的とするものではない。

本研究により大動脈瘤患者の血管周囲脂肪が瘤の増大に関与しており、また脂肪の質に差が生じていることが明らかになれば、大動脈径の拡大を防ぐための薬物療法という、新たな治療戦略の布石となると考えている。

これに該当する薬剤として、現段階ではスタチンや、脂質の生体内分布のリモデリング作用が示されている一部の糖尿病治療薬が考えられるが、本研究の結果によってはTNF- α 阻害剤など、より抗炎症効果に特化した大動脈瘤のための薬物治療の開発などへの可能性を秘めている。言い換えれば、これまで内科的フォロー中に瘤の拡大を認めたため外科手術となっていたような症例も、これらの治療（薬）を追加することによって、手術を回避させられることが期待される。この戦略は、高額な処置が必要とされる前にリスクを減少させる、いわゆる予防医学にもつながるものであり、医療費の高騰が問題となっている現況において、今後医療が目指す方向と合致するものである。

3 . 研究の方法

開腹による腹部大動脈瘤の手術適応となった患者を対象とした。性別・年齢・肥満度（BMI）・血圧・術前の血清脂質値（コレステロール、中性脂肪）・糖尿病の有無・内服薬・合併症をそれぞれ記録した。次いで大動脈瘤の開腹手術の際に腹部皮切部位より（a）皮下脂

肪、また（b）大動脈瘤周囲脂肪 および（c）正常大動脈周囲脂肪、さらに（d）切除された大動脈壁を、それぞれ採取した。また免疫染色用の組織作成のため血管壁と大動脈周囲脂肪は出来る限り付着した状態のまま採取した。

得られたサンプルから市販のキットを用いてRNAを抽出しcDNAを作成。GAPDHをコントロール遺伝子として $\Delta\Delta CT$ 法にてReal time PCRを行った。標的はこれまでの論文的考察から以下のmRNAとする：炎症性サイトカインであるIL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-10、IL-17、IL-33、マクロファージ関連遺伝子であるMCP-1、MCP-2、CD68、CD11c、CD206、アディポネクチン、細胞外マトリックス関連因子MMP1、MMP2とし、皮下脂肪をコントロールとして発現を比較する。

余剰サンプルがある場合はそれぞれの組織を約1cm x 1cmにカットし4%パラホルムアルデヒド内に浸し免疫染色用サンプルとする。脂肪と瘤壁とが連続した試料として採取された場合には連続した組織の状態に固定した。

4 . 研究成果

脂肪採取を行った27症例のうち、後に同意取り消しのあった1症例を除いた26例で解析を行った。平均年齢は66.2歳、女性は3例（11.5%）、平均体重67.8kgでBMIは24.9であった。術前合併症として高血圧が17例（65.4%）、高脂血症22例（84.6%）糖尿病3例（11.5%）腎機能障害3例（11.5%）であった。また24例（92.3%）に喫煙歴を認めた。また5例（19.2%）で術前の発作性心房細動を認めた。心エコーによる術前心機能は平均左室駆出率=65.6%、平均左室拡張末期径=49.0mm、平均左室収縮末期径32.0mm、心室中隔厚=10.1mm、左室後壁厚=9.8mmだった。術前の平均NYHAは1.02で、NYHA度はいなかった。術前の採血検査では総コレステロール182mg/dL、HDLコレステロール40mg/dL、LDLコレステロール112

mg/dL、中性脂肪 163mg/dL であり、HbA1c = 6.4 g/dL、また平均 BNP は 33.8 pg/dL であった。

次に組織における比較検討を行った。同一患者の組織において皮下脂肪を基準とした炎症性サイトカインの発現量を比較検討した。瘤周囲の発現量と皮下脂肪における発現量の比はそれぞれ TNF- α (1.04 倍), IL-18 (1.18 倍), IL-2 (1.13 倍), IL-6 (1.14 倍), IL-17 (0.90 倍)および IL-33 (1.20 倍)とすべての比較において有意差はなかった。アディポネクチンレセプターの発現においては Adipo-R1 の発現は 1.41 倍、Adipo-R2 は 6.14 倍といずれも瘤周囲で高値であった。マクロファージ関連遺伝子の発現では M1 マクロファージ (CD11c) と M2 (CD206) の割合の比較においても皮下と瘤周囲でいずれの検討においてもその発現に有意差は認めなかった (CD11c/CD68: 皮下 vs 瘤周囲 = 0.34 vs 0.31, CD206/CD68: 皮下 vs 瘤周囲 = 0.27 vs 0.26, CD11c/CD206: 皮下 vs 瘤周囲 = 1.27 vs 1.20)。線維化関連因子の発現の検討では bFGF = 1.15 倍, TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3 はそれぞれ 1.19 倍、1.06 倍、0.91 倍といずれにもその発現に有意差は認めなかった。一方で血管新生関連因子のうち VEGF および VEGF-R2 の発現はそれぞれ 0.96 倍、1.22 倍と差を認めなかったが、von Willebrand Factor 遺伝子の発現は 7.90 倍と瘤周囲で有意に高かった。さらにアポトーシス関連因子のうち Caspase3 は 1.07 倍と差を認めなかったが Caspase 9 の発現は 1.39 倍と瘤周囲で有意に上昇した。一方で HIF1 α の発現も 1.16 と有意に上昇しており、血管新生因子はこれらによって誘導された可能性が考えられた。これらの結果から、大動脈瘤周囲では炎症性サイトカインの発現は認めないものの、アポトーシスおよび血管新生が活性化されており、これらは慢性炎症の病態を反映しているものと考えられた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Tsuyuki Y, Matsushita S, Dohi S, Yamamoto T, Tambara k, Inaba H and Amano A: Factors for sac size change of abdominal aortic aneurysm after endovascular repair. Ann Thorac Cardiovasc Surg. 20(6):1016-20, 2014 (査読あり)
2. Ohishi A, Matsushita S, Dohi S, Yamamoto T, Inaba H, Kuwaki K, Kuroda K and Amano A. Endovascular repair for abdominal aortic aneurysm reduces postoperative serum endotoxin level compared with open abdominal surgery. World Journal of Cardiovascular Surgery. 4(6):87-94, 2014 (査読あり)
3. 桑木賢次、松下訓、佐藤充、天野篤 . 脂肪細胞から放出される炎症性サイトカインの性差 . 順天堂大学ハイテク・リサーチ・センター環境医学研究所紀要. 32, 2014 (査読なし)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

桑木 賢次 (KUWAKI, Kenji)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号 : 90398313

(2)研究分担者

松下 訓 (MATSUSHITA, Satoshi)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号 : 20407315

(3)連携研究者

天野 篤 (AMANO, Atsushi)
順天堂大学・医学部・教授
研究者番号 : 70338440

稲葉 博隆 (INABA, Hiroataka)
順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：10511454

山本 平 (YAMAMOTO, Taira)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：70401504