

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670177

研究課題名(和文)病的血管リモデリングの発症機転と質的変換機構の解明に対する挑戦的病態解析の試み

研究課題名(英文) Studies on pathogenesis of failure of vascular integrity and fate in pathological vascular remodeling.

研究代表者

中川 和憲 (Nakagawa, Kazunori)

九州大学・医学研究院・講師

研究者番号：50217668

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：病的血管リモデリング発症進展の病理について、動脈硬化の早期病変は、定説とされてきたマクロファージの壊死や平滑筋細胞(SMC)の増生ではなく、SMCの分散であることが示唆された。また進展の転帰については、内膜内の非酵素化学的産物(D-アミノ酸、AGE)の生成蓄積が、血管の正常性を失わせるエラーとして、細胞外基質の瓦解や石灰化に関連し、血管の病的リモデリングの機転としてその後の病変進展の鍵となる事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Early stages of atherosclerosis develop not by SMC migration and proliferation, but by dispersion of intimal SMCs, that were caused by the macrophage infiltration and the lipid pool formation without undergoing significant proliferation or death. Formation of non-enzymatic chemical products (D-aspartic acid or Advanced glycation end products(AGEs)) in intima would associate with matrix degradation or calcification. As results, accumulation of these errors in vascular wall pull the trigger of pathogenesis, and affects the advanced fate of atherosclerosis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：病理学 循環器 動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

現在の動脈硬化の病因論としては、動物モデルによる検証から、(1)血管平滑筋細胞(SMC)の増殖遊走、(2)マクロファージ(M)泡沫細胞の死に由来する脂質の蓄積が定説となっている。しかしながら、動物モデルとヒトの動脈には決定的に異なる特徴(i)ヒトでは動脈硬化の発症前に、すでに生理的なびまん性内膜肥厚(DIT)が形成されている。(ii)内膜への脂質の蓄積はMの浸潤に先行している)が存在する。現在こうした定説との矛盾については科学的な説明がついていない。このようなヒトの病態の理解不足(あるいは動物モデルの病態との混同)は、病的血管を基盤とするヒト疾患の治療予防戦略の障害になっている。

また、血管病理については、細胞生物学的な視点から様々に議論されてきたが、これ以外の要因、たとえば物性変化による病態形成への関与を検討した研究は皆無である。一方で近年、常識では生体内に存在しないはずのDアミノ酸が、生体にも存在していることが示唆され始めた。Lアミノ酸からのキラル変換によるDアミノ酸の蓄積は、タンパクの構造異型を招来し、当該蛋白の機能破綻うる可能性がある事から、これらと病態との関りを解析することは合理的かつ急務である。しかしながら希少なアミノ酸光学異性体や糖化修飾といった非酵素的化学的に生成する物質の病理病態への影響についての解析はほとんどなされていない。

従って、病態の理解と治療戦略構築には、血管の病的リモデリングに化学修飾産物の蓄積といった質的エラーの蓄積が病態形成、あるいはその転帰にどのように関わるのか解明することが喫緊の課題となっている。

2. 研究の目的

血管の恒常性の破綻は、病的血管リモデリングの端緒となり、循環器関連疾患への発症や進展の機転となる。しかしながら、背景に記載のように、ヒトに対する病理知見の蓄積、あるいは非細胞的反応産物による物性変化による血管の正常性への影響に関する解析は不十分である。ゆえに本研究では、新たな視点からの「ヒト」の病的血管の病理学的描出や考証による病態解析を行い、「血管の傷害機転」と「病理像の質的変換」といった病態構築への要因や転換機転の解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1)アテローム動脈硬化血管の発生初期病態、前粥腫病変の成り立ちに注目し、若年者

(15歳から49歳まで:43例)の剖検症例の右冠状動脈の凍結切片を用いて、免疫組織化学的な蛋白発現と動脈硬化の進展との関連について、以下の病理形態学的な検討をおこなった。

初期病変内膜におけるSMCおよびMの密度動態について細胞の増殖および細胞死関連マーカー(アポトーシス、オートファジー)の検出による細胞の生死動態を検討した。

内膜内沈着脂質、およびその共存物質の局在検証による脂質起源の検討を行った。

(2)アテローム動脈硬化血管の進展と転帰について、剖検症例(53歳から95歳:46例)の冠状動脈を用いて、Dアミノ酸、最終糖化修飾産物(AGEs)の進展病変に存在状況を、免疫組織化学的に検討した。

(3)病的血管の描出について、神戸日赤病院・Spring-8にて造影解析された解離標本について組織病理学的検討解釈および近似染色について検討した。

4. 研究成果

(1)アテローム動脈硬化の発生病理

早期病変において、SMCの密度低下は、内腔側は主にMの浸潤、深部領域は、脂質プールの形成によるものと判明した(図1、図2)。

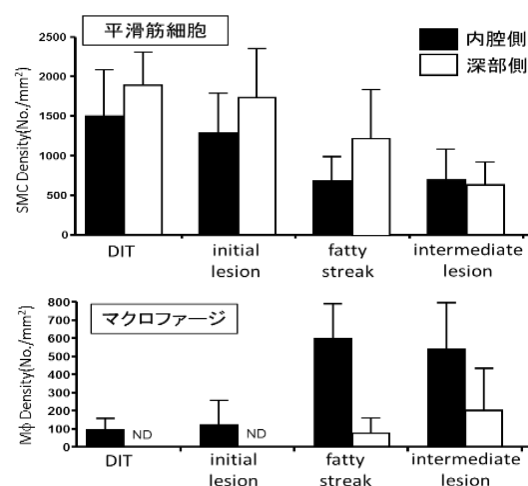


図1. 正常および動脈硬化早期病変における平滑筋およびマクロファージの密度。前粥腫病変では内腔・深部側とも平滑筋の密度著明に低下する。内腔における密度低下は、マクロファージの浸潤によるが、深部側には浸潤の波及が遅れていることから脂質の浸み込みによるプール形成の影響が示唆される。

ごくわずかに認められる細胞増殖指標 MIB-1 は全て M であり、SMC はすべて陰性であった。一方、BAX、LC3B は、いずれも病変グレードによる有意差は無く、SMC では陽性細胞はわずかであり、M で、3 割程度が BAX 陽性であるものの、TUNEL 検出を認めなかったことから必ずしも細胞死に結びついておらず、少なくとも動脈硬化の初期段階では、細胞死はほとんど起きていないことが判明した(表1)。このことから、硬化内膜の SMC 密度の低下は、積極的な増減平衡でなく、既存 SMC の肥厚病巣での静的分散に依ることが示唆された。

表1 正常および動脈硬化初期病変における細胞死関連マーカーの検出率

	細胞	DIT	IL	FS	IM
BAX	SMC	0.04%	0.03%	0.40%	0.17%
	Mφ	31.71%	35.29%	25.34%	28.21%
LC3B	SMC	1.73%	1.05%	0.95%	4.17%
	Mφ	1.43%	-	-	2.13%
TUNEL	SMC	-	-	-	-
	Mφ	-	-	-	-

-; Not Detected

内膜の脂質沈着は、EVG、MT 染色、脂質染色、プロテオグリカン、血漿タンパクの免疫染色(図2)から、1)脂質プール内での弾性線維が存在すること、2)沈着脂質は血漿タンパクとの同在様式が一致することから、血漿脂質に由来し、脂質の内膜内滞留や脂質プールを形成にはプロテオグリカンがその一端を担うことで、SMC の分散が起こり、密度の低下に寄与することが示唆され、動物では定説となっている M の壊死等による細胞溶解成分や膜リン脂質ではないことが示唆された。

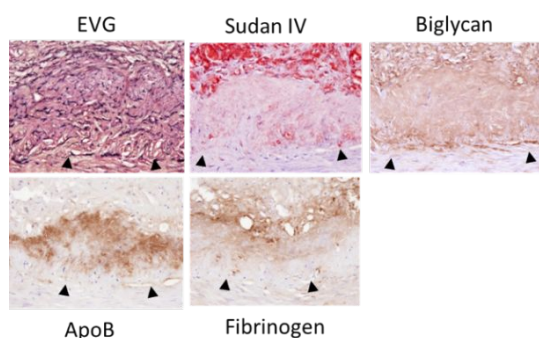


図2 . 前粥腫病変深部の脂質プールの組織像。沈着した脂質(Sudan IV 染色)は、アポBやフィブリノーゲンと共在が認められることより、血漿からの浸み込みが示唆される。組織の壊死は認められない(EVG 染色)ほか、Biglycan との共在から、脂質沈着にはプロテオグリカンの寄与が示唆された。

(2) 動脈硬化進展病変の病理

D アスパラギン酸(D-Asp)は、初期病変段階の内膜硬化巣は総じて陰性であり、前粥腫病変(AHA III 型に該当)症例で 12.5%、粥腫病変の脂質プール主体病変症例で 66.7%(石灰化なし 60.0%、石灰化有 77.8%)、壊死巣を有する症例では 81.8%(石灰化なし 81.3%、石灰化有 82.4%)に、内膜内の存在を確認した。また D-Asp は、(i)硬化内膜の脂質プール内の細胞外基質や脂質プール外では病巣底部に斑状に陽性であること、さらに、(ii) D-Asp は、基本的には石灰化領域とは独立した領域にある陽性であり、(iii)壊死巣含有病変ではその周囲により顕著に陽性を認めた。以上より、D-Asp は、石灰化ではなく、前粥腫病変からアテロームへの進展と相関しており、細胞外基質タンパクの構造異型などを招来することで、内膜内の微小環境の変性をもたらす、脂質の沈着の促進あるいは壊死巣形成といった病態の変遷・転帰に影響している可能性が示唆された。キラルアミノ酸の病理解析研究を萌芽させる意義が示唆された。

一方 AGEs は、非架橋型・架橋型ともに進行病変の石灰化部分に一致して認め(図3)、硬化内膜での糖化修飾産物の蓄積は、病変の石灰化という動脈硬化の終末像への運命付けに関わることが示唆された。ただし、石灰化の微小病変部での一部不一致も存在しており、糖化修飾が石灰化沈着に先立って起こる「発症要因」なのか、進展を亢進させる「促進要因」なのかについての結論には至っていない。

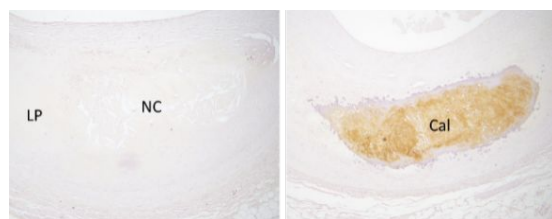


図3 粥腫(進行病変)における AGEs(CML)の免疫組織像。石灰化領域(Cal)一致して局在。脂質プール(LP)や壊死巣(NC)は陰性。

なお、今回の研究で検討した D-Asp および AGEs は、いずれもその染色様式は、半減期の長いとされる膠原線維と類似しており、長年にわたる化学修飾の蓄積、またそれによる内膜基質の物性の変質が、脂質滞留やプールの増大、あるいは内膜の石灰化といった進展病変の転帰の決定要因となっている可能性が示唆された。ただし、こうしたラセミ変換の

機序や分子情報の正確な同定（フリーの分子として存在するのか、基質タンパク内包型の修飾・変換体として存在するのか、あるいは血漿由来物質の滞留沈着によるものかなど）について明らかにすべき課題も残っている。

（3）血管病変の非破壊的描出解析像が、膠原線維、弾性線維を総括した EVG・MT 染色が近似しており、病理組織的理解と相関することが明らかになった。

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 2 件）

中島 豊、中川和憲、急性大動脈解離の病理 カレントセラピー、査読無、Vol.34、No.9、2016、pp855-859.

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、査読有、Vol.63、No.10、2015、pp590-592、DOI: 10.1007/s11748-015-0565-4.

〔学会発表〕（計 5 件）

築部卓郎、八木直人、星野真人、中島 豊、中川 和憲、原口知則、岡田泰司、中井史、大北 裕。大動脈解離の発生機序に関する研究 - 位相差 X 線 CT 法および超音波検査法による大動脈壁微細構造の検討 - 第 69 回日本胸部外科学会定期学術集会。(2016 年 9 月 28 日、岡山)

Nakagawa K, Fujii H, Nakashima Y: Pathogenesis of early and intermediate lesions of human coronary atherosclerosis: Accumulation of Plasma-derived Lipids and dispersion of smooth muscle cells. The 11th International Congress on Coronary Artery Disease. (2015 年 11 月 30 日、Florence)

Tsukube T, Yagi N, Hoshino M, Nakashima Y, Nakagawa K, Okada Y, Haraguchi T, Yoshida M, Mukohara N, Kozawa S, Ogawa K, Okita Y: Impact of synchrotron radiation based phase-contrast X-ray CT findings on understanding onset of acute aortic dissection. American Association for Thoracic Surgery, Aortic Symposium Workshop 2015.

(2015 年 10 月 16 日、Kobe)

中川 和憲、中島豊。ヒトの冠状動脈硬化における前粥腫病変 (preatheroma, intermediate lesion) の発生病理 - 内膜の脂質沈着と内膜平滑筋細胞の分散 -, 第 21 回 九州血液血管研究会。(2014 年 11 月 08 日、福岡)

Nakagawa K, Fujii H, Nakashima Y: Pathogenesis of intermediate lesion of human coronary atherosclerosis: Lipid pool formation without necrosis and dispersion of intimal smooth muscle cells, the 82nd Annual Congress of The European Atherosclerosis Society. (2014 年 06 月 02 日、Madrid)

〔図書〕（計 1 件）

中島豊、中川和憲、急性大動脈解離の病理、pp15-20、中外医学社、大動脈解離 診断と治療の Standard、2016。192 ISBN978-4-498-03912-4

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 和憲 (NAKAGAWA KAZUNORI)
九州大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号：50217668

(2) 研究分担者

鬼丸 満穂 (ONIMARU MITSUHO)
九州大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号：00380626

(3) 連携研究者

居石 克夫 (SUEISHI KATSUO)
国立病院機構福岡東医療センター・研究教育部長
研究者番号：70108710