

大動脈解離における血管平滑筋細胞の
分子病理学的特性の検討（要約）

日本大学大学院医学研究科博士課程

外科系循環器外科学専攻

原田 篤

修了年 2020 年

指導教員 田中 正史

要約

【背景】

大動脈解離は、いずれも大動脈壁の脆弱性が関与しており、突然死の原因となる致死率の高い疾患群である。マルファン症候群などの一部の結合組織病を除き、これらの病態形成のメカニズムは不明な点が多い。大動脈解離にみられる組織学的所見として嚢状中膜壊死があり[1]、本所見は大動脈の脆弱性と関連していると考えられている。嚢状中膜壊死の形成機序は未だ不明な点が多く、加齢により増加し、高血圧患者の大動脈に高率にみられるといわれている。解剖学的には上行大動脈に最もよく認められ、大動脈弓部以降では減少傾向となる。組織学的には大動脈中膜の中央部によく見られ、栄養血管からの血流の終末部に一致している。この様々な嚢状中膜壊死の形態学的変化は、中膜における虚血、低酸素などの細胞ストレスを表現しているとの説もある。弾性線維染色法であるエラスチカ・ワンギーソン染色では弾性線維の間隙が離開し、同部位にプロテオグリカンの沈着が認められる[2]。一般的に解離の entry 近傍で組織学的な変化が強い場合が多い[3, 4]。

血管平滑筋細胞は、血管の重要な構造的および機能的成分である。血管平滑筋細胞は機能的な可塑性を示し、「高分化/収縮型」または「脱分化/合成型」と言われる異なる表現型が存在するとされている[5]。「脱分化/合成型」血管平滑筋細胞は胚形成、血管新生において重要である[6]。一方で収縮性の高い「高分化/収縮型」血管平滑筋細胞は血管緊張、管腔の直径、血圧の調節を制御するために成人の血管系の恒常性の維持に重要な役割を担っている[7]。「高分化/収縮型」血管平滑筋細胞において使用される一般的なマーカー蛋白に smoothelin、SM-MHC (smooth muscle myosin heavy chain)、h1-calponin、SM22 α (22-kDa smooth muscle protein)、desmin、h-caldesmon、metavinculin、terokin などがある。対して NM-MHC-B (non muscle myosin heavy chain isoform B)、SMemb (embryonic smooth muscle myosin heavy chain)、CRBP-1 (cellular retinol-binding protein-1)、S100A4 などは、「脱分化/合成型」血管平滑筋細胞のマーカーとして

知られている。これらの平滑筋細胞マーカー蛋白の発現パターンから「高分化/収縮型」平滑筋細胞と「脱分化/合成型」平滑筋細胞を区別することができる[8]。一般的に加齢や動脈硬化の進展に伴って、「高分化/収縮型」血管平滑筋細胞は減少し、「脱分化/合成型」血管平滑筋細胞が増加すると考えられている。

【目的】

本研究は手術及び病理解剖症例から得られた大動脈壁組織を用いて、大動脈解離を来した大動脈壁を構成している血管平滑筋細胞のフェノタイプや発現分子を検討し、その病態解明や新規治療の開発を目的とする。

【方法】

日本大学医学部附属板橋病院にて急性大動脈解離に対して施行された緊急・準緊急手術症例（以下、解離群とする）から得られた組織検体を病理学的に検討した。対照は、日本大学医学部附属板橋病院病理診断科、病理部で行われた非大動脈疾患の剖検症例（以下、対照群とする）とした。

大動脈解離緊急手術中に切除された解離近傍の大動脈組織（n=35）、対照として病理解剖で得られた大動脈（n=19）を以下に用いた。

1. 組織切片用のホルマリン固定検体

ホルマリン固定検体より、大動脈の病理組織切片を作成し、大動脈の α -SMA (α -smooth muscle actin)、smoothelin、SM-MHCの免疫組織化学を施し、中膜における目的分子の分布を検討した。画像解析ソフト Image J を用い、100倍1視野における陽性面積を検討した。また解析する視野は1標本中で最も陽性細胞の発現が高いと思われる3視野を選んだ。それぞれの切片の α -SMA陽性面積に対するsmoothelin、SM-MHCの陽性面積の占める割合を定量化した。これらの解析結果を患者背景や手術所見を含めた臨床情報と比較、検討した。

2. 蛋白抽出用の凍結保存検体

組織の一部を凍結保存とし、蛋白抽出を行って、Gelatin zymography で、pro MMP (matrix metalloproteinase)-9、pro MMP-2、MMP-2 の酵素活性を測定した。

【結果】

解離群では対照群と比較し、嚢状中膜壊死を伴った弾性線維の破壊や断裂がみられた。さらに免疫組織化学から算出した α -SMA 陽性面積に対する smoothelin、SM-MHC の陽性面積の比率を比較した。対照群においては、上行大動脈、弓部大動脈、上行大動脈と弓部大動脈の平均の3つで算出した。smoothelin は解離群では対照群の上行大動脈、上行大動脈と弓部大動脈の平均と比較して、いずれも有意に陽性面積率が高かった。また SM-MHC においても解離群では対照群のいずれと比較しても、SM-MHC の陽性面積率が有意に高かった。また外膜側、中間、内膜側に3分割してそれぞれの陽性面積率を算出した結果、smoothelin、SM-MHC は中膜の中でも外膜側により多く分布していることが示された。解離群は対照群と比較して分化の高い収縮型血管平滑筋細胞が中膜に分布していると考えられた。

対照群における高分化平滑筋細胞のマーカー蛋白である smoothelin、SM-MHC の陽性面積率と患者背景を比較したところ、各項目で統計学的有意差は認められなかった。また年齢との相関を検討したところ、SM-MHC において加齢に伴ってこれらのマーカー蛋白の陽性面積率が低下する強い負の相関関係が示された。

解離群における smoothelin、SM-MHC の陽性面積率と患者背景の比較をしたところ、smoothelin で有意差が認められた項目は無かったが、SM-MHC は、偽腔開存型で有意差をもって高発現していた。

また対照群と比較し、解離群において pro MMP-2、MMP-2 は有意に高い活性が認められたが、pro MMP-9 において統計学的有意差は認められなかった。

【結論】

本研究では免疫組織化学を用いて大動脈解離における、血管平滑筋細胞の分化マーカーの発現を検討した。解離群には Stanford A 型の大動脈解離症例のみの検討とした。Stanford B 型の大動脈解離は手術となる症例が少なく、一般的に保存的加療を第一選択とし、また手術となる症例でもステント-グラフト内挿術が近年増加傾向であり、検体が得られないこと、また手術が行われる大半の症例が慢性期であり、Stanford A 型の急性大動脈解離と病理学的特性が大きく異なることが予想され、本研究の対象には加えなかった。

解離群は、対照群と比較して有意に高分化平滑筋マーカー蛋白である smoothelin、SM-MHC の陽性面積率が高いことが示された。これは大動脈解離において「脱分化/合成型」の血管平滑筋細胞の分布が増えるという既知の報告[9]と全く異なる。対照群の検討で明らかになるように、血管平滑筋細胞はある一定の年齢を過ぎると加齢に伴って「高分化/収縮型」の割合が減少し、「脱分化/合成型」が増加する傾向がみられる[10][11]。しかし本研究において、解離群、対照群で、年齢の平均はともに 70 歳前半であり、むしろ解離群で若干高めであるにも関わらず、解離群で有意に中膜における「高分化/収縮型」血管平滑筋細胞の割合が高いことが初めて示された。既知の報告と本研究の大きな相違点は対照群の背景であり、既知の報告は大動脈弁置換術や冠動脈バイパス術を施行された患者の正常な上行大動脈壁を用い、本研究では非大動脈疾患の剖検症例の上行大動脈、弓部大動脈を用いた。大動脈弁置換術や冠動脈バイパス術を施行される心疾患では、背景に動脈硬化を来していることが多く、検体として採取した上行大動脈が動脈硬化様の変化を来していた可能性も考えられる。本研究の対照群の死因は様々であり、より人口全体の母集団を反映していると考えられる。また本研究で「高分化/収縮型」血管平滑筋細胞のマーカーとして用いた smoothelin、SM-MHC の 2 つのどちらも並行して高発現していることを鑑みるに、染色の方法・技術の違いによって既知の報告と本研究の相違が生じたとは考えづらい。さらに本研究の対照群において有意差をもって悪性腫瘍の患者が多

いが、悪性腫瘍患者は栄養状態不良であることがほとんどであり、本研究における悪性腫瘍患者の動脈壁は動脈硬化をほとんどきたしていなかった。動脈硬化においては中膜における「高分化/収縮型」血管平滑筋細胞の分布の割合が低く、「脱分化/合成型」が増加する傾向がみられる[12]。本研究の対照群の方が、既知の報告の対照群に比べ、検体として用いた血管壁が動脈硬化を来していた割合が低く、「高分化/収縮型」血管平滑筋細胞の分布の割合がより多いだろうと予想される中、解離群において「高分化/収縮型」血管平滑筋細胞が、有意差をもって高発現していた。悪性腫瘍が大動脈の血管平滑筋に与える影響を示した先行研究は無く、この点は今後さらなる検討が必要であるが、このことは本研究の結果の妥当性を支持するのではないかと考える。これまで動脈硬化などの血管病変では加齢による変化と同様、「高分化/収縮型」血管平滑筋細胞から「脱分化/合成型」血管平滑筋細胞へ分布が傾くと考えられてきた。また高齢者において一度脱分化した血管平滑筋細胞は、生体内では容易に高分化な平滑筋細胞へ形質転換は起こらないであろうと考えられてきた。この様なこれまでの考え方と相反し、高齢者においても大動脈解離という病態においては脱分化した血管平滑筋細胞が、高分化で収縮型の血管平滑筋細胞への形質転換が起こっているということを初めて示した。解離群での比較で、偽腔開存型であることが「高分化/収縮型」血管平滑筋細胞マーカーの発現を増強する因子であり、解離によって生じた大動脈壁にかかるストレスが大きければ大きいほど「高分化/収縮型」血管平滑筋細胞に形質転換が起こる可能性が示唆された。つまりこれらの形質転換は解離によって生じた血管壁に対するストレスの代償性の反応である可能性がある。既知の報告では、大動脈解離において「脱分化/合成型」血管平滑筋細胞の分布が増加する原因として、解離した血管壁において活発にリモデリングが行われているためだと考察している。本研究では、**pro MMP-2**、**MMP-2** の高発現が認められ、嚢状中膜壊死、弾性線維の離開や断裂、伸展がみられ、血管壁は生化学的にも形態学的にも脆弱性を示しているにも関わらず、中膜平滑筋細胞における **smoothelin**、**SM-MHC** の高発現が認められた。本研究では結果は逆であるものの、血管壁にかかる一部のスト

レスが、血管壁におけるリモデリングを活発にし、血管平滑筋細胞は「高分化/収縮型」に傾くと考える。本研究では「脱分化/合成型」血管平滑筋細胞のマーカー蛋白の検討を行えておらず、全体の血管平滑筋細胞から「高分化/収縮型」血管平滑筋細胞を除いたものと推定しているに留まっているため、「脱分化/合成型」血管平滑筋細胞のマーカー蛋白の免疫組織科学等の検討も追加すべきと考える。また解離群における検体採取においてできるだけ entry 近傍で全層を採取するようにしたが、entry から遠くなってしまうものや、解離しているものの程度が低いものも含まれており、そのことが結果に制限をきたした可能性を否定できない。今後解離群、対照群ともに検体数を増やし、western blot や細胞培養、凍結組織切片を用いた microdissection [13]等を追加し、大動脈解離における血管平滑筋細胞の分子病理学的特性について引き続き検討する必要がある。

参考文献

1. Nakashima, Y., *Pathogenesis of aortic dissection: elastic fiber abnormalities and aortic medial weakness*. *Ann Vasc Dis*, 2010. **3**(1): p. 28-36.
2. Wang, X., et al., *Increased collagen deposition and elevated expression of connective tissue growth factor in human thoracic aortic dissection*. *Circulation*, 2006. **114**(1 Suppl): p. I200-5.
3. 景山則正., et al., *大動脈の弾性板と架橋弾性線維の病理組織学的検討 : 大動脈解離例における病因との関連について*. *脈管学*, 2005. **45**(12): p. 1003-1009.
4. 坂田則行., et al., *動脈硬化と細胞外マトリックス —コラーゲンの役割を中心に—*. *ConnectiveTissue*, 194. **26**: p. 215-20.
5. Rensen, S.S., P.A. Doevendans, and G.J. van Eys, *Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity*. *Neth Heart J*, 2007. **15**(3): p. 100-8.
6. Iyemere, V.P., et al., *Vascular smooth muscle cell phenotypic plasticity and the regulation of vascular calcification*. *J Intern Med*, 2006. **260**(3): p. 192-210.
7. Xu, H., et al., *VSMC-specific EP4 deletion exacerbates angiotensin II-induced aortic dissection by increasing vascular inflammation and blood pressure*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019. **116**(17): p. 8457-8462.
8. Timraz, S.B.H., et al., *In-depth evaluation of commercially available human vascular smooth muscle cells phenotype: Implications for vascular tissue engineering*. *Exp Cell Res*, 2016. **343**(2): p. 168-176.
9. Wang, L., et al., *Association of smooth muscle cell phenotypes with extracellular matrix disorders in thoracic aortic dissection*. *J Vasc Surg*, 2012. **56**(6): p. 1698-709, 1709 e1.
10. van der Loop, F.T., et al., *Differentiation of smooth muscle cells in human blood vessels as defined by smoothelin, a novel marker for the contractile phenotype*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997. **17**(4): p. 665-71.
11. Lakatta, E.G., et al., *Human aging: changes in structure and function*. *J Am Coll Cardiol*, 1987. **10**(2 Suppl A): p. 42a-47a.

12. van der Loop, F.T., et al., *Smoothelin, a novel cytoskeletal protein specific for smooth muscle cells*. J Cell Biol, 1996. **134**(2): p. 401-11.
13. Fischer, A.H., et al., *Cryosectioning tissues*. CSH Protoc, 2008. **2008**: p. pdb.prot4991.