

大動脈解離における中膜変性の
分子病理学的検討
(要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程
病理系形態病理学専攻

傳田 侑也

修了年 2024 年

指導教員 羽尾 裕之

背景と目的:

大動脈解離 (Aortic dissection: AD) は、大動脈壁が中膜のレベルで 2 層に剥離し、大動脈の走行に沿ってある長さを持ち 2 腔になった状態と定義され、大動脈壁内に血流、または血腫が存在する動的な病態である^[1,2]。剥離の長さについては 1cm 以上あるものとしている論文もあるが^[3]、明確な定義はない。上行大動脈に解離が及ぶ Stanford A 型解離はきわめて予後不良の疾患で、発症後に致死率が 1 時間あたり 1-2% 上昇すると報告されており^[4]、外科手術などの侵襲的治療を行わなければ 48 時間以内の致死率が約 50% とされる。発症率は人種差や性別差があるが、10 万人年あたり 2.9-9.1 人と推定されている^[5-7]。AD の機序は Marfan 症候群などの一部の遺伝性結合組織病を除いて不明であるが、高血圧歴との関連や、中膜の血管平滑筋細胞 (vascular smooth muscle cells: VSMCs) と、細胞外マトリックス (extracellular matrix: ECM) などの周辺蛋白との相互作用による中膜変性が関与していると考えられている^[8]。VSMCs は成熟した血管壁においては高分化/収縮型の表現型をとるが、血管損傷や動脈硬化などといった修飾が加わると、脱分化/合成型へ表現型が変化し、遊走能や増殖能が上昇する^[9]。AD をきたした中膜においては、脱分化/合成型への変化が促進されており、これは血管のリモデリングを加速する因子と考えられ、AD 発症の一因とする報告もある^[10]。すなわち、血管壁は加えられた負荷に応じて組織学的な変化がおこるが、ECM の分解や合成といった受動的反応に対して、VSMCs では能動的反応

によって、細胞の表現型を変化させて収縮機構を調整する^[9]。2つの表現型は光学顕微鏡レベルでは形態学的に見分けることは困難であるが、高分化型 VSMCs では smooth muscle-myosin heavy chain (SM-MHC) と smoothelin が高発現していることが指摘されている^[11]。一方で、脱分化型 VSMCs のマーカー蛋白に関しては確認が困難なことも多いが^[12]、アテローム動脈性動脈硬化症などの変化をきたした血管壁の VSMCs では S100A4 の発現が上昇しており^[13]、S100A4 を脱分化型マーカー蛋白として用いた論文が報告されている^[14]。表現型の変化以外に、VSMCs の機能・構造を維持する上で重要な蛋白として filamin A が挙げられる。これは C 末端ドメインで自己会合した V 字型二量体を形成してアクチンフィラメントを架橋し、細胞の増殖や移動、生存を調節するとされる^[15]。Marfan 症候群患者の拡張した上行大動脈壁の中膜において filamin A が断片化しており、中膜変性との関連が示唆されている^[16]。AD の動物モデルを用いた研究も進められているが、発症の詳細な機序を同定するには至っていない。本研究の目的は、手術で採取されたヒトの AD 患者の大動脈壁と、AD モデル動物を用いて、AD 発症における中膜変性の機序を明らかにすることである。

対象と方法:

2018 年 1 月から 2021 年 12 月までに日本大学医学部附属板橋病院において、遺伝性結合組織病の指摘のない患者の急性上行 AD に対して施行された手術において、摘出された上行大動脈壁の一部を採取した (AD 群)。非 AD 患者の検体として、同期間、

同病院の剖検症例のうち、大動脈疾患のない症例の上行大動脈壁を採取した (non-AD 群)。本研究は日本大学板橋病院の倫理審査委員会で審査・承認された(RK-221011-2)。採取した動脈壁の一部を 10%中性緩衝ホルマリン固定して病理切片を作製して特殊染色、免疫染色を行い評価した。動脈壁の一部は-80°Cで凍結保存し、蛋白と mRNA を抽出し、それぞれ western blotting、zymography、reverse transcription - quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) を行って、VSMCs の表現型マーカー、エラスチン、filamin A の発現分布について検討した。

動物モデルとして、Sprague-Dawley (SD) ラットを用いた。BAPN を 3 週齢より飲料水に 0.08%の濃度で溶解して 7 週間投与した(BAPN 群)。また、同様のプロトコールで BAPN 投与中に 9 週齢から Angiotensin II (Ang II)を 1mg/kg/day の速度で 1 週間皮下に持続投与した (BAPN+Ang II群)。コントロール群 (CTRL 群)では薬剤投与は行わなかった。それぞれ 10 週齢で安楽死処置を行い、大動脈を採材した。大動脈は ex-vivo で光干渉断層撮影装置(optical coherence tomography: OCT)を用いて観察を行った後、ヒト検体と同様に一部は 10%中性緩衝ホルマリン固定後に免疫組織化学的に評価し、一部は-80°Cで凍結保存後、蛋白と mRNA を抽出して、western blotting と RT-qPCR で評価した。本動物実験は、日本大学動物実験委員会の審査・承認を得た (承認番号：AP21-M038)。

結果：

VSMCs の表現型について、AD 群の中膜では高分化 VSMCs のマーカー蛋白 (smooth muscle myosin heavy chain: SM-MHC, smoothelin) の発現が低下していた。一方で、脱分化 VSMCs マーカー蛋白 (S100A4) の発現は増加していた。また AD 群において、中膜の弾性線維の主要成分である elastin は減少し、MMP-2 の活性は増強していた。これら高分化 VSMC マーカー蛋白と elastin の分布に正の相関関係があることが示された。

filamin A に関して、免疫組織化学では、AD 群の中膜で弾性線維の断裂をきたしている中膜変性の強い部位に一致して、filamin A の強陽性像がみられた。また、western blotting では non-AD 群と比較し、AD 群において full-length の filamin A の発現が低下し、断片化した filamin A の割合が増加していた。一方で、full-length filamin A の mRNA の発現は AD 群で有意に増加している傾向があった。

AD ラットモデルに関して、BAPN+Ang II 群では 7 頭全てで中膜の深層の外膜に近い部位で急性解離が認められ、うち 4 頭は 10 週齢前に死亡した。6 頭は上行大動脈に entry をもつ AD であり、3 頭は 2 カ所の離れた位置に解離病変がみられた。BAPN 群では AD を発症したのは 11 頭中 1 頭のみであったが、OCT で大動脈全長に渡る中膜の肥厚が観察され、CTRL 群と比較して有意差を示した (0.35 ± 0.06 vs 0.23 ± 0.03 mm, $p=0.00905$)。病理学的評価では、BAPN 投与を行った 2 群では弾性線維の離開と断裂がみられ、膠原線維が増加し、ムコイド物質のプール状の沈着がみられた。ま

た、AD をきたした症例の entry 近傍においては SM-MCH と filamin A の染色の低下がみられ、それぞれの蛋白発現に対応する mRNA の発現は有意に低下していた。

考察：

AD 発症に関して、その背景にある中膜変性には複数の要素の変化が指摘されているが^[17]、これらはお互いに影響し合っていることが考えられる。AD 患者の中膜において、エラスチンと高分化型 VSMCs の分布には正の相関関係があることを示したが、ラットモデルにおいて、ECM の架橋を阻害する BAPN の内服により、高分化型 VSMCs の発現が mRNA レベルで低下していたことから、エラスチンを含む ECM の分解が VSMCs の脱分化を誘導する可能性も示唆される。つまり、これまでの研究で広く知られているように高血圧や血管障害などの直接的な因子で VSMCs が脱分化型に形質転換することに加え、MMPs などの酵素の活性化により誘導されたエラスチンの分解が VSMCs の脱分化を促進することで、中膜変性が進行する可能性がある。

filamin A の断片化について、Marfan 症候群患者の拡張した大動脈の中膜において指摘されていたが^[16]、今回の結果から、遺伝性結合組織病の背景のない AD 患者の大動脈壁中膜においても、filamin A の断片化が中膜変性へ関与していると考えられる。新生児の呼吸不全^[18]や僧帽弁逸脱症^[19]に関しては *FLNA* 遺伝子変異との関連が指摘されているが、*FLNA* がコードする蛋白質が AD においても重要な役割を果たしている可能性がある。また、肺高血圧症においては血管のリモデリングに関与している、という報

告^[20]もあり、今後、filamin A に関する更なる分子病理学的な検討が望まれる。

AD のラットモデルに関して、再現性の高さから本モデルは有用であると考ええる。また、既知のラットモデルにおいては副作用の報告が多く^[21]、この点でも本モデルは優れている。多くのラットで上行大動脈に及ぶ大動脈解離が OCT によって観察されたことから、本モデルは致死率の高い Stanford A 型の AD のモデルとして、今後発症機序や新規治療の発見に寄与することが期待される。AD の機序には複数の素因が複雑に影響し合っていることが予想され、また血行力学的な影響を考えるためにも、動物モデルを用いた更なる研究が重要であると考ええる。

結論：

本研究は、遺伝性結合組織病の背景のない AD 患者の大動脈壁中膜において、VSMCs の表現型の変化とエラスチンの間には量的な相関関係がある点、filamin A の断片化を指摘した点、大動脈解離モデルラットにおいてヒトの大動脈解離に似た分子病理学的変化を指摘し、OCT を用いた画像で解離病変を評価した点で新規性がある。今後さらに大動脈壁中膜の変性の機序を追求することで、大動脈解離の新しい治療戦略、新規バイオマーカーの同定につながると考える。

引用文献

1. Nienaber, C.A. and K.A. Eagle, *Aortic dissection: new frontiers in diagnosis and management: Part I: from etiology to diagnostic strategies*. Circulation, 2003. **108**(5): p. 628-35.
2. Erbel, R., et al., *Diagnosis and management of aortic dissection*. Eur Heart J, 2001. **22**(18): p. 1642-81.
3. Hirst, A.E., Jr., V.J. Johns, Jr., and S.W. Kime, Jr., *Dissecting aneurysm of the aorta: a review of 505 cases*. Medicine (Baltimore), 1958. **37**(3): p. 217-79.
4. Hagan, P.G., et al., *The International Registry of Acute Aortic Dissection (IRAD): new insights into an old disease*. JAMA, 2000. **283**(7): p. 897-903.
5. Bossone, E. and K.A. Eagle, *Epidemiology and management of aortic disease: aortic aneurysms and acute aortic syndromes*. Nat Rev Cardiol, 2021. **18**(5): p. 331-348.
6. Howard, D.P., et al., *Population-based study of incidence and outcome of acute aortic dissection and premorbid risk factor control: 10-year results from the Oxford Vascular Study*. Circulation, 2013. **127**(20): p. 2031-7.
7. Acosta, S. and A. Gottsater, *Stable population-based incidence of acute type A and B aortic dissection*. Scand Cardiovasc J, 2019. **53**(5): p. 274-279.
8. Larson, E.W. and W.D. Edwards, *Risk factors for aortic dissection: a necropsy study of 161 cases*. Am J Cardiol, 1984. **53**(6): p. 849-55.
9. Zhou, B., et al., *Contractile Smooth Muscle and Active Stress Generation in Porcine Common Carotids*. J Biomech Eng, 2018. **140**(1): p. 0145011-6.
10. 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.
11. 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.
12. Hao, H., G. Gabbiani, and M.L. Bochaton-Piallat, *Arterial smooth muscle cell heterogeneity: implications for atherosclerosis and restenosis development*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(9): p. 1510-20.
13. Brisset, A.C., et al., *Intimal smooth muscle cells of porcine and human coronary artery express S100A4, a marker of the rhomboid phenotype in vitro*. Circ Res, 2007. **100**(7): p. 1055-62.
14. Chaabane, C., et al., *Biological responses in stented arteries*. Cardiovasc Res, 2013. **99**(2): p. 353-63.
15. Ithychanda, S.S., et al., *Identification and characterization of multiple similar ligand-binding repeats in filamin: implication on filamin-mediated receptor clustering and cross-*

- talk*. J Biol Chem, 2009. **284**(50): p. 35113-21.
16. Pilop, C., et al., *Proteomic analysis in aortic media of patients with Marfan syndrome reveals increased activity of calpain 2 in aortic aneurysms*. Circulation, 2009. **120**(11): p. 983-91.
 17. Halushka, M.K., et al., *Consensus statement on surgical pathology of the aorta from the Society for Cardiovascular Pathology and the Association For European Cardiovascular Pathology: II. Noninflammatory degenerative diseases - nomenclature and diagnostic criteria*. Cardiovasc Pathol, 2016. **25**(3): p. 247-257.
 18. Huang, L., et al., *Potential biomarkers and targets in reversibility of pulmonary arterial hypertension secondary to congenital heart disease: an explorative study*. Pulm Circ, 2018. **8**(2): p. 2045893218755987.
 19. Deng, X., et al., *Where the congenital heart disease meets the pulmonary arterial hypertension, FLNA matters: a case report and literature review*. BMC Pediatr, 2020. **20**(1): p. 504.
 20. Burrage, L.C., et al., *Lung Transplantation for FLNA-Associated Progressive Lung Disease*. J Pediatr, 2017. **186**: p. 118-123 e6.
 21. Chen, T., et al., *BAPN-induced rodent model of aortic dissecting aneurysm and related complications*. J Thorac Dis, 2021. **13**(6): p. 3643-3651.