

慢性血栓塞栓性肺高血圧症の肺動脈内膜における 蛋白・遺伝子発現解析

帯包紀代¹⁾, 本間 琢¹⁾, 山田清香¹⁾, 羽尾裕之¹⁾

Protein and gene expression in pulmonary artery of chronic thromboembolic pulmonary hypertension.

Hiyo OBIKANE¹⁾, Taku HOMMA¹⁾, Sayaka YAMADA¹⁾, Hiroyuki HAO¹⁾

要旨

慢性血栓塞栓性肺高血圧症は、器質化血栓により肺動脈が慢性的に閉塞する予後不良の病態である。治療法として肺動脈血栓内膜摘除術 (PEA) が有効であるが、PEA 標本に対する病理学的検討は文献上少ない。今回我々は PEA 標本の病理組織像と術後経過との関連性、およびこれらの組織における蛋白・遺伝子発現について検討した。

術後経過良好群の PEA 標本では、経過不良群に比べ、分化した平滑筋細胞を伴う再疎通血管集簇像が有意に多く認められ、術後経過予測に重要な所見と考えられた。蛋白・遺伝子検索では、血栓形成部位での酸化・抗酸化機構の関与が示唆された。また、再疎通血管集簇部での血管収縮物質・エンドセリンの上昇、分化した平滑筋細胞のエンドセリン受容体 ET-a の発現が見られ、病状増悪に関与すると考えられた。

1. はじめに

慢性血栓塞栓性肺高血圧症 (Chronic thromboembolic pulmonary hypertension: CTEPH) は、肺動脈内に発生した器質化血栓により肺動脈が慢性的に閉塞・狭窄し、肺高血圧ひいては右室不全を引き起こす予後不良の病態であり、本邦でも特定疾患に指定されている。

CTEPH に対する現在の治療法は、血栓の再発予防の抗凝固療法と肺高血圧症に対する肺血管拡張剤使用などの薬剤療法の他、肺動脈血栓内膜摘除術 (Pulmonary thromboendarterectomy: PEA) やバルーン肺動脈形成術が有効な外科的治療法として知られている¹⁾。

CTEPH に関して、PEA の効果や術式に関する研究は多いが、病変摘除検体に対する病理学的検討は

文献が少なく、病変の評価法も確立していない²⁾。

そこで、本研究では CTEPH 症例の PEA 標本を用いて、病理組織標本を客観性のある指標で分類し、臨床所見・術後データ等との関連性を検討した。また、組織形態と蛋白・遺伝子発現を比較・検討し、CTEPH における病変増悪のメカニズムについて考察した。

2. 対象及び方法

2-1 対象

共同研究施設である東京医科大学病院で平成 25 年 2 月から平成 29 年 3 月までに採取された CTEPH 50 症例の PEA 検体について検討した。

組織学的・免疫組織化学的検索についてはホルマリン固定・パラフィン包埋標本を用いた。遺伝子・

1) 日本大学医学部病態病理学系人体病理学分野
帯包紀代: obikane.hiyo@nihon-u.ac.jp

蛋白解析に関しては、平成26年6月から平成29年3月までに上記施設に提出された27症例から材料を採取し、解析可能であった109個のサンプルを用いた。

尚、PEA適応となる症例は、いずれも術前に、中枢型もしくは中枢型+末梢型の肺動脈血栓症と判断されている。また、過去に採取された検体のホルマリン固定・パラフィン包埋ブロックを使用する後ろ向き研究に関しては、文書掲示によるオプトアウトの実施を行い、新たに採取される検体を用いた前向き研究に関しては、全例主治医よりインフォームドコンセントを取得した（東京医大・医学研究倫理審査委員会で承認済み。受付番号No.2694およびNo.2752）。

2-2 方法

1) CTEPH症例の臨床データ解析

全症例の術前後の右心カテーテルデータを確認し、術後肺高血圧残存のない経過良好群と、術後肺高血圧残存例および死亡例を含む術後経過不良群に分け、両群における患者背景、臨床指標に違いがないか検討した。なお、術後残存肺高血圧の定義は文献に基づき、肺血管抵抗 (pulmonary vascular resistance:PVR) $\geq 500 \text{ dynes} \cdot \text{sec}^{-1} \cdot \text{cm}^5$ とした²⁾。

2) 病理組織像と術後経過との関連性の検討

PEA標本の組織像を、再疎通血管の集簇像 (Colander lesion)・新鮮血栓・器質化初期像・粥腫の4群に分類し、標本上の総病変数/総剖面数を算出した。各所見が術後経過良好群・不良群とで差が見られるか検討した。

3) 免疫組織化学的検討

① 平滑筋細胞分化マーカー (α -smooth muscle actin: α -SMA, h-caldesmon,), マクロファージマーカー (CD68), 酸化・抗酸化マーカー (Thioredoxin interacting protein: TXNIP, thioredoxin: TRX), エンドセリン受容体A (ET-a) の抗体を用い、免疫染色を行った。

② 組織像と比較し、蛋白を発現している細胞の種類や分布を検討した。

4) 遺伝子発現解析

採取サンプルからのRNA抽出を行い、酸化・抗酸化マーカーであるTXNIP, TRXおよび血管収縮物質 endothelin-1のmRNAの発現をRT-PCRで解析した。内因性コントロールにはGAPDHを用い、 Δ CT

法で評価した。いずれもTaq-Man Probeを使用し、計測にはQuantStudio3を使用した。

サンプル採取時にはその対面を組織標本とし、組織像を確認し遺伝子発現と検討した。

5) 統計解析

統計解析ソフトSPSSを使用し、Mann-whitney U検体, student-T検定, χ^2 検定を行った。

3. 結果

3-1 全患者の背景と臨床検査データ・心臓カテーテル検査結果の比較

全症例の臨床背景、術前後の各種指標を表1-aに示す。全50症例のうち術後経過不良例は8例見られた。PEA後にPVRが500以上である残存肺高血圧症例は7例、術後死亡例は1例（術後PVR測定前）であった。経過不良群は全て女性で年齢がやや高かった。また、予後良好群と比較し術前PVRは有意に高く、術前心拍出量は有意に低下していた ($P < 0.05$)。

その他の背景（凝固異常の有無、深部静脈血栓の有無）、BNP等の各指標についてはいずれも両群間で有意差が見られなかった。

3-2 病理組織像と術後経過との関連性の検討

(表1-b)

PEA標本の各所見について、術後経過良好群・不良群間での比較を図1に示す。術後経過良好群のPEA標本では、術後経過不良群に比較し、Colander lesionが有意に多く認められた。その他の器質化初期像、新鮮血栓、粥腫については、両群間で有意差が見られなかった。

3-3 免疫組織化学的検討 (図1)

器質化血栓内の平滑筋細胞の性質、酸化・抗酸化マーカーについて検討した。

免疫組織化学的には、Colander lesionの再疎通血管を取り囲むように α -SMA (+) /h-caldesmon (+)となる高分化な平滑筋細胞の増生が確認できた。新鮮血栓や器質化初期の血栓では α -SMA (+) /h-caldesmon (-)の脱分化した平滑筋細胞のみがみられ、血栓器質化が進むにつれ平滑筋細胞の分化が進むことがCTEPH病理像の特徴と考えられた。

この高分化平滑筋細胞には血管収縮物質エンドセリンの受容体, ET-aも確認できた。

酸化・抗酸化マーカーであるTXNIPとTRXは浸

表 1-a 患者の背景と臨床検査データ

	総 数	術後経過良好群 (PVR<500)	術後経過不良群 (PVR ≥ 500 or 死亡)
症例数	50例	42例	8例(死亡例1例)
平均年齢	60.4 ± 13.6	58.3 ± 13.3 *	69.1 ± 12.0 *
男女比(人数)	17:33	17:25 *	0:8 *
凝固異常の診断あり	22.0%	19.5%	37.5%
深部静脈血栓の有無	70.0%	68.3%	75.0%
術前平均肺動脈圧 (mmHg)	41.7 ± 9.8	41.5 ± 10.3	42.9 ± 7.4
術前心拍出量 (L/min)	4.02 ± 1.35	4.20 ± 1.32 *	3.07 ± 1.19 *
術前肺血管抵抗 (dyne · sec · cm ⁻⁵)	781.3 ± 412.	725.1 ± 383.8 *	1076.1 ± 457.4 *
術前BNP (pg/ml)	184.7 ± 201.0	178.2 ± 213.2	216.0 ± 134.4
術前6分間歩行 (m)	326.4 ± 109.2	330.0 ± 110.0	300.0 ± 110.7
術後平均肺動脈圧 (mmHg)	21.2 ± 8.3 **	19.3 ± 7.2 **	32.6 ± 5.0 **
術後心拍出量 (L/min)	4.13 ± 1.34	4.32 ± 1.36	3.00 ± 0.29
術後肺血管抵抗 (dyne · sec · cm ⁻⁵)	280.9 ± 181.8 **	219.4 ± 102.2 **	649.9 ± 87.9 **
術後BNP (pg/ml)	131.6 ± 156.9	91.0 ± 73.3	334.2 ± 279.8
術後6分間歩行 (m)	340.8 ± 108.2	355.3 ± 106.6	245.0 ± 65.4

Mean ± SD, * :p<0.05 (Mann-Whitney U test), ** :p<0.01 (術前後の比較, Student T test)

表 1-b 病理組織像と術後経過

(病巣数/剖面数)	術後経過良好群 (PVR<500)	術後経過不良群 (PVR ≥ 500 or 死亡)
再疎通血管集簇像	0.689 ± 0.427 **	0.129 ± 0.334 **
器質化初期像	0.440 ± 0.352	0.292 ± 0.261
新鮮血栓	0.582 ± 0.389	0.540 ± 0.408
粥状硬化	0.267 ± 0.353	0.264 ± 0.141

Mean ± SD, ** :p<0.01 (Mann-Whitney U test)

潤するマクロファージ・内皮細胞・平滑筋細胞に発現していたが、Colander lesionの高分化な平滑筋細胞では発現が低下していた。

3-4 遺伝子発現解析(図2)

27症例から得られた検体より解析可能であった109個のサンプルについて、その組織像からColander lesion, 新鮮血栓・初期器質化をみる血栓病変, 粥腫を伴った内膜の3群に分類した。それぞれの群での酸化マーカー (TXNIP), 抗酸化マーカー (TRX), 血管収縮物質 (Endothelin-1) のmRNA発現を比較した結果を図2に示す。Colander lesionを含むサンプルにおいてEndothelin-1の発現が、他の群に比較し有意に上昇していた。TRX発現は全群で有意差が確認できなかったが、TXNIPは再疎通血管で新鮮血栓よりも有意に増加しており、その他の群と比較しても増加傾向がみられた。

4. 考 察

4-1 術後肺高血圧残存の指標

臨床指標において、術後経過不良を予測する因子として、年齢、性別(女性)、術前PVR、術前心拍出量が挙げられた。ただしCTEPHは元来女性に多く、また術前状態の悪い症例で術後経過不良である例が多い結果と考えられ、これのみでの術後経過予測は困難であると思われる。

術後経過良好群のPEA標本の病理学的検討では、Colander lesionが有意に多く認められた。このことより、CTEPHに特徴的とされるColander lesionが病状を決定する責任病変であり、これを取り除くことがPEA術後肺高血圧残存を防ぐのに重要であると考えられた。病理組織学的にColander lesionの有無を確認することで、術後経過が予測できると考える。

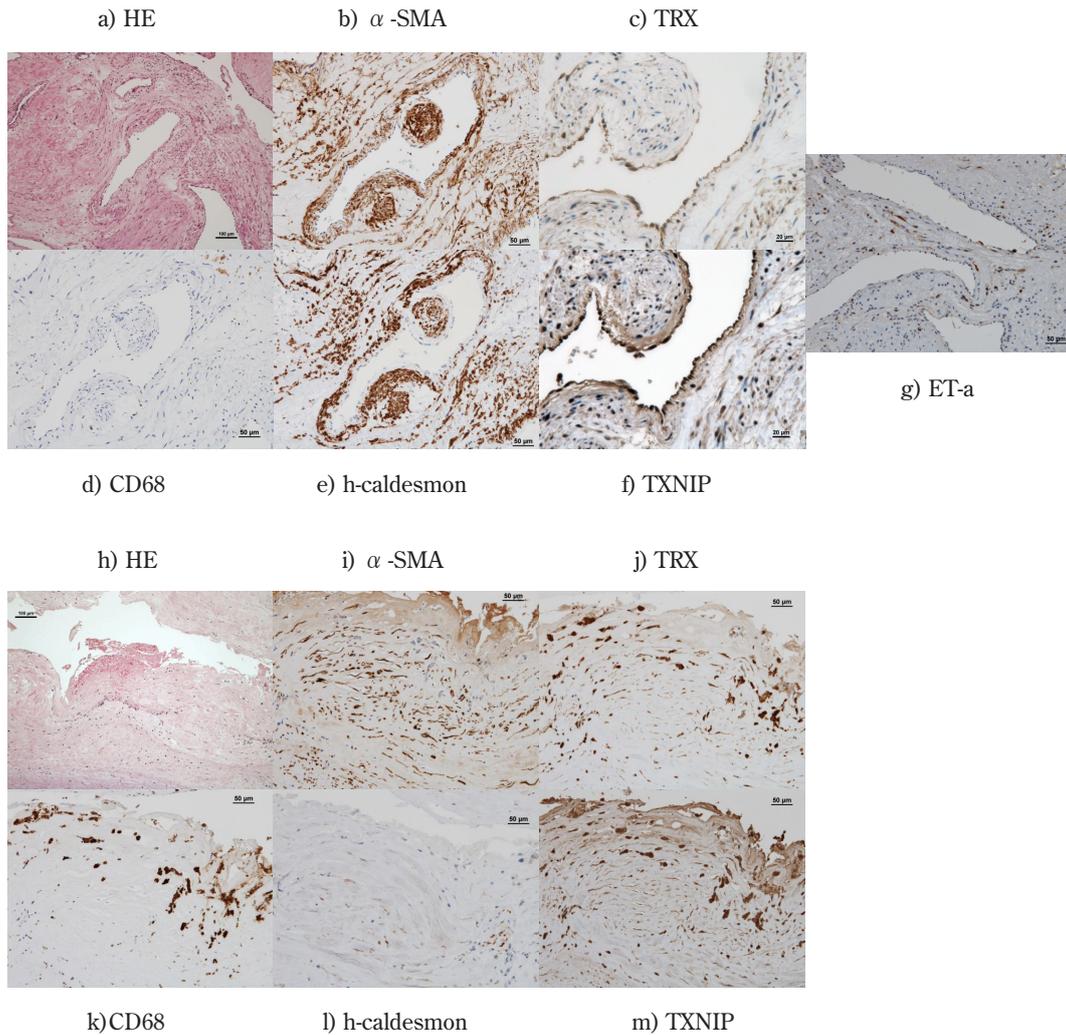


図1 PEA標本の免疫組織化学的検討

a) ~ g) は colander lesion (再疎通血管集簇部), h) ~ m) は器質化初期像
 TRX: Thioredoxin, TXNIP: Thioredoxin-interacting protein,
 ET-a: Endothelin receptor A

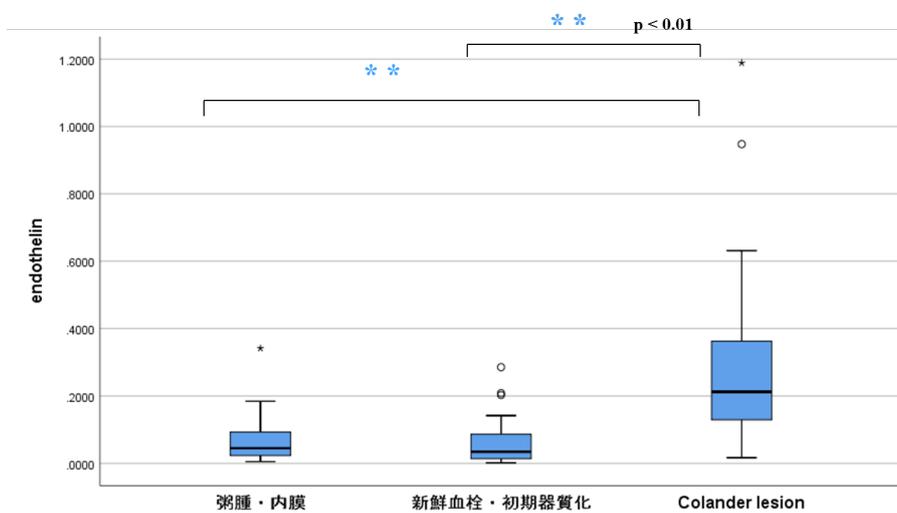


図2 PEA検体におけるEndothelin-1のmRNA発現
 Δ CT法

4-2 血栓の器質化維持機構の推測（平滑筋細胞の分化と酸化・抗酸化機構の関与・病状増悪因子について）

器質化血栓および再疎通血管では、血栓器質化が進むにつれ平滑筋細胞の分化がみられ、再疎通血管周囲の高分化な平滑筋細胞はh-caldesmon (+), ET-a (+) で収縮能を有していることが示された。一方で、酸化・抗酸化マーカーであるTXNIPとTRXはマクロファージ・内皮細胞・器質化初期の平滑筋細胞に発現していたが、高分化な平滑筋細胞では発現が低下していた。

過去の文献より、TRXは低酸素下状態でHIF活性化を介して肺動脈平滑筋細胞増殖に関与する事³⁾、血管新生およびNF κ Bを介して血管平滑筋細胞の増殖に関わる事が知られている⁴⁾。他方、TXNIPはTRXを抑制することが知られている⁵⁾。このことを併せ、器質化初期の内皮細胞・マクロファージ・脱分化した平滑筋細胞から分泌されるTRXが平滑筋細胞増殖に関与し、それに伴いTXNIPも動員されていると推測される。増殖した平滑筋細胞は血圧や血流の影響により、h-caldesmonおよびET-a陽性の収縮能を有する高分化な平滑筋細胞へと形質が転換し、それに伴い高分化な平滑筋細胞でのTRX、TXNIPの発現が低下したと考える。

再疎通血管サンプルのmRNA解析では新鮮血栓・器質化初期血栓に比べendothelin-1の発現が上昇していたが、これは再疎通血管の内皮細胞から産生されていると考えられる。このendothelin-1が再疎通

血管周囲の高分化な平滑筋細胞に局在するET-aに結合することにより平滑筋収縮が起り病状増悪に関与すると考える。

尚、TRXのmRNA発現は全群で有意差が確認できなかったが、TRXはその発現量よりも活性化が重要⁵⁾であるとされており、酸化・抗酸化機構の関与を否定するものではないと考える。

5. 結 語

CTEPHでは、血栓形成部で酸化・抗酸化機構の関与の下、器質化・再疎通の過程を経て高分化平滑筋細胞を有する再疎通血管が形成される。この分化した平滑筋細胞はエンドセリン受容体を有し、内皮細胞から分泌されるエンドセリンに反応し収縮することで、肺高血圧の増悪が起きていると推測される。PEA標本の観察では、この成熟平滑筋を伴う再疎通血管集簇像の確認が重要である。

謝 辞

この研究の一部は、小澤研究の助成を受け行われた。

文 献

- Moser KM, et al. *Ann Intern Med* 1987;107:560-65.
 Hosokawa K, et al. *Int Heart J* 2011;52 (6):377-81.
 Chen B, et al. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2013 Sep;305 (5):L389-95
 Schulze PC, et al. *Circ Res*. 2002 Oct 18;91 (8):689-95.
 Madrigal-Matute J, et al. *Oxid Med Cell Longev* 2012; 232464.