

急性大動脈症候群の病態解明と人工知能による 新規診断技術・バイオマーカーの開発

羽尾裕之¹⁾, 福田安希代¹⁾, 傳田侑也¹⁾, 山田清香¹⁾, 鈴木真由美¹⁾, 宇都健太¹⁾, 森雅也²⁾,
原一之²⁾, 大前佑斗²⁾, 豊谷純²⁾

Study on molecular pathology of acute aortic syndrome and New diagnostic techniques with artificial intelligence

Hiroyuki HAO¹⁾, Akiyo FUKUDA¹⁾, Yuya DENDA¹⁾, Sayaka YAMADA¹⁾, Mayumi SUZUKI¹⁾,
Kenta UTO¹⁾, Masaya MORI²⁾, Kazuyuki HARA²⁾, Yuto OMAE²⁾, Jun TOYOTANI²⁾

要旨

大動脈瘤破裂、大動脈解離などの急性大動脈症候群は致命的経過を辿る重篤な疾患であるが、病態は不明な点が多い。現状では発症後早期の診断・治療に重点が置かれ、発症の予測は困難と考えられている。本研究では、急性大動脈症候群の動物モデルおよび患者血液、手術・病理解剖で得られた大動脈組織検体を用いて、本症候群の病態の更なる解明を目指す。さらに患者の画像や検査データなどの臨床情報とともに、患者検体を用いて、急性大動脈症候群の発症が予測可能な人工知能による早期発症予測プログラムの開発と新規バイオマーカーを特定することを目的とする。さらに、新規バイオマーカーを活用した動脈硬化性疾患罹患者、結合組織病罹患者などのハイリスク患者の予後を前向きに解析し、バイオマーカーの予測能および診断能を解析することを副次的な目的とする。

1. はじめに

急性大動脈症候群 (Acute aortic syndrome: AAS) は大動脈瘤破裂や大動脈解離 (Aortic dissection: AD) を含む、致命的な経過を辿る重篤な疾患である^{1,2)}。上行大動脈に解離が及ぶStanford A型のAD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³⁾、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。AAS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⁴⁾。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⁵⁾。AAS患者の大動脈中膜においては、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、発症の一因とする報告もある⁶⁾。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では能動的な反応によって、細胞の表現型を変化させて収縮機構を調整する⁵⁾。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⁷⁾。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⁸⁾、アテローム動脈性

1) 日本大学医学部病態病理学系人体病理学分野

2) 日本大学生産工学部

責任者連絡先: 羽尾裕之, hao.hiroyuki@nihon-u.ac.jp

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⁹⁾、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¹⁰⁾。VSMCsの表現型の変化のほかに、最近のプロテオーム解析で、Niemann-Pick disease type C2 protein (NPC2) と insulin-like growth factor-binding protein 7 (IGFBP7) の2つのタンパク質が、大動脈瘤のVSMCや泡沫細胞で産生が亢進し、血液中でも同様の変動がみられることが報告され¹¹⁾、急性大動脈症候群の新規バイオマーカーとして活用できる可能性が示された。この2つのタンパク質も、現状では臨床診断に導入されてはいないが、このような新規マーカー候補の知見の蓄積が進めば、将来的には診断ツールとして用いられる分子が確立される可能性が期待される。本研究の目的は、手術で採取されたヒトのAD患者の大動脈壁とモデル動物を用いて、AASの発症機序を明らかにすることである。また、近年の人工知能の医学領域への応用に関する研究は、実験レベルの研究から、社会実装可能なレベルの研究まで、日進月歩で進んでいる。本研究では患者の画像や検査データなどの臨床情報に加え、患者血液検体や手術・病理解剖で得られた大動脈壁を用いた病態解明の過程で得られた様々な生化学的データから、生産工学部・理工学部と共同で人工知能を用いたAASの診断システムを開発する。現時点で我々が調べた限り、全世界において急性大動脈症候群の早期診断を目的とした人工知能を用いた診断システムの開発に関する研究成果は報告されていない。

2. 対象及び方法

(1) 動物モデルを用いた急性大動脈症候群の病態解明

① ApoE・smoothelin 遺伝子欠損マウスを用いた大動脈瘤モデル動物の作成

腹部大動脈瘤のモデルマウスとして Apo E 遺伝子欠損マウスに Angiotensin II (Ang II) を持続投与する手法が確立されている。このモデルマウスに高分化な血管平滑筋細胞に発現する遺伝子である Smoothelin B (Smtn B) を欠損させ (SmtnB^{-/-}× Apo E^{-/-})、Apo E 単独欠損マウス (Apo E^{-/-}) との免疫組織化学的所見と遺伝子発現量の比較を行った。

② ラットを用いた大動脈解離モデルの作成

Sprague-Dawley (SD) ラットに対して、ECMの合成を阻害する薬剤である β -aminopropionitrile (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、免疫組織化学的所見と遺伝子発現量の比較を行った。

(2) ヒトの大動脈検体での検討

ADで手術をした24例 (AD群) と、大動脈疾患のない剖検例17例 (control群) の大動脈壁の中膜を用いて、免疫組織化学的所見と遺伝子発現量の比較を行った。

(3) 人工知能を用いた急性大動脈症候群の診断技術の開発

現在、AI学習を用いた病理診断について生産工学部と会議を重ねており、必要な画像を収集している。今後、血管病理の診断補助としての利用を目指している。

3. 結果

(1) 動物モデルとヒト検体を用いた急性大動脈症候群の病態解明

① ApoE・smoothelin 遺伝子欠損マウスを用いた大動脈瘤モデル動物の作成

大動脈瘤発生率について、Apo E^{-/-}マウスで62.5%、Apo E^{-/-}×Smtn B^{-/-}マウスで17%と Apo E^{-/-}×Smtn B^{-/-}マウスにおいて Apo E^{-/-}マウスと比較し有意に腹部大動脈瘤発生率が低かった (図1, p<0.05)。

病理組織学的評価について、Alcian-blue, Mac2, Smooth muscle myosin heavy chain (SM-MHC) を染色し、それぞれの染色面積について Image J35 を用いて2群間で比較した。大動脈瘤形成部で炎症性変化による組織構造破壊していることを考慮し、二次的変化を除外するために大動脈瘤部以外の切片で染色を行った。結果として Alcian-blue 染色につい

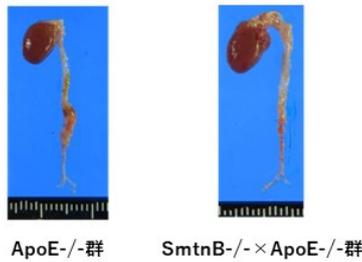


図1 ApoE^{-/-}マウスとSmtnB^{-/-}×ApoE^{-/-}マウスの大動脈のマクロ像

ApoE^{-/-}群では腎動脈分岐部に動脈径の拡大がみられたが、SmtnB^{-/-}×ApoE^{-/-}では径の拡大が抑制される傾向にあった。

では、Apo E^{-/-}×Smtn B^{-/-}マウスがApo E^{-/-}マウスに比較して有意に染色率（Alcian blue 陽性面積/中膜面積）が低かった（図2, p<0.05）。Mac2, SM-MHC においては2群間における有意差は認めなかった。Alcian blue 染色では酸性ムコ多糖沈着をみており、Alcian blue 染色陽性面積が、Apo E^{-/-}×Smtn B^{-/-}マウスにおいて低かったことから、Smtn B欠損により酸性ムコ多糖の合成が抑制され、腹部大動脈瘤の発生低下につながる可能性が考えられる。

遺伝子発現について、S100A4 (p=0.000069), TGFβ (p=0.037), F4/80 (p=0.00071), Col1a1 (p=0.010) の遺伝子発現は、いずれもApo E^{-/-}マウス群に対してApo E^{-/-}×Smtn B^{-/-}マウス群で有意に発現量が低下していた。

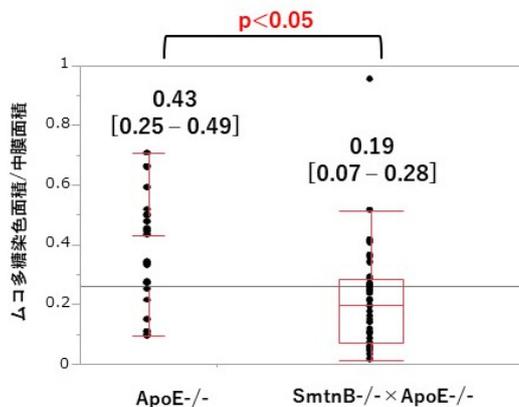


図2 モデルマウスのAlcian-blue染色での比較
ApoE^{-/-}群と比較して、SmtnB^{-/-}×ApoE^{-/-}群では有意にAlcian-blue陽性面積の減少がみられた。

②ラットを用いた大動脈解離モデル

BAPN+Ang II群では7頭全てで急性大動脈解離を発症し（図3）、OCTでの観察により、解離は中膜の深層の外膜に近い部位で起きていることがわかった（図4）。うち4頭は10週齢前に死亡した。BAPN群は8頭中1頭のみADを発症したものの、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<0.01）。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。解離部位では弾性線維の菲薄化が目立った。表1に示したように、解離の存在部位が上行まで達しているもの

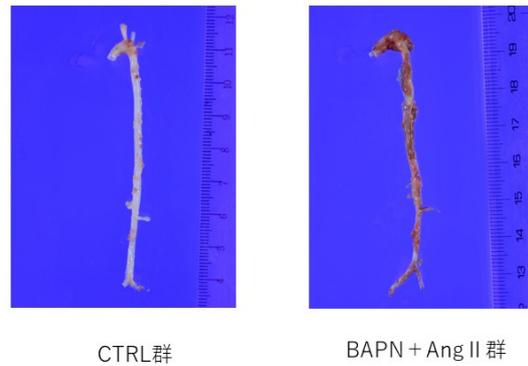
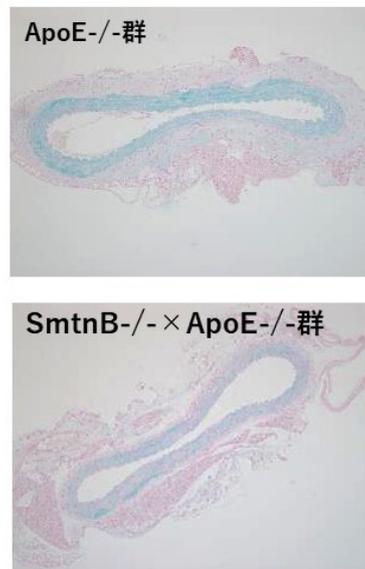


図3 大動脈モデルラットのマクロ像

BAPN + Ang IIでは大動脈弓部周囲に大動脈径の拡張がみられた。



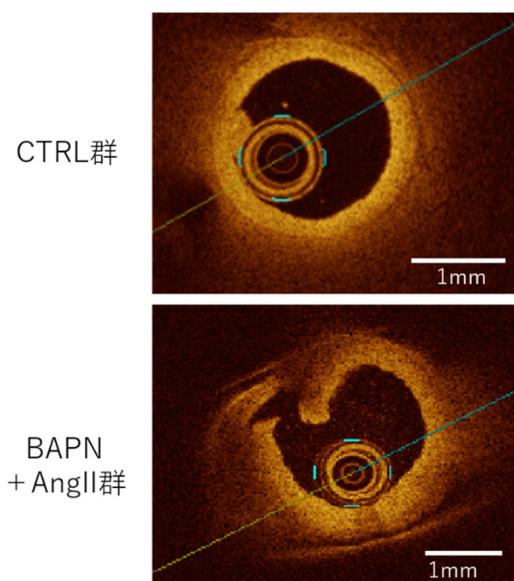


図 4 モデルラットの大動脈壁に対する OCT 画像

大動脈解離発症例の OCT では、CTRL 群と比較して中膜の肥厚がみられ、中膜が二層に剥離した像が観察された。

表 1 ラット大動脈解離モデルの発症様式と合併症

	CTRL (n=4)	BAPN (n=11)	BAPN+Ang II (n=7)
Aortic dissection	0	1	7
Type of dissection			
Stanford type A		1	6
Stanford type B			1
length of false lumen			
<10mm		0	2
10mm ≦		1	5
skip lesion	0	0	3
Aortic rupture	0	1	4
Localization of rupture			
Aortic arch		1	2
Descending aorta			1
Abdominal aorta			1
Other vessel events	0	0	1
rupture of renal artery			1
death without vessel events	0	2	0
bowel obstruction		1	
rupture of intestine		1	

BAPN 群では 1 頭が大動脈解離を発症し、2 頭が血管イベント以外で死亡した。BAPN + Ang II 群では 7 頭全頭が大動脈解離を発症した。CTRL：コントロール群 BAPN：β-aminopropionitrile 内服群 BAPN + Ang II：BAPN と Angiotensin II 併用群

をヒトの大動脈解離の分類に基づいて Stanford type A, 達していないものを Stanford type Bとして分けると, BAPN+Ang II 群の7頭中6頭が Stanford type Aであった。解離腔の長さは10mmをこえるものが5頭で, 3頭は離れた2カ所にADを発症していた。BAPN群も含めて解離による偽腔の破裂をきたしたものは5頭であり, 破裂部位は様々であった。BAPN+Ang II 群では血管イベント以外で死亡した症例はなかったが, BAPN群では6週0日に腸閉塞で, 8週0日に腸穿孔で死亡した2頭が含まれた。

(2) ヒトの大動脈検体

AD群において, 高分化平滑筋細胞マーカーであるSM-MHC, smoothelinの発現が低下していた。一方で脱分化平滑筋細胞マーカーであるS100A4は発現が増加していた(図5)。AD群において, 中膜の弾性線維の主要成分であるelastinはその分布が低下しており, MMP-2の活性は増強していた。また, 高分化平滑筋細胞マーカーとelastinの分布に正の相関関係があることが示された。また, 中膜変性が強い部位においてfilamin Aが濃染された像がみられた(図6)。

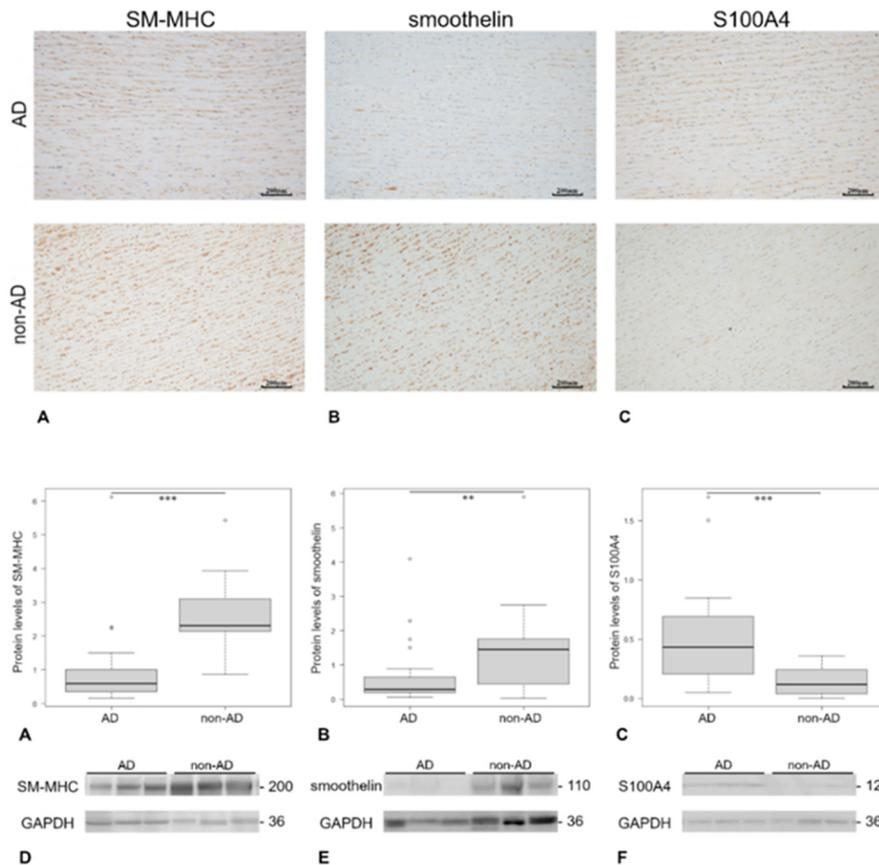


図5 ヒト大動脈における血管平滑筋細胞の表現型マーカーの免疫組織化学と蛋白分析

AD群において (A) Smooth muscle - myosin heavy chain (SM-MHC) と (B) smoothelin の陽性面積の減少, (C) S100A4 の陽性染色の増加があった。発現量の結果も同様であった ($p < 0.001$, $p = 0.0062$, $p < 0.001$; D-F)。AD群: 大動脈解離群 non-AD群: 非大動脈解離群 Scale bar = 200 μ m

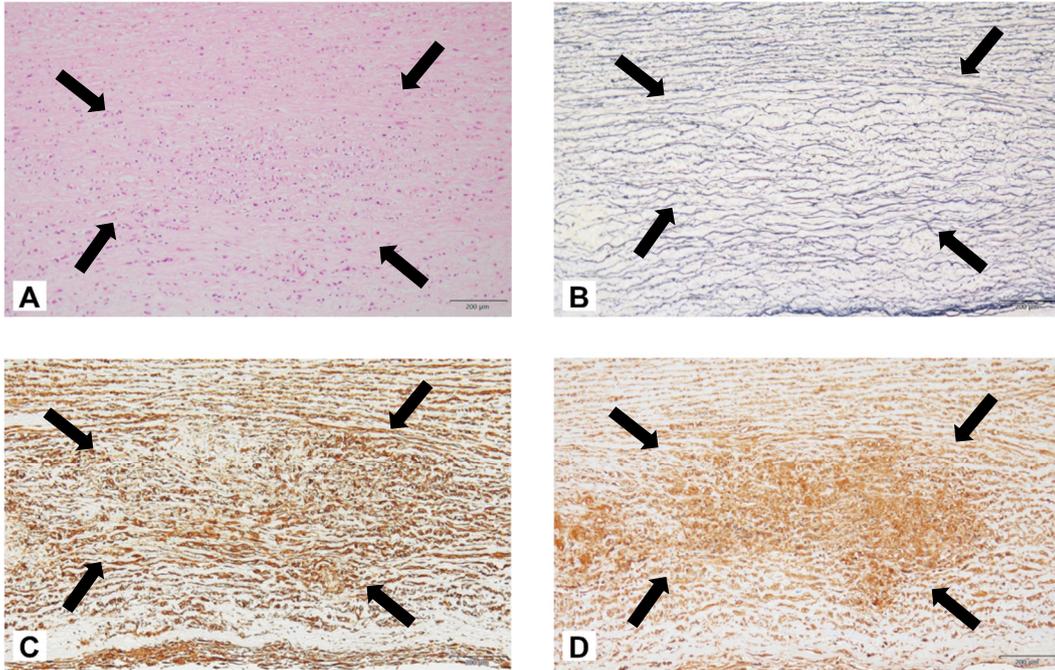


図6 AD群の中膜変性部位での代表的な連続切片のHEと免疫組織化学

HE染色(A)において血管平滑筋細胞の配列の乱れと、EVG染色(B)で弾性線維の離開、断裂を伴う α -SMA染色(C)陽性の部位において、filamin AのC末端抗体による染色(D)で嚢状に濃染される像がみられた(黒矢印)。HE: Hematoxylin-Eosin EVG: Elastica van Gieson α -SMA: α -smooth muscle actin

4. 考察

ヒトのAASの発症を模したモデル動物の作製は広く行われており、遺伝子変異の導入やBAPN、Ang IIなどの化学物質の投与が行われている。既知の大動脈瘤モデルマウスに対してSmtn遺伝子を欠損させることで大動脈瘤の発生を抑制できた理由について、炎症の抑制が関与している可能性がある。関連する遺伝子や抑制される炎症カスケードの追求をすることで、大動脈瘤の発生機序の解明や新規治療に役立つと考える。大動脈解離モデルラットについて、BAPNはLOXを阻害することで弾性線維を破壊することが知られているが、マウスへの投与によりMMP-2/9の発現と活性が上昇したという報告があり[6,7]、これらによるECMの分解によって中膜変性が進行することがAD発症の要因となっていることが考えられる。ラットにおいてBAPNとAng IIを併用した報告は少なく、AD発症のためのBAPNの至適濃度についても検討されているが、本研究におけるモデルでは100%の確率でADを発症しており、AD以外の合併症の頻度も多くないことからモデル動物として有用であると考えられる。

ヒトのADをきたした中膜について、高分化平滑

筋細胞マーカーは発現が減少しており、また、中膜変性が強い部位においてfilamin Aが濃染された像がみられた。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おり、エラスチンを含む細胞外基質の分解が血管平滑筋細胞の脱分化を誘導している可能性がある。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血管平滑筋細胞が脱分化型に形質転換することに加え、MMP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血管平滑筋細胞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、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可能性がある。今後さらに大動脈中膜における平滑筋細胞の表現型や周辺蛋白と細胞外基質との関連を検討することがADの病態解明につながると考える。

5. 結語

急性大動脈症候群の発症機序について、動物モデルとヒトの検体を用いて追及することで、新規の診断技術や新規治療につながる可能性がある。

謝辞

本研究は日本大学学術研究助成 [独創的・先駆的研究] を受けて行われたものであり、謝意を表します。

文 献

- 1) CA Nienaber, KA Eagle. Aortic dissection: new frontiers in diagnosis and management: Part I: from etiology to diagnostic strategies. *Circulation* 2003;108 (5) :628-635.
- 2) R Erbel, et al. Diagnosis and management of aortic dissection. *Eur Heart J* 2001;22 (18) :1642-1681.
- 3) P.G Hagan, et al. The International Registry of Acute Aortic Dissection (IRAD) : new insights into an old disease. *JAMA* 2000;283 (7) :897-903.
- 4) EW Larson, WD Edwards, Risk factors for aortic dissection: a necropsy study of 161 cases. *Am J Cardiol* 1984;53 (6) :849-855.
- 5) B Zhou, et al. Contractile Smooth Muscle and Active Stress Generation in Porcine Common Carotids. *J Biomech Eng* 2018;140 (1) :0145011-0145016.
- 6) L Wang, et al. Association of smooth muscle cell phenotypes with extracellular matrix disorders in thoracic aortic dissection. *J Vasc Surg* 2012;56 (6) :1698-1709,1709 e1.
- 7) S.S Rensen, PA Doevendans, GJ van Eys. Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Neth Heart J* 2007;15 (3) :100-108.
- 8) H Hao, G Gabbiani, ML Bochaton-Piallat. Arterial smooth muscle cell heterogeneity: implications for atherosclerosis and restenosis development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23 (9) :1510-1520.
- 9) AC Brisset, 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) :1055-1062.
- 10) C Chaabane, et al. Biological responses in stented arteries. *Cardiovasc Res* 2013;99 (2) :353-363.
- 11) Yagi H, et al. Discovery of novel biomarkers for atherosclerotic aortic aneurysm through proteomics-based assessment of disease progression. *Sci Rep* 2020;10 (1) :6429.