

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死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。将来的には、早期発症予測プログラムを健康診断や人間ドックなどに導入し、急性大動脈症候群に罹患しやすい患者のリスク層別化を行って、急性大動脈症候群の早期発見と医療の早期介入を可能にすることを最終的な目標とする。

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、致死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-

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

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。

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（日本大学医学部動物実験委員会承認番号：AP23MED036-2）

①ApoE・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（日本大学医学部付属板橋病院臨床研究倫理審査委員会承認番号：RK-221011-2）

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

①ApoE・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。血管壁を構成している主要な細胞である血管平滑筋細胞は、血管壁の恒常性の維持に重要な役割を果たしており、腹部大動脈

瘤の血管壁では脱分化傾向を示すことがわかっている。そこで、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*) に着目し、*Apo E* と *Smtn B* の両遺伝子を欠損させたマウス (*Apo E* $^{-/-}$ $\times$ *Smtn B* $^{-/-}$) にアンジオテンシン II を持続投与し、大動脈瘤の発症率について検討した。また、*Apo E* 単独欠損マウス (*Apo E* $^{-/-}$) と比較して、病理組織学的評価を行った。

大動脈瘤発症率については、*Apo E* $^{-/-}$ マウスで 62.5%、*Apo E* $^{-/-}$ $\times$ *Smtn B* $^{-/-}$ マウスで 17% と *Apo E* $^{-/-}$ $\times$ *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症率が低かった (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、二次的变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 染色については、*Apo E* $^{-/-}$ $\times$ *Smtn B* $^{-/-}$ マウスが *Apo E* $^{-/-}$ マウスと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* $^{-/-}$ $\times$ *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、腹部大動脈瘤の発症低下につながる可能性が考えられる。*Apo E* $^{-/-}$ $\times$ *Smtn B* $^{-/-}$ マウスでは *Apo E* $^{-/-}$ マウスと比較して血管壁における炎症性サイトカインの mRNA 発現が減

弱していた。興味深いことに smoothelin はこれまで言われてきた平滑筋細胞の収縮への関与とともに、局所の炎症にも作用してる可能性が示唆された。本検討より大動脈瘤発症から伸展に至る機序の一部が解明されることが期待される。

②ラットを用いた大動脈解離モデル

大動脈解離 (Aortic dissection: AD) の発症には大動脈壁中膜の脆弱性の関与が指摘されているが、詳細な病態や発症機序は不明な点が多い。本研究ではラットを用いた AD モデル動物を作成し、AD 発症機序の解明を目的とする。SD ラットに β -aminopropionitrile (BAPN) を 3 週齢より飲料水に溶解して 7 週間投与した (BAPN 群)。また、同様のプロトコールで BAPN 投与後に 9 週齢から Angiotensin II (1mg/kg/day) を 1 週間持続投与した (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、病理組織切片を作製して評価した。

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。

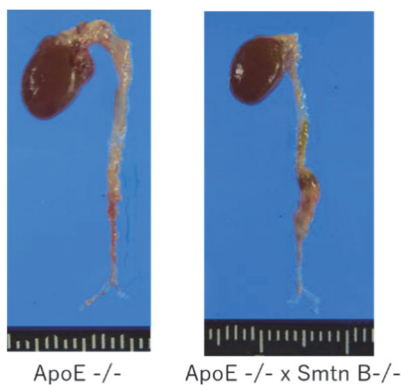


図 1 *ApoE* $^{-/-}$ マウスと *ApoE* $^{-/-}$ $\times$ *Smtn B* $^{-/-}$ マウスの大動脈
ApoE $^{-/-}$ 群では腎動脈分岐部に動脈径の拡大がみられたが、*Smtn* $^{-/-}$ $\times$ *ApoE* $^{-/-}$ 群では径の拡大が抑制される傾向にあった。

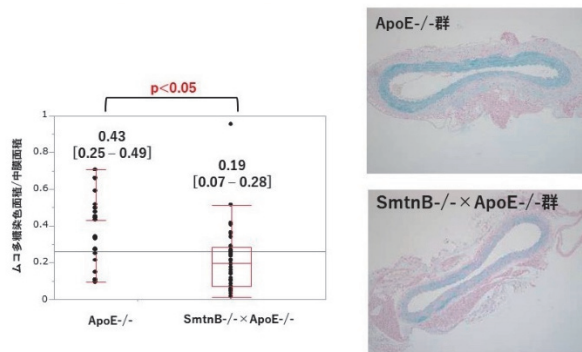


図 2 モデルマウスの Alcian-blue 染色での比較
ApoE $^{-/-}$ 群と比較して、*SmtnB* $^{-/-}$ $\times$ *ApoE* $^{-/-}$ 群では有意に Alcian-blue 陽性面積の減少がみられた。

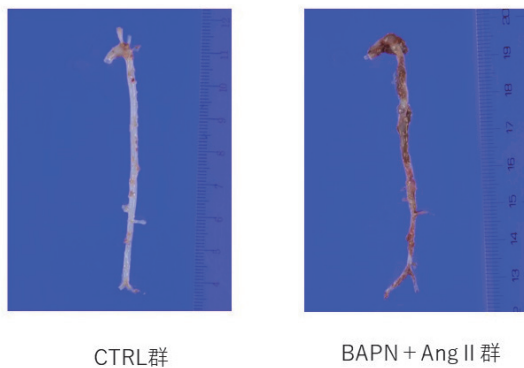


図3 モデルマウスのAlcian-blue染色での比較

BAPN + Ang II では大動脈弓周囲に大動脈径の拡張がみられた。

BAPNは細胞外基質の架橋に関与する酵素であるlysyl oxidaseを阻害する薬剤である。BAPNの投与により中膜の脆弱化を引き起こし、ヒトの大動脈解離に類似した病理組織所見を示した。さらに形態学的・分子病理学的検討を重ね、経時的な血液検査を行うことで、ヒトのAD発症機序の解明とバイオマーカーの開発に役立つと考える。

(2) ヒトの大動脈検体での検討

ADにおける大動脈壁の中膜平滑筋細胞の表現型と弾性線維の分布、アクチン架橋蛋白であるfilamin Aについて、ヒト検体を用いて検討した。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、平滑筋細胞の分化マーカー(smooth muscle myosin heavy chain: SM-MHC, smoothelin, S100A4)、elastin, filamin A, matrix metalloproteinase (MMP) 活性について、western blotting, zymography, RT-qPCRで検討した。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(図6)、western blottingで、AD群においてfilamin Aはfull-lengthの割合が低下して有意に断片化がしていることが示された。一方で、

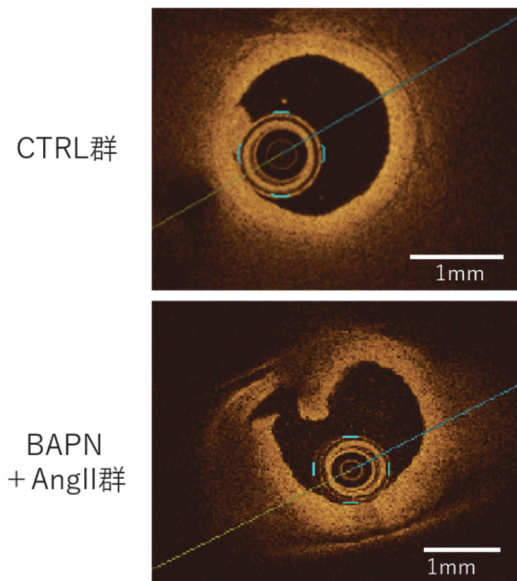


図4 コントロール群とBAPN+AngII群の大動脈壁に対するOCT画像

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。

full-length filamin AのmRNAの発現は、AD群で有意に増加していた。本研究において、ADにおける中膜変性では血管平滑筋細胞の表現型と弾性線維の分布が密接に関連していることが定量的、病理学的に示された。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。さらに我々は高血圧歴のある患者において解離発症群と非発症群とでfilamin A mRNAの発現を検討したところ、解離発症群においてはfilamin A mRNAの発現は非発症群と比較して有意に低下しており、断片化によるfilamin A mRNAの補填が解離群では作用していない可能性が示唆された。このメカニズムをさらに解明する事で

解離発症のメカニズムの解明につながると考えている。

(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

急性大動脈症候群の病理組織では、大動脈中膜に種々の変性をきたしている。心臓血管病理学会からの声明では中膜の変性の程度を3段階に分けて分類

しているが、血管病理に精通した医師の間でも意見が異なることもあり、血管病理の診断はたびたび困難である。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。

診断補助を実現するには、病理細胞画像から意味のある情報を取り出し数値化する過程（特徴量変

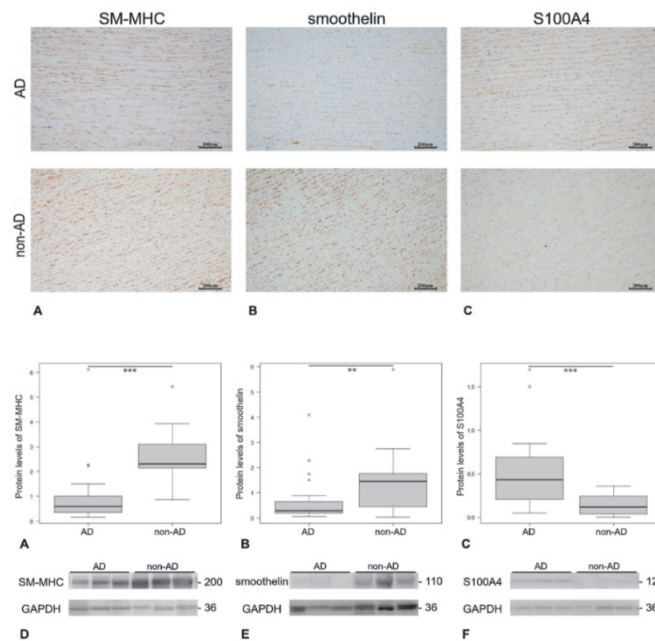


図5 ヒト大動脈における血管平滑筋細胞の表現型マーカーの免疫組織化学と蛋白分析

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

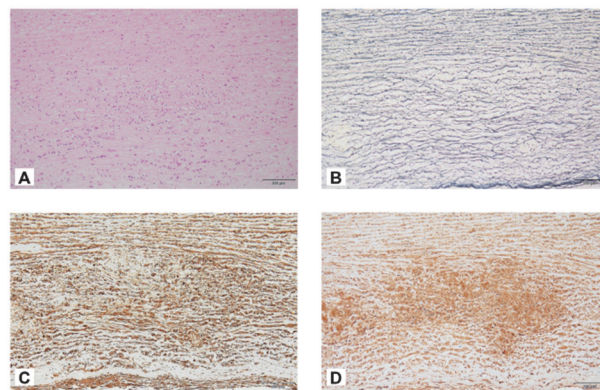


図6 AD 群の中膜変性部位での代表的な連続切片のHEと免疫組織化学

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。HE：Hematoxylin-Eosin EVG：Elastica van Gieson α -SMA： α -smooth muscle actin

換)が必要となる。近年、深層学習によるモデルが脚光を浴びているが、1,000名以上の被験者数を前提とするため、大規模データセットを構築しにくい領域で直接適用することは難しい。そのため、小標本でも稼働するモデル構築が必要となる。このためには、深層学習以外の方法で画像特徴量を計算しなければならない。画像処理における一般的な特徴量には、SIFT・SURF・FOG・カラー特徴量などがあるものの、これらは一般画像に向けたものであるため、病理画像への適用は必ずしも適切とはいえない。このような中、過去に行われたいくつかの研究において、テクスチャ特徴量が病理細胞画像から意味のある情報を抽出できることが示されてきた。そのため、本研究を分担する生産工学部は、テクスチャ特徴量ベクトルで定義された数式をプログラミングコードとして実装することで、病理細胞画像の入力に対しテクスチャ特徴量ベクトルを返却するライブラリを開発した。本ライブラリは複数枚の画像の入力に対し一括して特徴量計算を行うことから、一括した画像解析に有効である。実際に、本ライブラリとSupport Vector Machineを用いて、病理細胞画像から心筋症を判定するソフトウェアのプロトタイプ開発に成功し、この結果がSpringer Proceedings in Mathematics & Statisticsに掲載された(ただし生検データではないこと、被験者数が少ないことから、Pilot studyであることを付記する)。このライブラリはあらゆる医用画像に適用することが可能であることから、急性大動脈症候群の判定に使用する画像に対しても適用することが可能である。したがって現在、画像収集を行っている途中である。収集完了後は、前述した心筋症判定と同一の手続きにより、急性大動脈症候群の判定補助を行うシステムを開発する予定である。

4. 考察

AASの発症を模したモデル動物の作製には、遺伝子改変やBAPN、Ang IIなどの化学物質の投与が行われている。既知の*ApoE*欠損マウスにAng IIを持続投与する大動脈瘤モデルにおいて*Smtn*の欠損を追加することで炎症性サイトカインの発現の抑制を伴って、大動脈瘤の発生が抑制された点は非常に興味深い。Smoothelinは平滑筋細胞の収縮に関連し、高分化な平滑筋細胞のマーカー蛋白として知られて

いる。今回の検討から生体内での*Smtn*の新たな役割が明らかになった。これらの研究成果から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、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および人工知能を用いて研究を推進することで、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) Nienaber CA, Eagle KA. Aortic dissection: new frontiers in diagnosis and management: Part I: from etiology to diagnostic strategies. *Circulation* 2003; 108(5):628-635.
- 2) Erbel R, et al. Diagnosis and management of aortic dissection. *Eur Heart J* 2001;22(18):1642-1681.
- 3) Hagan PG, et al. The International Registry of Acute Aortic Dissection (IRAD): new insights into an old disease. *JAMA* 2000;283(7): 897-903.
- 4) Larson EW, Edwards WD. Risk factors for aortic dissection: a necropsy study of 161 cases. *Am J Cardiol* 1984;53(6):849-855.
- 5) Zhou B, et al. Contractile Smooth Muscle and Active Stress Generation in Porcine Common Carotids. *J Biomech Eng* 2018;140(1):0145011-0145016.
- 6) Wang L, 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) Rensen SS, Doevendans PA, van Eys GJ, Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Neth Heart J* 2007;15(3):100-108.
- 8) Hao H, Gabbiani G, Bochaton-Piallat ML, Arterial smooth muscle cell heterogeneity: implications for atherosclerosis and restenosis development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23(9):1510-1520.
- 9) Brisset AC, 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) Chaabane C, 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.