

氏名(本籍)	木村泰三(千葉県)			
学位の種類	博士(医学)			
学位記番号	博甲第5916号			
学位授与年月日	平成23年8月31日			
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当			
審査研究科	人間総合科学研究科			
学位論文題目	腹部大動脈瘤進展における細胞外マトリクスタンパクテネイシンCに関する研究			
主査	筑波大学教授	医学博士	榊原謙	
副査	筑波大学教授	医学博士	野口雅之	
副査	筑波大学准教授	医学博士	鴨田知博	
副査	筑波大学講師	博士(医学)	佐藤藤夫	

## 論文の内容の要旨

### (目的)

人口の高齢化に伴い、腹部大動脈瘤(AAA)は今後増加が予測される。AAAの病態生理として、マクロファージ浸潤を特徴とする慢性炎症およびマクロファージなどが産生する matrix metalloproteinase (MMP) などのマトリクス分解酵素による細胞外マトリクスの破壊、vascular smooth muscle cells (VSMCs) のアポトーシス、正常な細胞外マトリクス産生の抑制が明らかにされており、これらの結果として血管壁は脆弱化して径が拡大し、最終的に致死率の高い破裂に至ると考えられている。今後期待される新しい内科的治療法の効果は瘤径の変化により判定されると思われるが、病態進行の結果である瘤径変化よりも早期に治療効果を判定する手段があれば、病態にあった治療方針を立てることが可能になる。このAAA病態進行を正確に反映するバイオマーカー開発を目指した研究を模索中に、細胞外マトリクスタンパクの一つであるテネイシンC (TN-C) に注目するに至った。TN-Cは創傷、炎症、腫瘍などの病的状態において、炎症性サイトカインや機械的刺激によりVSMCs、fibroblastsなどから一過性に産生される。すでにAAAでの発現亢進が報告されているが、AAAの病態進行に伴い、瘤組織においてどのような発現パターンを示すのかが検討された。

### (対象と方法)

AAA患者の瘤最大拡張部におけるTN-Cおよび活性型MMP-9の発現を、ウエスタンブロットおよびザイモグラフィで測定した。また、AAA手術標本で壁の正常径部から最大拡張部までをストリップ状にとり、Hematoxylin-Eosin (H-E) 染色、Elastica Van Gieson (EVG) 染色、TN-C、CD68、 $\alpha$  Smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA)、MMP-9の免疫染色を行った。

動物実験として、野生型マウスを用いて腹部大動脈周囲に塩化カルシウムを塗布することによりAAAモデルを作製し、3、7、14、28、42、70日後の瘤径とTN-C発現を比較した。また、瘤壁のH-E染色、EVG染色、TN-C免疫染色を行った。また、TN-C遺伝子のalleleに $\beta$  galactosidase ( $\beta$  gal) をコードするLacZ遺伝子をノックインしたTN-Cレポーターマウスを使ってAAAモデルを作製し、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド (X-gal) による $\beta$  gal染色と $\alpha$ SMA免疫染色の二重染色を行った。

## (結果)

AAA 組織における TN-C 発現レベルは亢進していた。また活性型 MMP-9 発現も亢進していたが、両者の発現レベルに明らかな相関はなかった。正常大動脈および AAA の正常径部では炎症細胞浸潤を認めず、中膜エラスチンは保たれ、TN-C 発現はほとんど認めなかったが、正常径部から徐々に径が拡大する瘤の立ち上がりの部分（移行部）では、マクロファージ浸潤と、中膜エラスチン線維の破壊、VSMCs の減少を認め、中膜の TN-C 発現が亢進していた。一方で AAA の最大拡張部では、マクロファージ浸潤を認めるものの、ほとんど VSMCs やエラスチン線維がなく、TN-C の発現もまばらであった。これらのことから、AAA で TN-C は、炎症細胞浸潤とエラスチン等のマトリクス破壊が活発な瘤の移行部に強く発現することが分かった。MMP-9 も同様に移行部で発現亢進していたが、TN-C 発現は主に  $\alpha$  SMA 陽性の VSMCs と重複していたのに対し、MMP-9 発現は主に CD68 陽性のマクロファージと重複しており、明らかに両分子の発現パターンは異なっていた。

マウス AAA モデルでは、塩化カルシウム塗布後 6 週間で動脈瘤形成がおこる。瘤径拡大の進行と TN-C 発現のタイムコースを観察すると、TN-C は、瘤径が急速に拡大しはじめる刺激後 4-6 週に一致して発現が亢進していた。また、刺激後 6 週の瘤組織では炎症細胞浸潤、中膜エラスチンの破壊、変性および、中膜での TN-C 発現を認めた。TN-C レポーターマウスを使った AAA モデルの瘤組織では  $\beta$  gal 陽性細胞は  $\alpha$  SMA 陽性細胞と一致しており、TN-C が VSMCs で産生されることがわかった。

## (考察)

TN-C は患者 AAA およびマウス AAA モデルで炎症細胞浸潤やマトリクス破壊の強い部分に発現し、マウス AAA モデルでは瘤径の拡大に応じて発現レベルが増強することから、その発現が AAA の疾患活動性と相関すると考えられた。一方で TN-C は、同様に炎症細胞浸潤とマトリクス破壊の強い部分で発現する MMP-9 とは明らかに異なった発現パターンを示しており、それぞれの発現亢進は AAA 病態の異なった側面を表していると考えられた。さらに、マウス AAA モデルで TN-C は VSMCs により産生されることから、TN-C 発現は炎症性サイトカイン刺激やマトリクス破壊に伴う血行動態的負荷などの大動脈瘤壁 VSMCs に対する様々なストレスを反映していると考えられた。AAA の病態バイオマーカーという観点からこれらの TN-C の性質を考えると、AAA 組織の基本病態である炎症細胞浸潤とマトリクス破壊の強い部分に一過性に発現し、血中へも分泌されることから、血中バイオマーカーとしても有用である可能性がある。また現在までに報告されている AAA のバイオマーカーとしては炎症細胞が分泌する MMP-9 などのプロテアーゼや炎症性サイトカイン、マトリクス分解産物などがあるが、TN-C はそれらとは異なり VSMCs から分泌されることから、MMP-9 などのバイオマーカーと組み合わせることによって、AAA の病態をより正確に把握することができる可能性があると考えられた。

## (結論)

腹部大動脈瘤で、テネイシン C は瘤の炎症と組織破壊が強い部分に発現する。細胞外マトリクスタンパクであるテネイシン C は血管平滑筋細胞で産生されることから、腹部大動脈瘤の発病機転において血管平滑筋細胞の病的状態が関与している可能性が高いことが分かるとともに、腹部大動脈瘤病態のバイオマーカーとしてこのテネイシン C 測定が有用であることがわかった。さらに、テネイシン C 測定は臨床での腹部大動脈瘤病態の活動度の評価に適応できる可能性もある。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究では、腹部大動脈瘤病態のバイオマーカーとしてテネイシン C 測定が有用であり、腹部大動脈瘤患者のフォローアップに臨床応用できる可能性が示された。

平成 23 年 7 月 8 日、博士（医学）学位論文審査専門委員会において審査委員全員の出席のもとに最終試験を行い、論文について説明をもとめ、関連事項について質疑応答を行った結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。