

論文の内容と要旨

論文題目 腹部大動脈瘤拡張に対する抑制因子の検討 ―血行力学的検討を中心に―

指導教官 名川弘一 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 12 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 保科克行

要旨

目的：腹部大動脈瘤（AAA）に対する全身的な危険因子は、長期のサーベイランスによって明らかになりつつあるも、局所の因子に関しては未だに不明な点が多く、特に腎動脈下大動脈における特有の血行力学的環境は瘤形成に重要である。腎動脈上に比して腎動脈下大動脈の血行動態は、末梢血管抵抗が増大していること、Wall Shear Stress（壁すり応力: WSS）の振動・順行性の減弱などによって特徴付けられており、これらの環境がより動脈硬化性変化および瘤化へと繋がる変性に関与していると考えられている。

近年の臨床報告において、下肢の大切断、慢性脊椎麻痺、下肢末梢血管病変が AAA の危険因子もしくは関与する因子として指摘されており、大動脈の血行動態の変化が潜在的な病因として重要視されてきている。

AAA の特徴的な形態変化として、慢性的な中膜もしくは外膜の炎症、平滑筋細胞（SMC）のアポトーシス、細胞外マトリックスの不整・破壊的リモデリングが挙げられる。慢性炎症による酸化ストレスもしくは Reactive oxygen species（ROS）の瘤への関与は、Matrix

metalloproteinases (MMP) の upregulation・活性化、内因性の抗蛋白分解作用の不活性化、中膜平滑筋細胞のアポトーシス促進などのメカニズムと相まって指摘されている。In-vitro では高い WSS に曝されることで ROS 産生が抑えられ、in-vivo では内皮細胞増殖と migration が刺激されることが報告されている。順行性血流増加の抗アポトーシス、抗酸化作用を腎動脈下大動脈に应用することで、内膜および中膜平滑筋細胞数を維持もしくは改善し、しいては AAA 進展を抑止につながるのではないかと考えたのが本実験の契機の一つである。

エラスターゼ注入ラット AAA モデルに対して外科的手技を加え、腎動脈下大動脈の血流動態を変え、血圧の大きな変動なく WSS および壁運動 (Wall Motion、もしくは Relative wall strain: RWS) を変化させることに成功した。血圧という大きな影響を与える因子を除外したことで、Shear stress と AAA との関係を明らかにする一助となった。この研究では、血流の速い (多い) グループ (high-flow : 高血流) と遅い (少ない) グループ (low-flow : 低血流) での、組織学的・分子細胞学的比較検討が中心である。血行動態の変化に応じて、AAA の細胞密度・構成はどのように変わるのか、細胞増殖因子の発現はどうか、そして AAA は抑制されるのか。以上の観点から、AAA 病変進展への血行力学的影響の機序を検討した。

方法： <ラット AAA モデル> ラット腎動脈下の腹部大動脈を露出し約 1cm の長さを確保した。右大腿深部動脈から PE-10 tube を挿入し、腹部大動脈分岐部付近まで先端を進め、腹腔内より触知確認し絹糸で固定、その 1cm 頭側を絹糸でクランプして同スペースに、30 単位ブタ膵エラスターゼを 2 時間かけてシリンジポンプで持続注入した。 <血行動態改変群>

1) 血流の速い (多い) AAA 群、2) 血流の遅い (少ない) AAA 群の、2 種類の血行動態の異なる群を作製した。前者は左大腿動静脈のシャントをエラスターゼ注入の 7 日前に作製することによってなされ、後者はエラスターゼ注入手技の直後・閉腹前に、左総腸骨動脈を結紮し作製した。 <血行動態の測定・評価> 開腹後に大動脈血圧、血流速 (ml/min)、壁運動をそれぞれ、intraortic pressure transduction、peri-aortic ultrasonic flowmetry、sonomicrometry にて測定

した。計算式は $WSS \text{ (dynes/cm}^2\text{)} = 4\mu BFR / 60\pi r^3$ (μ : 血液粘度の in vivo での定数 0.035、 BFR (Blood Flow Rate) : 血流 (ml/min)、 r : 大動脈横径 (cm))、 $RWS = (D_{max} - D_{min}) / D_{min}$ (D_{max} : 大動脈最大径、 D_{min} : 最小径) で求めた。〈大動脈瘤の細胞構成・増殖・アポトーシスの分析〉 両群において免疫組織学的検索、細胞数比較、細胞増殖およびアポトーシスに関して検討した。内皮細胞に対しては CD31 染色細胞を、中膜平滑筋細胞には α -smooth muscle actin 染色細胞数をカウントし比較した。増殖の評価は BrdU (5-bromodeoxyuridine) 染色細胞核を、アポトーシスは TUNEL (deoxyuridine triphosphate nick end-labeled) 陽性核をカウントして行った。〈血管細胞増殖因子・受容体発現〉 ラット cDNA から VEGF-D (vascular endothelial growth factor) およびその受容体、PDGF- β (Platelet-derived growth factor) のプライマーをデザインし、RT-PCR (real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction) を行った。〈蛋白分解活性(Gelatinase activity)〉 両群の蛋白分解活性 (MMP-2 および -9) を見るために substrate gel zymography を行った。

結果：シャント作製によって正常大動脈内に比較して WSS は約 300%、RWS は約 150% の増加をみた。腸骨動脈結紮によって WSS のみ 60% と減少を認めた。どちらの手技においても収縮・拡張期血圧の変化を認めなかった。エラストラーゼ注入後 7 日目で、low-flow (結紮) 群 AAA の瘤径 (6.5 ± 1.5 mm) は high-flow (シャント) 群 AAA (3.2 ± 0.4 mm) に比して有意に大きかった ($p < 0.01$)。high-flow 群ではより多くの内皮細胞・平滑筋細胞、細胞増殖を認め、アポトーシスは low-flow 群でより多く認められた【表】。

また、VEGF とその受容体、および PDGF- β の mRNA レベルでの発現が high-flow 群 AAA でより多く認められた。Zymography では両群に MMP-2 活性の差は認めなかったが、high-flow 群で MMP-9 活性がより多く認められた。

【表：大動脈内血流状態の差異による AAA の細胞構築変化】

	Low-flow AAA	High-flow AAA
Endothelial cells	110±39	130±30*
Smooth muscle cells (SMCs)	35±11	68±17*
BrdU (+) SMC	110.0±13.5	212.2±9.8*
TUNEL (+) SMC	23.0±1.7	4.2±1.1*

(* p<0.05)

結論・考察：エラストラーゼ注入モデルにおいて WSS（もしくは RWS）は、AAA の内皮細胞・平滑筋細胞増殖を刺激し、その細胞構築を維持し瘤抑制に働くことが示された。MMP 活性の増加にもかかわらず、血流増加負荷のかかった AAA では瘤径拡張が有意に抑制されたことは、血行動態の AAA に果たす役割の大きさを示唆している。細胞増殖、血流増加それぞれの関与の程度を明らかにするために、electroporation による大動脈壁に対する直接の bFGF（basic fibroblast growth factor）導入実験を本実験系で行ったところ、同様に瘤は抑制された。この系では、内皮細胞数に有意差は認めず、平滑筋細胞数および BrdU 染色細胞数の増加が認められ、瘤抑制に対する防御作用に平滑筋細胞がより多く関与していることが示唆された。しかし、現実的には本実験系のように直接遺伝子導入することは困難であり、Photosensitizer のような非侵襲的な delivery system も現時点ではまだ十分に optimize されていない。また、血行動態の果たす壁リモデリング作用とその抑止効果に関しては未だ明らかではなく、最も簡易かつ有効な手段である下肢の運動による血行動態改変の果たす役割はまだ大きいものといえる。初期段階の AAA 拡張を抑えるために下肢の運動療法をより厳密にデザインし実施していくことが勧められる。