課題番号	23 独先 14

【様式 5 独創的・先駆的研究】

学術研究助成金〔独創的・先駆的研究〕
実　績　報　告　書

令和　6 年　4 月　24 日

氏　　名：　　羽尾　裕之
所属・資格：　医　　学部・　　教授
実施研究所：　医　　学部・総合医学研究所

1　研究課題

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

2　研究期間

令和　5 年度　～　令和　6 年度

※令和　　年度　～　令和　　年度（※特例措置により上記期間を変更している場合記入すること）

3　研究組織

研究代表者及び研究分担者

	氏　　名	部科校・資格	役割分担
研究代表者	羽尾　裕之	医学部・教授	研究の統括・論文執筆
研究分担者	大前　佑斗	生産工学部・専任講師	人工知能診断技術の開発

連携組織

組　織　名	役　割　分　担
東京監察医務院	大動脈疾患症例の検体提供

※**ホームページ等での公開（☑可・□否）**いずれかをチェックしてください。
否の場合は，理由書を別途添付のこと。

課題番号	23 独先 14

4　現在までの達成度

当初の研究目的に対する達成度について研究期間全体を 100%として，以下の区分より自己評価を行ってください。
＜区分＞①当初の計画以上に進展している。②概ね順調に進展している。③やや遅れている。

【区分：　②　】・【達成度：　60　%】

5　研究目的

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。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。

6　研究概要

本研究は、動物モデルおよびヒト血液検体や大動脈壁組織を用いて、急性大動脈症候群（大動脈瘤破裂、大動脈解離）の病態解明を行う。さらに生産工学部・理工学部と共同で、人工知能を用いて発症前の早期診断可能なプログラムを開発し、発症予測を可能とする新規バイオマーカーを検討するものである。急性大動脈症候群は進行性の致死的な大動脈疾患であり、大動脈の破綻を来して突然死に至る。救命処置にもかかわらず社会復帰できる割合は非常に低い。大動脈瘤、大動脈解離については、診断・治療の確立のみならず、早期発見・発症予測・予防的介入を確立することが循環器領域において喫緊の課題である。

急性大動脈症候群の病態は、かつて考えられていた加齢・高血圧・脂質異常症・糖尿病・喫煙などに伴う動脈硬化性変化よりも、血管壁の中層に位置する最も厚く壁の強度を保持する役割である中膜の変性が重要であるとの考え方が提唱されている。中膜の変性を来す代表的な遺伝性疾患が Marfan 症候群（MFS）で、fibrillin 1 遺伝子（*FBN1*）に変異を持つ結合組織病である。MFS は特徴的な病理所見である高度の嚢状中膜壊死を生じ、中膜変性や支持組織である弾性線維の断裂や破壊が惹起され、大動脈瘤や大動脈解離を発症する。MFS の家族歴が明らかな場合には、未発症の同胞に早期のスクリーニングと大動脈疾患発症前の介入がすでに行われている。しかし、これらの遺伝性疾患は急性大動脈症候群の約 10%程度を占めるのみで、既知の遺伝子異常を伴わない急性大動脈症候群が患者の大部分を占めている。非遺伝性の急性大動脈症候群の大動脈壁には MFS と似た中膜変性が生じる症例があることが明らかになり、これらの知見とともに大動脈疾患の予測が可能なバイオマーカーの検索・解析が行われてきた。その中で、血管

平滑筋血管細胞（VSMC）に由来するマーカーとして、myosin heavy chain、creatine kinase BB 型アイソザイム（CK-BB）、calponin などが検討され、血液学的側面からは D-dimer、paraoxonase 3、myeloperoxidase、thrombospondin 1 などが、細胞外基質（extracellular matrix: ECM）の側面からは、Transforming growth factor（TGF）-β、可溶性 elastin 断片、elastin 架橋アミノ酸である desmosine などが検討されてきた。中膜石灰化の側面からは、微細石灰化中の hydroxyapatite を定量化できる 18-F NaF などが検討されている。その他、中膜 ECM 変性の原因となる matrix metalloproteinase（MMP）-2、-9 が報告されてきたが、この MMPs については活性を抑制する新規薬剤についても検討されている。しかし、現行ではいずれのマーカー候補も、大動脈疾患の診断確定に用いられることはない。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（Yagi H et al. 2020, Scientific Reports）、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。

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本症候群の早期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。

7　研究結果（4,000 字以上記入のこと）

(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*-/-× *SmtnB* -/-）にアンギオテンシン Ⅱ を持続投与し、大動脈瘤の発生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。

大動脈瘤発生率については、*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 Alician-blue 染色については、*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(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。今後、それぞれのグループにおける mRNA の発現を比較して、大動脈発生率が異なった原因について究明する予定である。

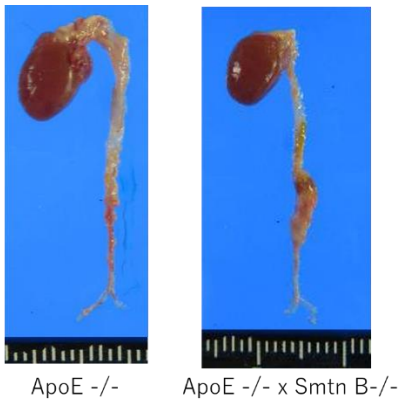


図 1. ApoE-/-マウスと ApoE-/- × Smtn-/-マウスの大動脈

②ラットを用いた大動脈解離モデルの作成

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、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きたしていることがわかった（図 2)。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。

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。

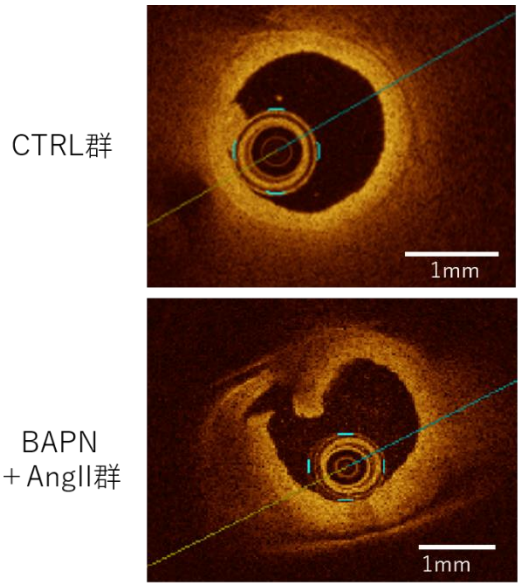


図 2. コントロール群と BAPN＋AngII 群の大動脈壁に対する OCT 画像

(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 filaminA 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 3)。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、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、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。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。

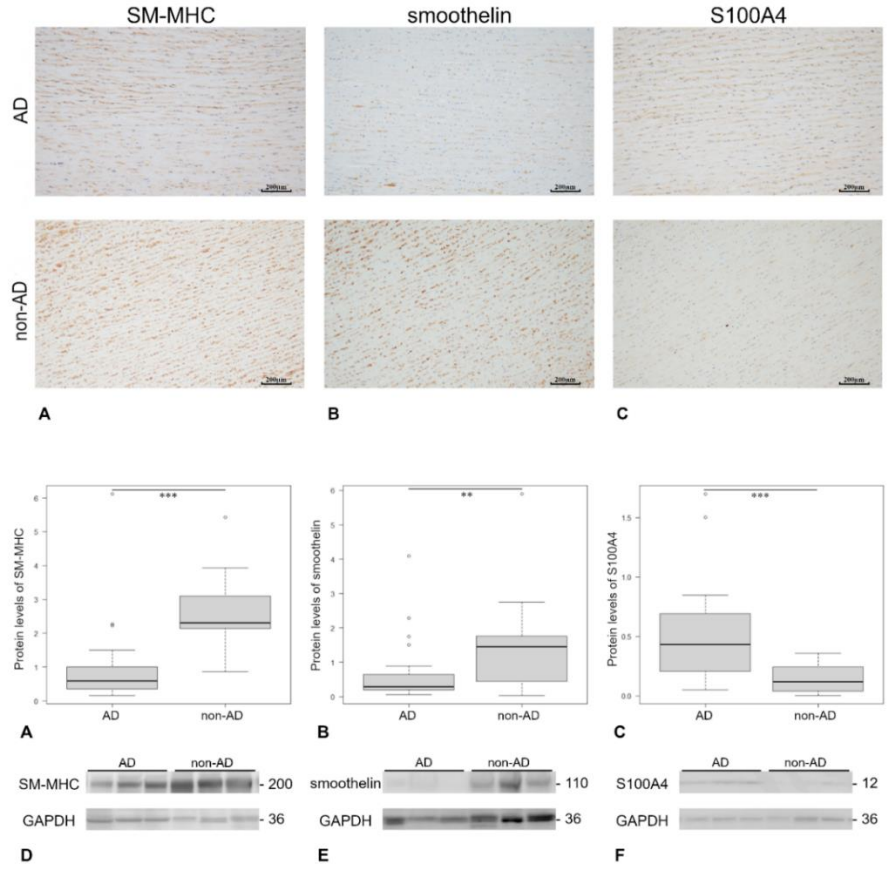


図 3. ヒト大動脈における血管平滑筋細胞の表現型マーカーの免疫組織化学と蛋白分析

(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、理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。