

氏名	岡村 譽
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	乙第 696号
学位授与年月日	平成 27年 2月 23日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第4条第3項該当
学位論文名	マルファン症候群動脈瘤モデルマウスにおける MRI による大動脈壁内エラスチンの定量化に関する研究
論文審査委員	(委員長) 教授 杉本 英治 (委員) 教授 福嶋 敬宜 准教授 齋藤 力

論文内容の要旨

1 研究目的

マルファン症候群は常染色体優性遺伝による全身の結合織疾患であり、眼・筋骨格系・心臓大血管系に異常を認める。大動脈解離と動脈瘤破裂がマルファン症候群患者の主な死因で、予後を規定している。大動脈壁にはエラスチンと呼ばれる繊維状のタンパク質が多く含まれており、組織に弾性を与えている。マルファン症候群患者の大動脈瘤においてエラスチンの生成低下と分解亢進が指摘されているが、組織学的診断は検体の摘出を必要とし、画像診断による大動脈壁内のエラスチンの評価に関する報告は今までされていない。エラスチン特異的造影剤を用いた MRI にて非侵襲的に大動脈瘤壁内のエラスチンを定量化し、新たな診断補助法の確立を目指す。

2 研究方法

マルファン症候群マウスと野生株マウスを使用する。両マウスにおける上行大動脈壁におけるエラスチンの性状・量について組織学的に解析するとともに、エラスチン特異的な造影剤を用いた MRI で大動脈瘤内のエラスチンを定量化し、マルファン症候群マウスと野生株マウスとで比較する。

3 研究成果

これまで申請者は、野生株マウスと比べてマルファン症候群マウスでは上行大動脈壁内のエラスチン量が減少していることを、組織学的に診断するとともにエラスチン特異的な造影剤を使用した MRI にて大動脈壁内のエラスチンを定量化して示した。また、MRI 撮影後の大動脈を摘出し、大動脈壁内に取り込まれた造影剤量を直接測定することで、MRI での定量化の値と大動脈壁内の造影剤の量に相関関係があることを確認した。

4 考察

大動脈瘤形成・進展に関与しているされるエラスチンの減少を、非侵襲的に画像診断で定量化する方法についてこれまでのところ報告がない。今後は大動脈壁内のエラスチン量と動脈瘤の進展との関連性や、薬物治療による動脈瘤抑制効果を MRI で評価することなども含め、より多角的

にかつ詳細に解析していく予定である。

5 結論

本研究ではエラスチン特異的造影剤を用いた MRI にて、(1)MRI で非侵襲的に大動脈壁内のエラスチンを定量化できること、(2)マルファン症候群マウスの上行大動脈瘤において野生株マウスと比べて大動脈壁内のエラスチンが減少していること、を非侵襲的に診断することが可能であることを示した。今後、同手法が大動脈瘤の形成・進展の予測や薬物療法の治療効果の評価などにも有効である可能性が示唆され、また動脈瘤以外にも様々な血管疾患の診断補助に役立つ可能性がある。

審査の結果の要旨

マルファン症候群は常染色体優性遺伝の形式をとる全身の結合織疾患で、エラスチンの形成異常や分解亢進と大動脈瘤・肺気腫などの疾患の発症及び病態の形成との関連性が示唆されている。マルファン症候群の大動脈瘤では組織学的にエラスチンの生成低下と分解の亢進が認められるが、組織診断は検体採取を必要とし、非侵襲的な画像検査での大動脈壁の評価は困難とされている。岡村氏は、エラスチン特異的な MRI 造影剤 ESMA を使用し、MRI により非侵襲的にマルファン症候群マウス (Fbn1C1039G/+マルファン症候群マウス) の大動脈瘤壁内のエラスチンの定量化が行えることを示した。

研究では、ESMA を静注後に MRI で上行大動脈を撮影し、T1 mapping 法にて大動脈壁内の緩和度 (R1 値) を測定することでエラスチンを定量化し、マルファン症候群マウスの上行大動脈では野生株マウスと比べ、有意に血管壁内のエラスチン量が低下 (R1 値の低下) していることを明らかにした。さらに、MRI 撮影後に大動脈を摘出し、血管壁内ガドリニウム量を直接測定したところ、MRI で測定した R1 値と血管壁内ガドリニウム量の間に関連関係があることを証明した。本研究結果は、同手法が将来的に非侵襲的に大動脈瘤の破裂リスクおよび治療効果判定等に適応できる可能性を示唆するものである。

主要論文には多くの異なる領域の専門家がかかわっていたが、岡村氏は、当研究において、自らが主導した実験について、論文中に詳述した。すなわち、氏は、この実験において、大動脈径の計測、大動脈の摘出、エラスチンカーボンゲージン染色、大動脈壁エラスチンの蛍光顕微鏡での撮影、MRI によるマウス大動脈の撮影、造影剤の静注、R1 値の計測、ICP-MS によるガドリニウム量測定のための検体の処理、論文作成・投稿・修正を行ったことを明確にした。試問において、氏は本研究に関わるすべての点について、明確に回答し、論文に記載されている以上の知識と経験、この手法についての将来展望をもっていることが明らかとなった。

試問での質疑応答をもとに、論文は修正、加筆された。よって、論文は審査委員全員により合格と判定された。

試問の結果の要旨

試問は、主に Marfan 症候群のモデルマウス (Fbn1 マウス) と人の Marfan 症候群の間に臨床病理学的な差異について、および、大動脈壁のエラスチン定量化に使われた撮像に用いられた MRI の技術的な面について行われた。

まず、人の Marfan 症候群では、動脈の部位によって拡張の度合いが異なるように見えるが、人とマウス (Fbn1 マウス) の大動脈病変は同じなのか。違うとすればどこが違うのか質疑があった。また、人では Valsalva 洞の拡張が最も問題となるが、マウスで上行大動脈をエラスチン定量化の部位として選んだ理由はなにか、と質問があった。

岡村氏は、マルファン症候群のヒトとマウス (Fbn1 マウス) では大動脈の拡大部位は完全には一致しないこと、ヒトでは Valsalva 洞の拡大を最初に認めるのに対して、Fbn1 マルファン症候群マウスモデルでは Valsalva 洞から上行大動脈にかけて全体的に拡大を認めると回答した。また、Valsalva 洞は心臓に接しているため motion artifact が極めて強く、心拍数が 400 回前後/分のマウスにおいて MRI で評価するのは困難である。以上の 2 点から、上行大動脈での撮影が現実的に可能と判断したと回答して審査員の納得が得られた。

次に、提示された画像では、野生株のマウスと Fbn1 マウスの大動脈の大きさ、径が異なるように見えるが、おなじサイズの個体なのかとの質問があった。

氏は、実験では 32 週齢で体重がほぼ同じマウス同士を使用したと回答した上で、大動脈摘出前に用手的に左室から 3%アガロースを注入して、固まったアガロースによって大動脈が拡張して形態が固定されるようにしたため、アガロース注入時の圧によって Fbn1 マウスでは大動脈が長軸方向にも拡張していた可能性があるとして回答した。

Fbn1 マウスの大動脈病理所見ではエラスチンが減少していたことを示しているが、エラスチンを示す線状構造の数 (何本あるか) は同じに見える。エラスチンは減っていないのではないかと、との指摘があった。また、Fbn1 マウスの大動脈病変は上行大動脈だけなのか。あるいは、動脈の部位によって差異があるのか、との質問があった。

これに対して、氏は、Fbn1 マウスの上行大動脈壁において、エラスチンの線状構造の数の減少は認められないことを認めた上で、以下のように回答した。文献検索した限りでは、大動脈瘤壁と正常大動脈壁におけるエラスチン量を定量・比較した報告は認められない。ただ、Fbn1 マウスでは明らかなエラスチン線維の断裂を多く認め、EVG 染色においてエラスチン線維の菲薄化が認められたため、Fbn1 マウスではエラスチン線維が破壊・変性しておりエラスチン量が減少していると説明した。また、Fbn1 マウス以外の箇所の大動脈 (下行大動脈と腹部大動脈) には 32 週齢マウスにおいて少なくとも瘤化は認められず、下行大動脈と腹部大動脈の組織切片の EVG 染色も行ったが、上行大動脈のようなエラスチンの断裂像は認められなかったと回答して審査員の納得が得られた。

MRI の撮像における技術的問題について質疑は、mCine-IR 法とエラスチン特異性造影剤 (ESMA) の薬理について質疑があった。

まず、mCine-IR は、心臓 MRI で使用している Look-Locker と同一のシーケンスなのか、また大動脈壁の造影効果は、心筋梗塞の MRI で使われる遅延造影と同じアイデアなのか、との質問があった。

氏は、これに対して、mCine-IR は、Cardiac-gated Look-Locker と同一のシーケンスであると回答した上で、mCine-IR における氏の工夫点についてのべた。まず、T1 mapping のための mCine-IR 画像における大動脈壁の同定について工夫を要したことを以下のように解説した。mCine-IR 画像の解像度はそれほど高くなく、大動脈の内腔と壁との境界をはっきりと認識するのは困難である。そこでより解像度の高い FSPGR 画像を mCine-IR に fusion（画像の重ね合わせ）することで血管内腔を同定した。ただし、心拍によって上行大動脈が前後する。fusion の精度を高めるために心電図同期させ、FSPGR と mCine-IR とともに心臓拡張期の同じタイミング部になるようにして撮影し、motion artifact の影響を除いた。また、造影効果測定のための関心領域 (ROI) の設定では、上記の合成画像を用いて、mCine-IR 上の大動脈壁にあたる箇所（血管内腔の外側）に 2 pixel の厚みに統一した ROI を視覚的に設定し、大動脈壁とした、と説明した。

次に、ESMA の対象として非特異的造影剤のガドリニウム DTPA (Gd-DTPA : マグネビスト) を使用しているが、野生株と Fnb1 の動脈壁はほぼ同じ程度造影されているように見える（同程度の R1 値）。すなわち、動脈壁は正常でもよくエンハンスされるのかどうか、質疑があった。これに対して、氏は、正常径のマウス腹部大動脈の造影前と造影後を比較すると造影効果が認められることから、正常大動脈壁においても Gd-DTPA が取り込まれていると考えられると回答した。一方、マウスの正常大動脈では Gd-DTPA の取り込みがみられなかったとの報告もあることも付け加えた (Amirbekian V et al. Detecting and assessing macrophages in vivo to evaluate atherosclerosis noninvasively using molecular MRI. PNAS 2007;104:961-966)。氏によれば、Gd-DTPA 静注後に大動脈壁への有意な取り込みが認められるかに関しては、さらに十分な n 数での検討が必要と思われるとの回答であった。

視覚的には、ESMA の画像コントラストはガドリニウム量に変化してもそれほど変化していない、という指摘があった。また、ESMA による造影効果を MRI の信号強度で表すのではなく、緩和度で表現した理由について質問があった。これに対して、氏は大動脈壁に取り込まれた ESMA 量が少ないために視覚的なはっきりした違いを認めるのは困難であり、R1 値を測定することで視覚では捉えられない結合型 ESMA の緩和度を示した、と回答した。

最後に、ESMA の分子構造、特にエラスチンに特異的に結合するポイントについて、また毒性や代謝経路など、また将来の臨床応用への可能性、今後の展望について質疑があった。

氏は、ESMA のエラスチンに特異的に結合する箇所は Gd-DOTA 以外の左の側鎖であるが、より詳細な結合部位について検索した限りでは言及している文献は認められないとした。また、現在のところ、大動脈壁内のエラスチン線維の変性の程度を確認する方法は、実際に検体を採取し組織学的に評価する以外に方法はない。将来本研究で開発された手法を用いることにより、非侵襲的に MRI による大動脈壁内エラスチンの定量を行える可能性があるかと回答した。また、エラスチンと大動脈瘤形成・進展の機序についてさらなる研究が求められるが、大動脈壁内のエラスチンを定量化することで瘤化の可能性を予測し、動脈瘤における破裂のリスクを推測することが期待されるとの認識を示した。さらに、現在薬物療法における動脈瘤の進展予防の可能性が報告されているが、経時的に MRI で大動脈内エラスチンを定量化することで、薬物による治療効果判定にも活用できると思われると回答した。ESMA の薬理作用については、マウスにおいて ESMA は腎代謝であることが示されているが、毒性について研究された報告は現在認めていない。しかし、臨床応用には、ESMA 投与後の予後のフォローアップ、血液学的所見、各臓器の組織学的評

価などを行う必要がある、と説明した。

岡村氏は、自らの研究の意義と限界についてよく認識しており、試問で問題になった点について、詳細な解説を加え、指摘された問題点について丁寧に真摯に回答した。よって、委員全員により、試問は合格と判定された。