

## 論文の内容の要旨

論文題目 腹部大動脈瘤開腹手術への応用を目的とした蛍光ペプチダーゼプローブライブラリーを用いた正常血管の客観的評価方法

氏名 瀬尾 明彦

### 【研究の目的】

血管外科手術に際し手術対象の血管壁の性状を適切に評価することは重要である。術前検査の一環であるヨード造影剤を用いた computed tomography (CT) をはじめとする画像診断の進歩は著しいが、手術の際の血管壁の性状の評価は最終的には術中肉眼所見と術者の経験に基づいているのが現状である。腹部大動脈瘤の開腹手術においても瘤切除後に人工血管吻合部位をいかに選択するかは術者の主観的経験により決定されている。これは吻合部血管（非拡張部動脈）の性状に対する客観性を担保する物質や方法が存在しないためである。生体内における血管性状を客観的に分析評価可能となれば、より安全確実な手術が施行となり、手術合併症軽減などに貢献する可能性がある。我々の目的は、臨床から得られた腹部大動脈瘤患者の標本を hydroxymethyl rhodamine green (HMRG) を基本骨格とした蛍光プローブライブラリーに網羅的に適用し、吻合部の血管性状が評価できるプローブを見つけ出す事である。また吻合部動脈（非拡張部動脈）に反応したプローブのターゲット酵素を明らかにし、ターゲット酵素の標本内での局在も同定すれば血管性状を生化学的及び病理学的にも客観性がある評価方法を確立することが出来ると考えて基礎的検討も施行した。

### 腹部大動脈瘤手術における蛍光プローブライブラリーを用いたスクリーニング

#### 【背景と目的】

腹部大動脈瘤の唯一の治療方法は手術加療となる。径 50~55 mm以上の破裂リスクが高い腹部大動脈瘤で手術加療を行う事になり、開腹による人工血管置換術、あるいはステントグラフト内挿術が考慮される。開腹による人工血管置換術は歴史的背景と共に現在でも腹部大動脈瘤の標準術式である。その理由として開腹手術は長期成績が安定し、一度周術期を乗り切る事が出来れば、長期的には大きな合併症の心配が少ないからである。しかしながら、手術侵襲が大きく耐術不可能な症例が存在する事が欠点である。一方でステントグラフト内挿術は低侵襲である為、急性期及び中期における合併症のリスクは開腹手術よりも低く、短期における動脈瘤関連死が少ない事が報告されている。その為、開腹手術が出来ないハイリスク群の術式としてステントグラフト内挿術は近年増加傾向にあった。しかしながら、ステントグラフト内挿術の問題点として術後の再血管治療 (re-intervention) が開腹手術よりも明らかに多く、長期成績 (8年目以降) での瘤関連死は開腹手術よりも劣る成績である事が明らかになり、開腹手術の重要性が再確認されるよう

になった。開腹手術の成績をより向上させる為には、術中の脆弱な組織に対する吻合による解離の発症予防や出血量の抑制や遠隔期吻合部動脈瘤の軽減などが考えられる。その為には人工血管の吻合部血管を客観的に評価する方法を確立する事が望まれる。この実験系では 383 種類の蛍光プローブからなる蛍光プローブライブラリーを網羅的に吻合部動脈（非拡張部動脈）へ適応し、非拡張部動脈と反応する蛍光プローブを絞り込むことを目的とした。

#### 【実験方法と結果】

スクリーニングの実験方法として 3 段階に分けて行った。1 段階目として非拡張壁の内膜層をホモジナイズすることで上清を採取（lysate 化）、383 種類のプローベと反応させ、蛍光強度変化を指標として 20 種類の HMRG プローベを候補として絞り込んだ。2 段階目としてマイクロパターニングデバイスである 25 ポイントスタンプを使用して作ったオブラートをを用いて候補である 20 種類のプローベを非拡張壁標本の内腔側より適用し(ex vivo)、蛍光顕微鏡(Maestro®)により評価して更に 3 種類のプローベに絞り込んだ。3 段階目として、実際の臨床応用を考えて瘤壁及び非拡張部位に対して、絞り込んだ 3 種類のプローベを Tetra-PEG gel による蛍光プローブ浸漬ゲルにしてから血管壁内腔側より適応し、蛍光顕微鏡で評価した。蛍光強度を経時的に調べ、各時間での感度/特異度も検討した。Methionine-HMRG (Met-HMRG) が蛍光強度及び感度/特異度において最も優れていた。

#### 【考察】

Lysate による実験は 1 度に多数の蛍光プローブをスクリーニングに適する。Lysate 化した標本による実験結果は蛍光プローブのターゲット酵素が混和されているが、実際の蛍光プローブのアプリケーションとして解剖学的な局在が重視されうる。この問題を解決するためにマイクロパターニングデバイスが有用である。マイクロパターニングデバイスは多くの蛍光プローブを小さな標本に適応でき、解剖学的特徴（ターゲット酵素の局在）を保持したまま同一の標本内で多くの蛍光プローブをスクリーニングすることが可能となる。そしてマイクロパターニングデバイスで絞り込んだ少数の蛍光プローブを標本に実臨床を想定して適応し、効率的に経時的な蛍光強度の変化や各時間での感度/特異度を検討することが出来た。この一連のスクリーニング手法は、血管疾患のみならず、他の臓器評価にも適応可能な普遍性のあるスクリーニング方法であると考えられた。また非拡張部動脈を評価する蛍光プローブとして Methionine-HMRG (Met-HMRG) が最も有用であることが示唆された。

#### Methionine hydroxymethyl rhodamine green のターゲット酵素

#### 【背景と目的】

実際の臨床応用のためには、蛍光プローブの反応性のみならず、反応を裏打ちするメカニズムを明らかにしておくことが望ましい。本研究においても in vivo へのアプリケーションの前にプローブと反応するアミノペプチダーゼ（ターゲット酵素）を明らかにすべきと考えられた。前実験で 383 種類の蛍光プローブの中で Met-HMRG が大動脈瘤壁よりも非

拡張部動脈壁の内膜側に特異的に蛍光反応する事が分かった。この実験系では Met-HMRG のターゲット酵素とターゲット酵素の標本内での局在を同定することを目的とした。

#### 【実験方法と結果】

最初に HMRG プローベのターゲット酵素を調べる目的に Diced Electrophoresis Gel 法 (DEG 法) を施行した。これは非拡張部動脈内膜側のみの lysate 化標本に対して非変性 2 方向電気泳動を行い、電気泳動で得たゲルと Met-HMRG と反応させ、蛍光反応を確認した箇所からたんぱく質を分離した後に質量分析を行う方法である。質量分析の結果として、Puromycin sensitive aminopeptidase と Bleomycin hydrolase がターゲット酵素の候補として挙げられた。次に DEG 法で挙げられたターゲット酵素である Puromycin sensitive aminopeptidase と Bleomycin hydrolase の酵素反応阻害剤 (インヒビター) を使用して Lysate 化標本 (非拡張部動脈と瘤壁) と Met-HMRG の蛍光反応が阻害されるかを確認した。具体的には Puromycin と Bleomycin を使用しているが、共に Met-HMRG の蛍光反応を濃度依存性に阻害する事が明らかになった。最後に western blotting 法及び免疫染色法で標本内に発現している事と局在を確認した。非拡張部動脈壁内膜側 Lysate を用いた western blotting 法の結果は、非拡張部動脈壁内膜側 lysate では Puromycin sensitive aminopeptidase 及び Bleomycin hydrolase の発現を認め、activity に関しても両者の発現と関係していると考えられた。免疫染色法では Bleomycin hydrolase は、非拡張部動脈壁及び腹部大動脈瘤壁の両標本で発現を確認する事が出来なかったが、Puromycin sensitive aminopeptidase では非拡張部大動脈壁標本の内膜で限局的に発現している事が明らかになった。

#### 【考察】

ターゲット酵素である Puromycin sensitive aminopeptidase は、ヒトでは NPEPPS 遺伝子によってコードされており、局在としては細胞質と細胞膜の両方に存在し、全身の組織に発現している。生理学的な役割として、細胞周期の調節やプロテオソーム産物のアミノ酸を分解することが知られている。また Bleomycin hydrolase は、BLMH 遺伝子によってコードされる酵素である。局在は最も強い発現を皮膚で認めるが、こちらも全身の組織に存在している。諸報告から表皮の天然保湿因子であるアミノ酸の生成経路で鍵酵素として Bleomycin hydrolase が機能しており、アトピー性皮膚炎や尋常性魚鱗癬の症例において正常の皮膚を判断する指標としても有用であることがわかっている。このようにターゲット酵素として挙げられた酵素は両者ともに細胞の恒常性を保持する為に必要な存在であり、今回の非拡張動脈壁を評価する酵素として妥当な結果と考えられた。

#### 【結果】

Puromycin sensitive aminopeptidase 及び Bleomycin hydrolase 検出用蛍光ペプチダーゼプローブである Met-HMRG は腹部大動脈瘤の開腹手術において吻合部動脈 (非拡張部動脈) の血管性状を評価する際に有用性が示唆された。