

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03957

研究課題名（和文）大動脈瘤病態形成の分子機序解明 突然死の予知・予防を目指して

研究課題名（英文）Prevention of CaCl<sub>2</sub>-induced aortic inflammation and subsequent aneurysm formation by the CCL3&#8211;CCR5 axis

研究代表者

石田 裕子 (Ishida, Yuko)

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10364077

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：われわれは、腹部大動脈にCaCl<sub>2</sub>を塗布すると、大動脈内にマクロファージが浸潤し、CCL3およびMMP-9の発現が亢進し、腹部大動脈瘤が誘導されることを見出した。Ccl3<sup>-/-</sup>およびCcr5<sup>-/-</sup>マウスの両者は、マクロファージ浸潤とMMP-9発現の増大を伴うCaCl<sub>2</sub>誘発腹部大動脈瘤を増悪させた。CCL3の中和は、CaCl<sub>2</sub>処理したCcl3<sup>-/-</sup>マウスと同様の表現型を示した。逆に、CCL3投与は野生型マウスとCcl3<sup>-/-</sup>マウスの両方でCaCl<sub>2</sub>誘発腹部大動脈瘤を減弱させた。従って、CCL3はMMP-9の発現を抑制することにより、CaCl<sub>2</sub>誘発腹部大動脈瘤発症を予防するのに効果を発揮しうる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の実験的研究は、CCL3-CCR5経路がAAA形成において保護的な役割を果たしていることを示している。白人のかなりの割合がヒトCCR5遺伝子に 32と呼ばれる32塩基対の欠失対立遺伝子を有しており、CCR5 32変異を持つホモ接合体は、Ccr5<sup>-/-</sup>マウスと同様に機能的なCCR5タンパク質を発現しない。CCR5 32変異はAAAの発症率を増加させたが、これはCaCl<sub>2</sub>-あるいはAngiotensin IIで処理したCcr5<sup>-/-</sup>マウスにおける我々の観察と一致していた。したがって、動脈瘤に対するCCL3の治療活性を検討することは妥当である。

研究成果の概要（英文）：We report that CaCl<sub>2</sub> application into abdominal aorta induces abdominal aortic aneurysm (AAA) with intra-aortic infiltration of macrophages as well as enhanced expression of CCL3 and MMP-9. Moreover, infiltrating macrophages express CCR5 and MMP-9. Both Ccl3<sup>-/-</sup> mice and Ccr5<sup>-/-</sup> but not Ccr1<sup>-/-</sup> mice exhibit exaggerated CaCl<sub>2</sub>-induced AAA with augmented macrophage infiltration and MMP-9 expression. Immunoneutralization of CCL3 mimics the phenotypes observed in CaCl<sub>2</sub>-treated Ccl3<sup>-/-</sup> mice. On the contrary, CCL3 treatment attenuates CaCl<sub>2</sub>-induced AAA in both wild-type and Ccl3<sup>-/-</sup> mice. Consistently, we find that the CCL3-CCR5 axis suppresses PMA-induced enhancement of MMP-9 expression in macrophages. Thus, CCL3 can be effective to prevent the development of CaCl<sub>2</sub>-induced AAA by suppressing MMP-9 expression.

研究分野：実験病理学

キーワード：大動脈瘤 突然死

### 1. 研究開始当初の背景

突然死は本邦では年間5万人を超え、久山町での疫学調査からその10%以上が大動脈瘤破裂・解離性大動脈瘤によると推定されている。大動脈瘤では、動脈壁の広範囲の炎症と細胞外マトリックスの断片化が病理学的に認められることから、血管構成細胞と炎症生細胞とのクロストークのもとでの結合組織の異常再構築が、動脈瘤成立に密接に関与していると想定されているが、十分な病態生理学的解析がなされていない。

法医学の使命は死因を医学的に正確に究明し、死亡者の周囲で発生する種々の社会的問題を解決することである。さらに死因の究明にとどまらず、死因に関与する疾患の予知・予防ならびに治療法開発のための情報を提供することも、これからの法医学が担う新たな使命であると考えられる。しかし、現在法医学を発信源として他分野へ貢献できるような研究成果は、国内外を問わずほとんど認められない。

法医実務において、死因判定は最も重要な実務の一つであり、その際、客観性及び正確性が求められる。しかし、死因判定は解剖における肉眼的所見、病理組織所見を中心とした限られた検査所見に基づいて行われているのが現状である。一方、同じ応用医学に分類される種々の臨床医学分野においては、診断精度の向上のために遺伝子診断や新規の診断マーカーの発見などの最新の知見、技術が導入されている。法医学は臨床医学と同様に実務的な応用医学であり、常に最先端の基礎研究の知見が応用されなければならない。

### 2. 研究の目的

申請者は、皮膚損傷治癒や肺線維症の病態生理の細胞・分子レベルでの解析に長年従事してきた。大動脈瘤形成時と同様に、皮膚損傷治癒や肺線維症の病態においても、損傷後に起きる炎症反応と細胞外マトリックスの断片化が起き、治癒の遷延と異常な組織再構築が認められることを見出した。さらに、ケモカインなどの炎症性サイトカインを介する組織常在細胞と炎症細胞とのクロストークが、異常な組織再構築に関与していることも見出した。これらの成果に基づき、皮膚損傷治癒や肺線維症の病態と大動脈瘤形成過程で共通する細胞・分子機構、なかでも正常細胞と炎症細胞のクロストークの大動脈瘤成立過程への関与を想定するに至った。

炎症性サイトカインの幾つかについては、大動脈瘤発症への関与を示唆する結果が報告されている。しかし、炎症細胞の浸潤・活性化に密接に関与していると考えられているケモカインに関する報告はほとんどない。したがって、特にケモカインに焦点を当てて、時空間的に包括的に大動脈瘤発生過程の解析を行う本研究計画には高い独自性があると考えられる。申請者の所属する法医学教室では年間約250件にもおよぶ法医解剖を実施しており、その中で未破裂・破裂を問わず数多くの大動脈瘤事例に遭遇している。このため、ヒトの大動脈瘤サンプルを多数収集することが可能である。したがって、動物実験から得られた知見を、ヒト試料を用いた解析に直結できるという創造性が、本研究計画にはある。マウスモデルにおける *in vivo* での所見と、ヒト剖検試料を用いた解析によって、より有効性の高い法医診断学につながるものと考えられる。また、動脈瘤成立の細胞・分子機構の解明は、動脈瘤を起因とする突然死の新たな予防・治療戦略の開発に繋がる創造性をも有する。

### 3. 研究の方法

動脈瘤の病態には免疫系の過剰な活性化が深く関与していることが明らかにされつつあり、その仕組みを理解することで、新たな診断法や治療法の創出に繋がることが期待される。本研究は、ケモカインシステムが動脈瘤に起因する突然死判定の新しい指標となる可能性を検証するものであり、基礎的研究と実務的研究を組み合わせた包括的研究である。基礎的研究では、マウスモデルを用いて病変部を採取し、病態形成過程で発現が亢進するケモカイン及びケモカイン受容体を免疫組織化学的及び分子生物学的に検出してその発現様態を明らかにし、さらにその生物学的機能を解析する。これらの基礎的研究結果に基づいて、実務的研究では法医剖検例から採取した試料について、免疫染色及び蛍光多重免疫染色により、ケモカインの産生細胞及びケモカイン受容体の発現細胞の検出を行う。基礎的研究と実務的研究の結果を総合し、ケモカインシステムの発現様態を動脈瘤形成との関連性を統計的に解析して、既存の指標を用いた診断法と比較することにより、法医実務に応用可能なケモカインを指標とする新しい判定法を確立する。

申請者は、早くから動脈瘤形成過程におけるケモカインシステムの重要性を示唆する知見を得ており、本研究ではケモカイン及びケモカイン受容体の遺伝子改変マウスと野生型マウスを用いて腹部大動脈瘤モデルを作製し、動脈瘤の病態形成におけるケモカインシステムの分子病理学的役割を解析する。申請者はすでに、予備の実験においてマウス腹部大動脈瘤モデルにおける病変部で、ケモカイン CCL3 及びケモカイン受容体 CX3CR1 に遺伝子発現が増強することを見出している。したがって、動脈瘤の病態形成において、ケモカインが重要な役割を担っていることが予想される。

<遺伝子改変マウス>

C57BL/6 を遺伝子背景とする種々の遺伝子 (CCL3, CCR1, CCR5) 欠損マウスを用いる。対照群として野生型 C57BL/6 マウスを用いる。

#### <腹部大動脈瘤モデル>

予備的実験で、以下の2つの大動脈瘤モデルを確立している。

A. 塩化カルシウム誘発腹部大動脈瘤モデル

B. アンジオテンシン II 誘発腹部大動脈瘤モデル

A のモデルでは、腹部大動脈を 0.5M 塩化カルシウム溶液で 15 分浸すことで、沈着したカルシウムによって炎症が遷延化することで大動脈瘤が生じる。一方で、B のモデルではアンジオテンシン II を 4 週間持続全身投与することで、動脈硬化を基盤とする大動脈瘤が発生する。いずれのモデルにおいても、ヒト大動脈瘤病変部位で認められる病変が完全に再現されないことから、両者のモデルを用いて以下の検討を行う。

##### 1) 死亡率の検討

野生型と遺伝子欠損マウスの死亡率を比較、検討する。

##### 2) 病理組織学的及び免疫組織化学的検討

各種臓器を採取して、ヘマトキシリン-エオジン染色、マッソン・トリクローム染色、及びエラスチカワンギーソン染色を施し、各臓器の形態学的変化を観察する。また、好中球、マクロファージ、樹状細胞、Tリンパ球、及び uPA, von Willebrand factor それぞれに対する抗体を用いて、免疫染色を行う。さらに、サイトカイン (IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) やケモカイン (CCL2, CCL3, CCL5, CX3CL1, XCL1) に対する抗体を用いて免疫染色を施し、各物質の局在を免疫組織化学的に検討する。各種免疫担当細胞、及びサイトカイン、ケモカインの免疫組織化学的発現程度を野生型と遺伝子欠損マウスとで比較、検討する。

##### 4) サイトカイン、ケモカインの定量

採取した各種臓器をモホゲナイズして、その上清を回収する。上清中のサイトカインやケモカインの濃度を免疫化学的に ELISA 法で測定する。各サイトカイン、ケモカインの組織内濃度を野生型と遺伝子欠損マウスとで比較、検討する。

##### 5) 細胞分画の検討

採取した試料を用いて磁気細胞分離装置により各細胞分画に分離した後、フローサイトメトリーにより各細胞分画の比率を解析する。さらに、各細胞分画をソートしてサイトカインやケモカインとの多重染色により、各物質の産生細胞を同定、定量する。

6) 1~5 の結果を総合して、大動脈瘤の病態形成におけるケモカインシステムの役割を明らかにし、その作用機序を解明する。最終的にケモカインを標的とする分子生物学的法医学診断学の確立のための基礎的成果とする。

#### <応用研究>

マウスを用いた基礎的検討結果を、法医剖検例に応用するための剖検試料収集をすでに開始している。動物研究を鋭意継続しながら、法医実務への応用研究として、それまでに収集した大動脈瘤、大動脈瘤解離、及び対照試料を用いて、免疫染色により種々のケモカイン及びケモカイン受容体を検出する。さらに多重染色により、ケモカインの産生細胞及びケモカイン受容体の局在を同定する。また、基礎的研究で候補と考えられたケモカイン及びケモカイン受容体について、real-time RT-PCR 法による遺伝子発現、及び ELISA 法によるタンパク発現の定量的検討を行う。動物実験の結果と実務的研究の結果を総合的に考察し、大動脈瘤の病態形成の分子生物学的機構を解明する。ケモカインを指標とする法医診断基準の確立を試みる。

#### 4. 研究成果

腹部大動脈瘤 (AAA) の発症には、サイトカインやケモカインなどの炎症性メディエーターが深く関与している。われわれは、ヒト腹部大動脈瘤の病変部に CCL3 タンパク発現を見出しマウス腹部大動脈に CaCl<sub>2</sub> を注入すると、大動脈内にマクロファージが浸潤し、CCL3 および MMP-9 の発現が亢進し、AAA が誘導されることが判明した。さらに、浸潤マクロファージは C-C ケモカイン受容体 5 (CCR5, CCL3 の特異的受容体) と MMP-9 を発現していることが分かった。Ccl3<sup>-/-</sup>マウスと Ccr5<sup>-/-</sup>マウスの両者は、マクロファージ浸潤と MMP-9 発現の増大を伴う CaCl<sub>2</sub> 誘発 AAA が増悪した。同様の所見はアンジオテンシン II 誘発 AAA モデルでも得られた。CCL3 の中和抗体投与は、CaCl<sub>2</sub> 処理した Ccl3<sup>-/-</sup>マウスと同様の表現型を示した。逆に、CCL3 投与は野生型マウスと Ccl3<sup>-/-</sup>マウスの両方で CaCl<sub>2</sub> 誘発 AAA を減弱させた。さらに、CCL3-CCR5 軸はマクロファージにおける PMA 誘導性の MMP-9 発現亢進を抑制することが *in vitro* 実験によりわかった。従って、CCL3 は MMP-9 の発現を抑制することにより、CaCl<sub>2</sub> 誘発 AAA 発症を予防するのに有効である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ishida Yuko, Kuninaka Yumi, Nosaka Mizuho, Kimura Akihiko, Taruya Akira, Furuta Machi, Mukaida Naofumi, Kondo Toshikazu	4. 巻 11
2. 論文標題 Prevention of CaCl <sub>2</sub> -induced aortic inflammation and subsequent aneurysm formation by the CCL3/CCR5 axis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-19763-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 石田裕子
2. 発表標題 Prevention of CaCl <sub>2</sub> -induced aortic inflammation and subsequent aneurysm formation by CCL3
3. 学会等名 第106次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuko Ishida
2. 発表標題 Prevention of CaCl <sub>2</sub> -induced aortic inflammation and subsequent aneurysm formation by CCL3
3. 学会等名 MMCB2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuko Ishida
2. 発表標題 Prevention of CaCl <sub>2</sub> -induced aortic inflammation and subsequent aneurysm formation by CCL3
3. 学会等名 Cytokines2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	野坂 みずほ  (Nosaka Mizuho)  (00244731)	和歌山県立医科大学・医学部・講師    (24701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------