

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06966

研究課題名（和文）時空間的解析による大動脈瘤発生から進行過程でのケモカイン・システムの機能解明

研究課題名（英文）Spacio-temporal analysis of the chemokine system during the course of aortic aneurysm formation

研究代表者

向田 直史（Mukaida, Naofumi）

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：30182067

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：大動脈瘤は動脈壁の広範囲の炎症と引き続き起きる異常な組織構築により発生する。マクロファージとマクロファージ由来のケモカインは異常な組織構築に重要な役割を果たしている。マクロファージ由来のCCL3が、マクロファージに作用し、大動脈瘤発生を抑制することを我々は報告した。本研究計画で、マクロファージに発現している他のケモカイン・レセプターであるCX3CR1を遺伝子欠損マウスでは大動脈瘤発生が抑制されるのに対して、CCR2遺伝子欠損マウスでは大動脈発生が増悪することを明らかにした。以上の結果から、複数のケモカインがマクロファージに異なる作用を示すことで、大動脈瘤発生に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マクロファージに発現しているケモカイン・レセプターのうち、CCR2・CCR5を介するシグナルが大動脈瘤発生に抑制的に作用するのに対して、CX3CR1を介するシグナルは大動脈瘤発生に促進的に作用することが示唆された。このような複数のケモカイン・レセプターによる、大動脈瘤発生過程でのマクロファージ機能の調節機構が明らかになることで、現在有効な治療・予防戦略のない大動脈瘤に対して、マクロファージに作用するケモカイン・システムを標的とした新たな治療戦略の基盤形成が期待されることより、学術的のみならず、医療面においても意義が大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Widespread inflammation and subsequent abnormal tissue reorganization lead to aortic aneurysm development. Macrophages and their products, chemokines, have an essential role in abnormal tissue reorganization. Indeed, we previously revealed that CCL3, a chemokine produced by macrophages, acted on macrophages, to dampen aortic aneurysm formation. In this research project, we demonstrated that mice deficient in another macrophage-tropic chemokine receptor genes, CX3CR1 and CCR2, attenuated and promoted aneurysm formation, respectively. Thus, multiple macrophage-tropic chemokines can have differential effects on macrophages at aneurysm and can eventually contribute to aneurysm formation and progression.

研究分野：実験病理学

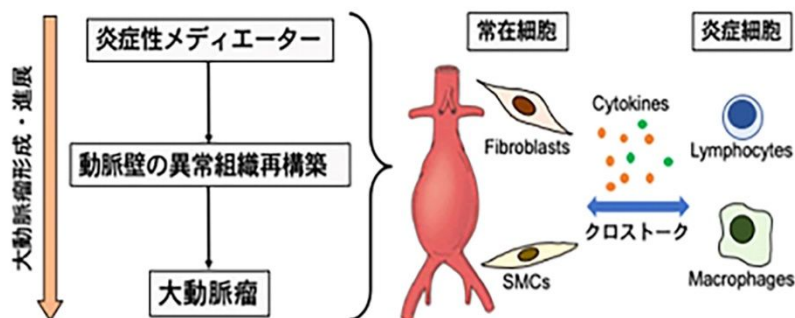
キーワード：ケモカイン 大動脈瘤 マクロファージ 動脈硬化 マウス

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

本邦では年間5万人を超えている突然死の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。大動脈瘤の多くは動脈硬化を基盤として発生し、年間0.1~0.2cm程度のペースで直径が増大し、5cmを超える時点から破裂の危険性が高くなる。破裂の危険性を減少させるために、大動脈瘤の進展の抑制を目的に、降圧剤・スタチンが投与されているが、効果は限定的である。ヒト大動脈瘤病変部位では、動脈壁の広範囲の炎症と細胞外マトリックスの断片化に伴う異常な組織構築が認められる。しかし、ヒト病変部の解析では、病変の成立・進行過程の解析は困難であり、動物モデルでの検討が必要となる。

皮膚創傷治癒・肺線維症などの病態での生体反応に関する研究を通して、ケモカインを始めとする炎症性サイトカインが、組織内の線維芽細胞などの常在細胞とマクロファージを始めとする炎症細胞との間のクロストークを制御することで、損傷後に生じる炎症反応と引き続き起きる異常な組織



再構築過程に参与していることを、研究代表者は明らかにしてきた。同様のクロストークが、大動脈瘤形成過程においても作用しているとの想定し(図1)、マクロファージ・リンパ球の遊走過程を制御することが知られているケモカイン・CCL3のマウスでの大動脈瘤発生過程での役割を検討した。

図1. 大動脈瘤発生過程での、常在細胞と炎症細胞との間の想定されるクロストーク

その結果、大動脈瘤部位に集積するマクロファージが産生するCCL3が、オートクライン的にCCR5を発現しているマクロファージに作用して、動脈壁破壊を引き起こすマトリックスメタプロテナーゼ(MMP)9産生を抑制することで、大動

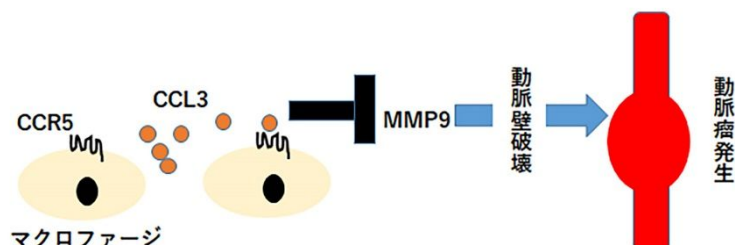


図2 CCL3による動脈瘤発生抑制機構

脈瘤発生を抑制することを明らかにした(図2)。さらに、CCL3欠損マウス・CCR5欠損マウスでは、大動脈瘤の増大、マクロファージ数の増加と、マクロファージに作用することが知られているケモカインCCL2・CX3CL1などの発現が大動脈瘤部位で亢進していることも認めた(Nature Commun 2020, 11: 5954. Doi: 10.1038/s41467-070-19763-0)。

以上の結果は、大動脈瘤治療へのCCL3の応用の可能性を示す一方で、大動脈瘤発生・進行過程において重要な役割を果たしていると考えられるマクロファージの浸潤・活性化が、複数のマクロファージ指向性ケモカインであるCCL2などと形成されている複雑なネットワークによって調節されている可能性が示唆された。

### 2. 研究の目的

動脈硬化が90%以上の大動脈瘤の発症に関与していると想定されている。動脈硬化薬の成立にはマクロファージ由来の泡沫細胞が重要な役割を果たしていることが知られているが、我々の検討からも、大動脈瘤成立過程においてもマクロファージが重要な役割を果たしていることが明らかになった(Nature Commun 2020, 11: 5954. Doi: 10.1038/s41467-070-19763-0)。一方で

当初の予想と反して、ケモカイン CCL3 が、マクロファージの大動脈瘤病変部位への浸潤に関与せず、マクロファージによる MMP9 産生を抑制する一方で、CCL3 欠損マウスの大動脈瘤部位ではマクロファージ浸潤と CCL2 発現が亢進することも、我々の研究から明らかとなった。さらに、大動脈瘤発生部位に浸潤してくるマクロファージに、CCR5 以外に、マクロファージ指向性ケモカインに対するレセプターである CCR1・CCR2・CX3CR1 が発現していることも確認している。

これらの研究成果から、大動脈瘤形成過程におけるマクロファージの浸潤・活性化が、CCL3 のみならず、複数のマクロファージ指向性のケモカインによって、動脈瘤発生から進行過程において時空間的に広範囲に、協調的に制御されている可能性が示唆された。これらの点を解明するために、種々のケモカイン・レセプター遺伝子の欠損マウスを用いて、大動脈瘤モデルに関して、病理学的ならびに包括的な遺伝子発現解析を始めとする分子レベルでの解析を行い、大動脈瘤発生過程でのケモカイン・システムの病態生理学的役割を明確にすることで、ケモカイン・システムを標的とした大動脈瘤に対する新たな治療戦略の基盤形成を目指す。

### 3. 研究の方法

#### 1) マウス

C57BL/6 を遺伝子背景とする種々の遺伝子(マクロファージ指向性ケモカインに対するレセプターである CCR1・CCR2・CX3CR1)欠損マウス、ならびにこれらの欠損マウスと野生型マウスとの間で作成した骨髄キメラマウスを用いた。対照群として野生型 C57BL/6 マウスを用いた。

#### 2) 腹部大動脈瘤モデル

すでに方法を確立している以下の2つの大動脈瘤モデルを用いた。

塩化カルシウム誘発腹部大動脈瘤モデル

アンジオテンシン II 誘発腹部大動脈瘤モデル

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は再現されないことから(下表)、両者のモデルを併用することで、大動脈瘤の病態の解明を目指した。

	塩化カルシウム誘発モデル	アンジオテンシン II 誘発モデル
大動脈瘤形成機序	腹部大動脈 0.5M CaCl <sub>2</sub> で浸す カルシウム沈着 炎症遷延 炎症細胞由来の基質分解酵素 壁の脆弱化	アンジオテンシン II 4週間持続投与 動脈硬化病変 動脈瘤形成
瘤形成に要する期間	6週間	4週間
組織学的変化	外膜側に顕著な炎症細胞浸潤 中膜弾性線維の破壊	壁在血栓と動脈硬化性病変 の併存
ヒト大動脈瘤との相違点	壁在血栓と動脈硬化性病変の併存なし	瘤形成は腎動脈上 初期病変は限局解離

#### 3) 検討項目

動脈瘤発生部位の肉眼的観察

野生型と各種遺伝子欠損マウスを用いて、動脈瘤発生部位を肉眼的に比較観察した。

野生型と比べて、顕著な違いを示した遺伝子欠損マウスに焦点を当てて、動脈瘤発生部位を始めとする種々の臓器を経時的に採取して、  
について詳細な比較検討を行った。

病理組織学的及び免疫組織化学的検討

ア. ヘマトキシリン-エオジン(HE)染色、エラスチカワンギーソン(EVG)染色

イ. 免疫染色法

- a. マクロファージ・樹状細胞・好中球・リンパ球の検出
- b. 血管関連分子(uPA・von Willebrand factor)の検出
- c. ケモカイン(CCL2・CCL3・CCL4・CCL5・CX3CL1)・サイトカイン(IL-1 $\alpha$ ・IL-1 $\beta$ ・IL-6・IL-10・TNF- $\alpha$ ・IFN- $\gamma$ )ならびにそれぞれに対するレセプター分子の検出

d. 二重免疫染色にて b・c の分子を発現している細胞の同定

組織中のサイトカイン、ケモカインの mRNA 発現とタンパク定量

採取した試料中のケモカイン・サイトカインの mRNA 発現を qRT-PCR 法で、タンパク濃度を ELISA 法で測定し、経時的変動を野生型と遺伝子欠損マウスとの間で比較・検討した。

#### 4. 研究成果

##### 1) CCR1 欠損マウスを用いた、CaCl<sub>2</sub> 誘発大動脈瘤モデルでの検討

動脈瘤発生部位の肉眼的観察および病理組織学的検討において、CCR1 欠損マウスでは、野生型マウスと同様の大動脈瘤発生過程を示していた。したがって、CCR1 は *in vitro* では CCL3 によるシグナルを介する可能性が報告されているが、CaCl<sub>2</sub> 投与による大動脈瘤発症・進展過程には、CCR1 を介するシグナルは関与しないと考えられた。

##### 2) CX3CR1 欠損マウスを用いた、CaCl<sub>2</sub> 誘発大動脈瘤モデルでの検討

野生型マウスと比較したところ、CX3CR1 欠損マウスでは有意に大動脈瘤形成（大動脈径）が減弱していた

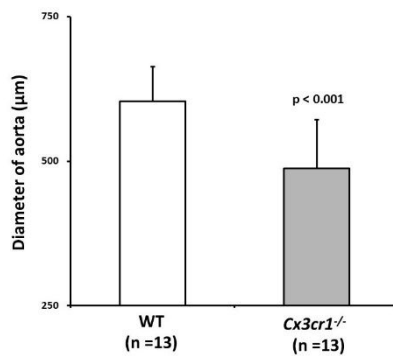


図3. CaCl<sub>2</sub> 誘発大動脈瘤モデルでの大動脈径

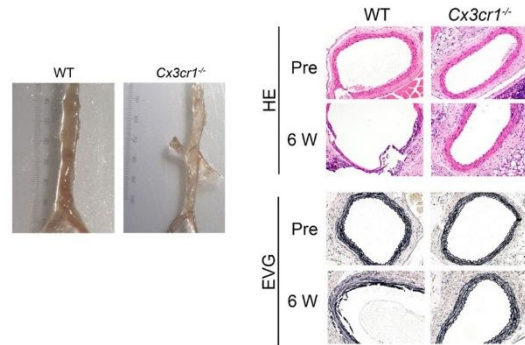


図4. CaCl<sub>2</sub> 誘発大動脈瘤モデルでの病理学的検索

(図3)。さらに、HE 染色・EVG 染色による病理組織学的解析により、大動脈瘤部の内膜の破綻は、野生型マウスと比べて CX3CR1 欠損マウスで減弱していた(図4)。さらに、大動脈瘤部位での血管関連分子や種々のケモカイン・サイトカイン遺伝子発現も減弱していた。

##### 3) CCR2 欠損マウスを用いた、CaCl<sub>2</sub> 誘発大動脈瘤モデルでの検討

野生型マウスと比較したところ、CCR2 欠損マウスでも、有意に大動脈瘤形成（大動脈径）が亢進しているとともに、大動脈瘤部の内膜の破綻も増悪していた。さらに、大動脈瘤部位での血管関連分子や種々のケモカイン・サイトカイン遺伝子発現も増悪していた。

4) 以上の結果より、マクロファージに発現しているケモカイン・レセプターのうち、CCR5 ならに CCR2 を介するシグナルが大動脈瘤発生に抑制的に作用するのに対して、CX3CR1 を介するシグナルは大動脈瘤発生に促進的に作用することが示唆された。このようなケモカイン・レセプターの異なった役割の原因としては、以下の二つの機構が想定される。

マクロファージのうち、異なるサブセットあるいは異なる分化段階の亜集団が、それぞれ異なるケモカイン・レセプターを発現しているために、異なる役割を担っている。

同一のマクロファージが上記のケモカイン・レセプターをすべて発現していて、微小環境でのケモカイン濃度に応じて、異なる役割を担っている。

今後これらの点を解明することによって、大動脈瘤発生過程でのケモカイン・システムの病態生理学的役割が明確となり、ケモカイン・システムを標的とした、大動脈瘤に対する新たな治療戦略の基盤が形成されることが期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ni Y, Zhuge F, Ni L, Nagata N, Yamashita T, Mukaida N, Kaneko S, Ota T, and Nagashimada M.	4. 巻 136
2. 論文標題 CX3CL1/CX3CR1 interaction protects against lipotoxicity-induced nonalcoholic steatohepatitis by regulating macrophage migration and M1/M2 status	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Metabolism	6. 最初と最後の頁 155272
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.metabol.2022.155272	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Zoshima Takeshi, Baba Tomohisa, Tanabe Yamato, Ishida Yuko, Nakatani Kimihiko, Nagata Michio, Mukaida Naofumi, Kawano Mitsuhiro	4. 巻 162
2. 論文標題 CCR2- and CCR5-mediated macrophage infiltration contributes to glomerular endocapillary hypercellularity in antibody-induced lupus nephritis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Rheumatology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/rheumatology/keab825	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Imamura Mayu, Li Tiantian, Li Chunning, Fujisawa Masayoshi, Mukaida Naofumi, Matsukawa Akihiro, Yoshimura Teizo	4. 巻 43
2. 論文標題 Crosstalk between Cancer Cells and Fibroblasts for the Production of Monocyte Chemoattractant Protein-1 in the Murine 4T1 Breast Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Issues in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 1726 ~ 1740
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cimb43030122	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 -
1. 著者名 Xu Liang, Chen Yongping, Nagashimada Mayumi, Ni Yinhu, Zhuge Fen, Chen Guanliang, Li Haoran, Pan Tongtong, Yamashita Tatsuya, Mukaida Naofumi, Kaneko Shuichi, Ota Tsuguhito, Nagata Naoto	4. 巻 125
2. 論文標題 C C chemokine ligand 3 deficiency ameliorates diet-induced steatohepatitis by regulating liver macrophage recruitment and M1/M2 status in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Metabolism	6. 最初と最後の頁 154914 ~ 154914
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.metabol.2021.154914	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Baba Tomohisa, Tomaru Utano, Hirao Atsushi, Mukaida Naofumi, Johmura Yoshikazu	4. 巻 4
2. 論文標題 Autophagy Inhibition-induced Cytosolic DNA Sensing Combined with Differentiation Therapy Induces Irreversible Myeloid Differentiation in Leukemia Cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cancer Research Communications	6. 最初と最後の頁 849 ~ 860
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/2767-9764.CRC-23-0507	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 -

1. 著者名 Ishida Yuko, Zhang Siying, Kuninaka Yumi, Ishigami Akiko, Nosaka Mizuho, Harie Isui, Kimura Akihiko, Mukaida Naofumi, Kondo Toshikazu	4. 巻 24
2. 論文標題 Essential Involvement of Neutrophil Elastase in Acute Acetaminophen Hepatotoxicity Using BALB/c Mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7845 ~ 7845
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24097845	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 -

1. 著者名 Ishida Yuko, Kuninaka Yumi, Mukaida Naofumi, Kondo Toshikazu	4. 巻 24
2. 論文標題 Immune Mechanisms of Pulmonary Fibrosis with Bleomycin	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3149 ~ 3149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24043149	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

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	馬場 智久  (Baba Tomohisa)  (00452095)	金沢大学・がん進展制御研究所・准教授    (13301)	

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
---------	---------