

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591083

研究課題名(和文)大動脈瘤形成過程におけるHMGB1蛋白の役割

研究課題名(英文)Role of HMGB1 protein in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm

研究代表者

安齊 俊久 (Anzai, Toshihisa)

独立行政法人国立循環器病研究センター・病院・部長

研究者番号：60232089

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：核内非ヒストン蛋白であるHMGB1は、強力な炎症反応を惹起することが知られている。我々は、大動脈瘤形成過程におけるHMGB1の役割を明らかにするため、塩化カルシウム刺激によるマウス大動脈瘤モデルを用いて検討を行った。HMGB1中和抗体の投与により、6週後の腹部大動脈瘤径縮小、炎症細胞浸潤の軽減、大動脈中膜層の菲薄化とエラスチンの波状構造の破壊軽減が認められた。同時に、HMGB1発現の低下、Mac-3陽性マクロファージの浸潤軽減、MMP-2、MMP-9の活性低下、TNF- $\alpha$ 、CD68、MCP-1の発現低下が認められ、HMGB1が炎症惹起を介して、大動脈瘤進展を促進している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：High-mobility group box 1 protein (HMGB1) is a non-histone DNA binding protein and a potent inducer of inflammatory response. We investigated the role of HMGB1 in a mouse CaCl<sub>2</sub>-induced abdominal aortic aneurysm (AAA) model. Administration of neutralizing anti-HMGB1 antibody for 6 weeks resulted in suppression of AAA formation, inflammatory cellular infiltration, and elastin fragmentation, in association with decreased expression of HMGB1, infiltration of Mac-3 positive macrophages, activity of MMP-2 and MMP-9, and mRNA expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ , CD68 and MCP-1 in the aorta. These findings suggest a significant role of HMGB1 in the pathogenesis of AAA through enhanced inflammatory response.

研究分野：循環器内科学

キーワード：循環器・高血圧 蛋白質 病理学 免疫学

## 1. 研究開始当初の背景

大動脈瘤はその有病率の高さに加え、しばしば無症状のまま致命的経過に至るという重大性に比し、病態解明が進んでおらず、有効な内科的治療法が確立されていない。大動脈瘤の組織学的特徴として、慢性炎症の重要性が近年着目されている。急性呼吸窮迫症候群 (ARDS) などの病態においては、致命的炎症性メディエーターである High Mobility Group Box (HMGB)1 蛋白が炎症を遷延拡大させることで病態を悪化させていることが知られており、腹部大動脈瘤形成過程における炎症の遷延にも重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

マウス大動脈瘤モデルにおける HMGB1 の発現と慢性炎症ならびに細胞外マトリックスのリモデリングとの関連を明らかにするとともに、抗 HMGB1 抗体の効果を検討し、これまで確立されていない大動脈瘤に対する内科的治療法の開発に貢献することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 大動脈瘤モデルの作製

生後7週野生型マウスを用い、ペントバルビタール麻酔下に開腹し、腎動脈から腸骨動脈分岐部を露出する。同部位に 0.5M CaCl<sub>2</sub> を浸した 3X5mm のガーゼを 15 分間留置し、その後生食で洗浄する (AAA 群)。生食のみの処置を行う群を Sham 群とする。AAA 群においては、術前に以下に示した通り、コントロール抗体群と HMGB1 中和抗体群の 2 群にわけて検討する。

Sham 群 (n=5)

AAA/Control 抗体群 (n=5) コントロール抗体 10mg/kg 術前 1 時間、腹腔内注射

AAA/HMGB1 中和抗体群 (n=5) HMGB1 中和抗体 10mg/kg 術前 1 時間、腹腔内注射

Neutralizing polyclonal chicken IgY anti-HMGB1 antibody (Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2005;288:L958-65)

### (2) 大動脈径の評価

手術後6週に開腹の上、腹部大動脈の最大外径を測定する。また腹部大動脈瘤破裂を認めた場合にはその頻度も検討する。

### (3) 大動脈の摘出と組織固定

大動脈摘出の際にはペントバルビタールを大量投与する。大動脈径を測定した後に、最大に拡大した大動脈部位を採取し、一部は分子生物学的検討用の検体として生理食塩水で洗浄した後に -80 で保存する。残りは病理学的検討のために OCT コンパウンドに包埋する。

### (4) 病理学的検討

#### Hematoxylin & Eosin 染色

大動脈瘤の形態と炎症細胞浸潤の程度について評価する。

#### Elastica van Gieson 染色

大動脈瘤における中膜層の菲薄化と弾性線維の破壊などの変化を評価する。

#### 免疫組織染色

Mac3 (マクロファージ)、HMGB1 に対する抗体を用いて、大動脈壁へにおける炎症細胞浸潤について検討する。

### (5) 大動脈組織における MMP 活性定量

大動脈組織より抽出された蛋白を用いて、MMP-2 及び MMP-9 の活性を評価するために Zymography を行う。

### (6) 大動脈組織における各種サイトカインの mRNA 発現

大動脈組織より RNAzol を用いて RNA を抽出し、大動脈壁における TNF- $\alpha$ 、CD68、MCP-1 の発現を real time RT-PCR を用いて定量化する (TaqMan Gene Expression Assay, ABI Prism 7700)。

## 4. 研究成果

### (1) 腹部大動脈径

AAA/CON 群では、Sham 群に比べ、有意に腹部

大動脈瘤径が拡大し、AAA/anti-H 群では、AAA/CON 群に比較し有意に腹部大動脈瘤径の縮小を認めた。

## (2) 病理学的変化

HE 染色では、AAA/CON 群において、Sham 群に比較し炎症細胞浸潤の増加を認めたが、AAA/anti-H 群では、AAA/CON 群に比較し炎症細胞浸潤の有意な軽減を認めた。EVG 染色では、AAA/CON 群で大動脈中膜層の菲薄化とエラスチンの波状構造の破壊が認められるのに対して、AAA/anti-H 群では、それが軽減されており、HMGB1 中和抗体投与による腹部大動脈瘤形成の抑制効果が示唆された。

AAA/anti-H 群で、AAA/CON 群に比較し、HMGB1 発現の低下、Mac-3 陽性マクロファージの浸潤軽減が認められた。

## (3) MMP 活性

MMP-2、MMP-9 の活性は、AAA/CON 群において上昇し、AAA/anti-H 群で AAA/CON 群に比較し、有意に低下した。

## (4) サイトカイン発現

real-time RT-PCR により大動脈壁における遺伝子発現を調べたところ、AAA/anti-H 群において AAA/CON 群に比較し、TNF- $\alpha$ 、CD68、MCP-1 の発現が有意に低下していることが明らかになった。

## 結論

上記の結果より、HMGB1 が炎症惹起を介して、大動脈瘤進展を促進している可能性が示唆された。HMGB1 は、大動脈瘤に対する新たな治療標的として期待される。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 23 件)

Nagai T, Honda S, Sugano Y, Matsuyama T, Ohta-Ogo K, Asami Y, Ikeda Y, Kusano K, Ishihara M, Ishibashi-Ueda H, Anzai T. Decreased myocardial

dendritic cells is associated with impaired reparative fibrosis and development of cardiac rupture after myocardial infarction in humans. *JAHA* 2014; 3: e000839. 査読有. DOI: 10.1161/JAHA114.000839

Kishimoto I, Makino H, Ohta Y, Tamanaha T, Tochiya M, Kada A, Ishihara M, Anzai T, Shimizu W, Yasuda S, Ogawa H. Hemoglobin A1c predicts heart failure hospitalization independent of baseline cardiac function or B-type natriuretic peptide level. *Diabetes Res Clin Pract* 2014; 104: 257-265. 査読有.

DOI: 10.1016/j.diabres.2014.02.009  
Anzai T. Post-infarction inflammation and left ventricular remodeling: a double-edge sword. *Circ J* 2013; 77: 580-587. 査読有.

DOI: 10.1253/circj.CJ-13-0013

[学会発表](計 20 件)

安斉俊久. HFpEF は独立した疾患概念である. 第62回日本心臓病学会学術集会.

2014年9月26日-9月28日. 仙台

安斉俊久. 心不全治療における新しい展開. 第117回日本循環器学会近畿地方会.

2014年7月12日. 大阪.

安斉俊久. 心腎連関を考慮した心不全治療. 第78回日本循環器学会学術集会.

2014年3月21日-3月23日. 東京.

安斉俊久. HMGB1 と大動脈瘤. 第21回日本血管生物医学会学術集会. 2013年9月. 大阪

[図書](計 16 件)

安斉俊久. 医学書院. 急性心膜炎, 収縮性心膜炎. 今日の治療指針 2014 年版. 私はこうして治療している. 2015, p428-429.

安斉俊久. 南江堂. 血行再建後も 遮断薬を使用すべきか? 遮断薬を臨床でいかす! ~エキスパートからのキーマッセージ 50. 2014, p35-37.

安斉俊久. 南山堂. 薬物療法と循環器予防学. カルシウム拮抗薬. 循環器予防医学. 2012, p282-290.

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

安斉 俊久 (ANZAI, Toshihisa)  
国立循環器病研究センター・病院・部長  
研究者番号：60232089