

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791398

研究課題名(和文) 大動脈瘤における血管修復機構の解明～血管平滑筋に着目した治療法の開発～

研究課題名(英文) The vessel repair mechanism in aortic aneurysm, focusing on the vascular smooth muscle.

研究代表者

平方 佐季 (HIRAKATA, SAKI)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：60597425

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト及びマウス大動脈瘤の病態にはIL-6系シグナルのSTAT3活性化が関与し、マウス瘤における平滑筋STAT3活性化は、平滑筋細胞の増殖やアポトーシスに関連していることがわかった。しかし、平滑筋細胞におけるIL-6シグナルは、実験的大動脈瘤形成には影響せず、瘤病態には重要でないことが明らかとなった。一方で、大動脈解離においては、平滑筋STAT3をノックアウトすると、より重症化することを見いだした。平滑筋STAT3が大動脈解離病態において重要な役割を果たす可能性を示唆する新たな知見を得ることができ、引き続き、大動脈解離における平滑筋STAT3の役割やその分子メカニズムについて研究を進めている。

研究成果の概要(英文)：In this project, we found that activation of IL-6 signal(STAT3) are involved in the pathogenesis of murine and human aortic aneurysm, and also that in mice, STAT3 activation in smooth muscle cells are associated with apoptosis and proliferation. However, the IL-6 signal in smooth muscle cells did not affect the formation of experimental aortic aneurysm, and revealed that it is not critical to the aneurysm pathology. On the other hand, in the aortic dissection, knocking out smooth muscle's STAT3 showed greater susceptibility upon the BAPN and angiotensin infusion compared to wild type mice. Thus, we found a new insights, suggests that smooth muscle's STAT3 may play an important role in aortic dissection pathology.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：血管外科学 大動脈瘤 分子生物学

1. 研究開始当初の背景

【臨床的背景】

大動脈瘤は症状なく進行し、破裂により突然死を来す“サイレントキラー”ともいわれる疾患である。本邦では年間 10 万人以上の新規発症があるとされ超高齢化の中で急増しつつある。治療法は破裂危険率が高い大径瘤に対する手術や血管内治療しか無い。手術適応でない小径瘤であっても年間 0.5-5%が破裂するとされ、進行阻止に有効な治療法の確立が急務である。しかし、病態には不明な点が多く、瘤の進行抑制、治癒を実現する治療法は確立されていない。

【研究的背景】

大動脈瘤組織では、慢性炎症により破壊と修復が同時に起こっており、破壊が修復を上回るため瘤の拡大が進行すると考えられる。従来、瘤に対する実験的治療はマトリックス・メタロプロテアーゼの阻害等、破壊抑制に主眼が置かれていたが、臨床的には十分な効果を上げていない。効果的な治療法を開発するためには、組織修復メカニズムの解明と制御が必要である。

大動脈壁の強度は血管平滑筋が合成する細胞外マトリックス(ECM)で維持されており、瘤病態でも血管平滑筋の ECM 合成・組織修復機能が重要と考えられる。しかし、瘤において血管平滑筋の修復機能がどのように制御されているのかは不明である。

ヒト瘤組織では代表的な炎症性サイトカイン IL-6 が高発現する。IL-6 は種々の病態で ECM 代謝を制御すると報告されているが、破壊亢進と修復促進の双方が報告されている。病態や標的細胞により IL-6 の作用が異なると推定され、ヒト瘤組織の平滑筋細胞では、IL-6系シグナルの1つであるSTAT3が活性化しており(Liao M ら, J Surg Res. 2011;1-8)、平滑筋細胞における STAT3 活性化は、平滑筋細胞の増殖促進やアポトーシス抑制に関与しているとされている。

以上から、IL-6 及び STAT3 による血管平滑筋の修復能制御を明らかにすることで、従来とは異なり組織修復メカニズムを強化する治療戦略の開発が期待される。事実、申請者の所属研究所では心筋細胞特異的な IL-6 シグナル強化が心筋梗塞後の組織修復を促進し心保護的に働くことを見いだした(安川ら J Am Coll Cardiol, in press)。

我々は、大動脈瘤における IL-6 シグナルと血管平滑筋の関連に着目して予備的検討を開始した。

マウス大動脈瘤モデルとして、大動脈周囲に

CaCl<sub>2</sub> を塗布して慢性炎症を惹起して得られる大動脈瘤を用いた (Ca モデル)。炎症が強い時期に血管平滑筋で IL-6 の下流分子 STAT3 の活性化を認めた。

また、ヒト大動脈瘤組織では、コラーゲン増生が著明な部位の平滑筋で STAT3 の活性化を認めた。これらの結果は、大動脈瘤において血管平滑筋の IL-6 シグナルが亢進し、病態に関与するとの仮説を支持する。

2. 研究の目的

本研究は、大動脈瘤病態における IL-6 の意義について、血管平滑筋の修復能制御メカニズムを中心に解明することを目的とする。

3. 研究の方法

【実験系】

(1) マウス大動脈瘤モデル

大動脈周囲に CaCl<sub>2</sub> を塗布して慢性炎症を惹起し、約 6 週間で瘤が完成する Ca モデルを用いて、平滑筋 IL-6 シグナルの意義を検証した。IL-6 感受性を平滑筋特異的に操作した遺伝子改変マウスを用いた (図 1)。

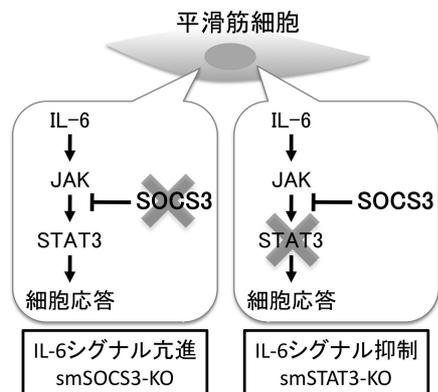


図 1. 本研究で用いる遺伝子改変マウス平滑筋特異的 SM22 プロモーターによる Cre-loxP システムで組織特異的 SOCS3 及び STAT3 ノックアウトマウスを作成する。

[ IL-6 シグナル亢進マウス : smSOCS3-KO ]  
IL-6 シグナルの抑制因子 SOCS3 を平滑筋特異的にノックアウトする。

[ IL-6 シグナル抑制マウス : smSTAT3-KO ]  
IL-6 シグナルの伝達因子 STAT3 を平滑筋特異的にノックアウトする。

野生型マウス、平滑筋特異的 SOCS3 および STAT3 ノックアウトマウスの個体数が充分得られた時点で Ca モデルを作成し、6 週間まで経時的に解析した。

(2) ヒト大動脈瘤組織

患者本人の書面による了承を得た上で、腹部

大動脈瘤の人工血管置換術に際して組織を採取し、病理組織標本を用いて検討した。

#### 【検討項目】

マウス大動脈瘤では、灌流固定標本で瘤径を計測し、IL-6系の発現及び活性(STAT3リン酸化)、細胞増殖、アポトーシスを免疫蛍光染色で経時的に観察した。ヒト大動脈組織では、IL-6系の発現及び活性を免疫染色で確認した。

### 4. 研究成果

#### (1) マウス大動脈瘤モデル

##### マウス大動脈瘤組織を用いた検討

野生型マウスの大動脈瘤組織を用いて、平滑筋細胞におけるSTAT3の活性化と平滑筋細胞の増殖やアポトーシスを、平滑筋アクチンと細胞増殖のマーカーKi67やアポトーシスのマーカーTUNELとの多重染色を用いて観察した。その結果、炎症惹起後急性期のSTAT3活性化に一致した平滑筋細胞の増殖やアポトーシスを認めた。

##### 遺伝子操作マウスを用いた検討

前述の遺伝子改変マウスを用いて平滑筋のIL-6シグナルの感受性を操作しても、肉眼的な大動脈瘤の形成は野生型と同等であった。そこで、平滑筋特異的STAT3ノックアウトマウスを用いて、更なる血管負荷のために、コラーゲン/エラスチン架橋酵素阻害薬(BAPN)とアンジオテンシン(AT)の持続投与を行ったところ、野生型よりも大動脈解離が重症化することを見いだした(図2)。

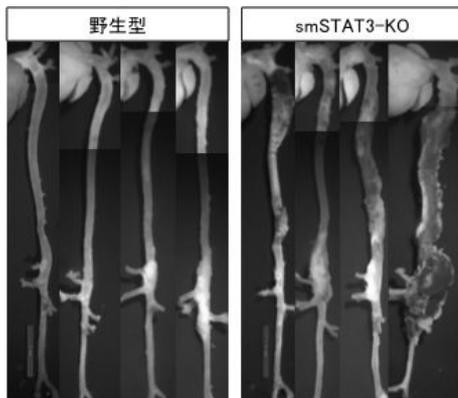


図2. BAPN+AT II負荷モデル(肉眼像)

平滑筋特異的STAT3ノックアウトでは大動脈解離が重症化している。

#### (2) ヒト大動脈瘤組織

免疫組織化学で、炎症細胞、平滑筋細胞と考えられる細胞にIL-6系シグナルであるSTAT3の活性化を認めた(図3)。

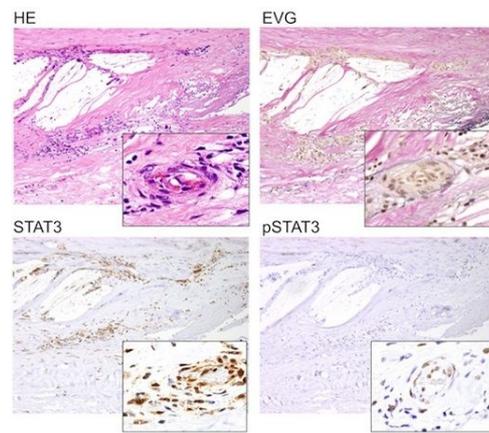


図3. ヒト大動脈瘤組織染色

組織破壊が強い部分において、炎症細胞、紡錘形の核を持った細胞にSTAT3、pSTAT3が発現している

#### まとめ

ヒトの実験から、大動脈瘤の病態にはIL-6系シグナルSTAT3の活性化がみられること、また、野生型マウスの実験から、大動脈瘤における平滑筋STAT3の活性化が平滑筋細胞の増殖やアポトーシスに関連していることがわかった。しかし、平滑筋においてIL-6シグナルの感受性を操作しても、実験的大動脈瘤モデルには影響しないことが明らかとなった。以上から、本研究の目的であった、大動脈瘤におけるIL-6の意義、血管平滑筋の修復能制御メカニズムの解明にはいたらなかったが、大動脈解離においては、平滑筋STAT3が重要な役割を果たすことを示唆する新たな知見を得ることができた。引き続き、大動脈解離において平滑筋STAT3が果たす役割やその分子メカニズムについて研究を進めていく。

### 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1件)

1. Kimura T, Shiraishi K, Furusho A, Ito S, sHirakata S, Nishida N, Yoshimura K, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Ikeda Y, Miyamoto T, Ueno T, Hamano K, Hiroe M, Aonuma K, Matsuzaki M, Imaizumi T, Aoki H.

Tenascin C protects aorta from acute dissection in mice

*Scientific Reports*, 査読有, 4, 2014, Article number:4051, DOI 10.1038/srep04051

[学会発表](計8件)

1. Aya Furusho, Hiroki Aoki, Michihide Nishihara, Satoko Ohno, Saki Hirakata, Norifumi Nishida, Sohei Ito, Yoshihiro Fukumoto

Involvement of B cells in Pathogenesis of Abdominal Aortic Aneurysm

第78回日本循環器学会学術集会：2014.3.23  
東京

2. Satoko Ohno, Hiroki Aoki, Michihide Nishihara, Aya Furusho, Saki Hirakata, Norifumi Nishida, Souhei Ito, Hideo Yasukawa, Tsutomu Imaizumi, Yoshihiro Fukumoto

Macrophage Cytokine Signaling Determines the Development of Acute Aortic Dissection

第78回日本循環器学会学術集会：  
2014.3.23 東京

3. Satoko Ohno, Hiroki Aoki, Michihide Nishihara, Aya Furusho, Saki Hirakata, Norifumi Nishida, Souhei Ito, Tsutomu Imaizumi

Deciphering the Sequential Molecular Events During Onset of Acute Aortic Dissection

American Heart Association Scientific sessions 2013.11.17, Dallas

4. Michihide Nishihara, Hiroki Aoki, Satoko Ohno, Aya Furusho, Saki Hirakata, Norifumi Nishida, Sohei Ito, Tsutomu Imaizumi

Involvement of IL-6 in Pathogenesis of Abdominal Aortic Aneurysm

American Heart Association Scientific sessions 2013.11.17, Dallas

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

平方 佐季 (HIRAKATA SAKI)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：60597425

### (2) 研究分担者 なし

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者 なし

( )

研究者番号：