

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791478

研究課題名(和文)大動脈解離の分子病態メカニズム解明：IL-6によるマクロファージ分化制御

研究課題名(英文)the molecular pathogenesis of aortic dissection

研究代表者

大野 聡子(OHNO, satoko)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：80569418

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)：マクロファージ特異的にIL-6系シグナルを亢進したmSOCS3-KOでは、アンジオテンシンIIによる大動脈の中膜損傷が解離に進展した。解離前の大動脈において、mSOCS3-KOでは野生型より細胞増殖・炎症応答関連遺伝子の発現が亢進していた。マクロファージ分化解析から炎症性M1比率の増加がmSOCS3-KOの解離の一因と考えられた。ヒト解離組織では、外膜や外側中膜でマクロファージのIL-6系シグナルと細胞増殖シグナルの亢進が見られた。以上より、マクロファージIL-6系シグナルの過剰活性が解離進展を起こすことが示された。今後は、マクロファージ分化制御に着目して解離病態のメカニズム解明を進める。

研究成果の概要(英文)：We tested the hypothesis that macrophage IL-6 signal is involved in the pathogenesis of aortic dissection (AD). We found that macrophage-specific SOCS3-KO (mSOCS3-KO), in which IL-6 signal is enhanced specifically in macrophages, developed destructive aortic dissection more frequently than wild type mice (WT) upon angiotensin II stimulation. Transcriptome analyses showed higher expression of cell cycle and inflammatory genes in mSOCS3-KO than in WT before the onset of AD. In mSOCS3-KO, macrophages were preferentially differentiated to proinflammatory M1, indicating enhancement of aortic inflammation. Human AD samples showed higher activation of macrophage IL-6 signal and cell cycle in adventitia and outer media close to the site of dissection than the remote aortic walls. These results indicate that excessive activation of IL-6 signaling in macrophages leads to the destructive inflammation in AD. We will investigate whether anti-inflammatory M2 can stabilize AD in the future.

研究分野：大血管外科

キーワード：大動脈解離 マクロファージ 炎症応答 サイトカイン 分子生物

### 1. 研究開始当初の背景

大動脈解離は中膜が突然破断して壁内に解離腔を形成し、突然死を来す疾患である。積極的な治療法は近位部解離に対する外科的治療のみであり、慢性期に解離腔の拡大や臓器虚血が進行し、重篤化する例も少なくない。

マルファン症候群等の遺伝疾患を除けば、大動脈解離の原因は不明で発症予測や予防は困難である。非解離部分の大動脈壁には強い炎症や高度な破壊が無く、正常に近い中膜が突然断裂しており、解離に先立って起こる分子メカニズムはほとんど分かっていない。このため、外科手術以外に積極的な治療法が無いばかりでなく、予後や治療効果を判定する病態診断法も確立していない。

これまでの基礎的研究による報告では、ヒト解離で IL-6 が高値である事や(Ann Med 2010)、アンジオテンシン II 投与によるマウス解離で IL-6 が重要(J Clin Invest 2009)との結論にとどまり、IL-6 の直接の標的細胞や、解離病態における意義は不明である。

### 2. 研究の目的

申請者は大動脈疾患の病態解明に取り組む中で、IL-6 の役割解明を進めてきた(H22~H23 科研費 若手研究 B)。IL-6 系シグナルの抑制因子である SOCS3 をマクロファージ特異的にノックアウトすると IL-6 感受性を亢進させることができる(mSOCS3-KO、図 1)。このマウスがアンジオテンシン II 負荷により大動脈解離を発症することを発見した。この発見から、大動脈解離における IL-6 の標的細胞がマクロファージであることが明らかとなった。

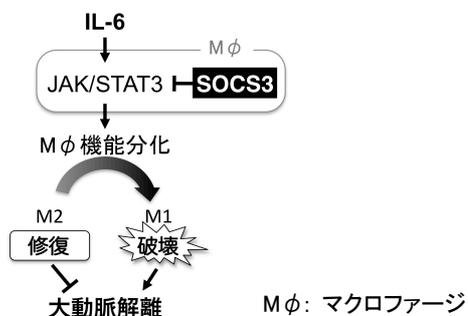


図 1. 解離病態仮説

mSOCS3-KO では IL-6 シグナル亢進により、組織修復を促進する M2 から組織破壊を促進する M1 に分化状態がシフトすると推測される。修復と破壊のインバランスが生じるため組織強度が低下し大動脈解離を発症すると考えられる。

マクロファージはサイトカイン環境によって組織破壊を促進する炎症性 M1 と、組織修復・線維化を促進する抗炎症性 M2 に機能分化するが、解離におけるマクロファージ機能については報告がなく、病態における意義も不明である。以上の知見から申請者は、マクロファージ IL-6 シグナルの異常亢進が大動脈壁における組織破壊と修復のインバランスを生じ、壁強度が低下するため解離に至るとの仮説を着想した(図 1)。

本研究では、IL-6 により機能分化したマクロファージが大動脈に及ぼす影響を明らかにし、謎に包まれていた解離の分子病態を解明する。

### 3. 研究の方法

#### マウス解離モデルを用いた検討

野生型あるいは mSOCS3-KO にアンジオテンシン II を持続投与するモデルを用い、表 1 に示す各項目について検討した。解離発症前の大動脈を摘出し、解離に先だって起こる変化についても同様に検討した。

#### ヒト解離組織を用いた検討

解離患者の手術時に切除した解離組織を用い、免疫染色による組織学的検討を行った。

	動物モデル	ヒト解離組織
観察項目	肉眼像 組織像 細胞内シグナル M1/M2機能分化	組織像 細胞内シグナル

表 1. 本研究の実験系と観察項目

### 4. 研究成果

#### マウス解離モデル

mSOCS3-KO にアンジオテンシン II を投与し、1 週目と 6 週目で野生型と比較した。1 週目では野生型、mSOCS3-KO とも腎動脈上部に小さな中膜損傷を来した。6 週目では野生型の中膜損傷が修復されていたのに対し、mSOCS3-KO では同部の解離へと進行していた(図 2)。

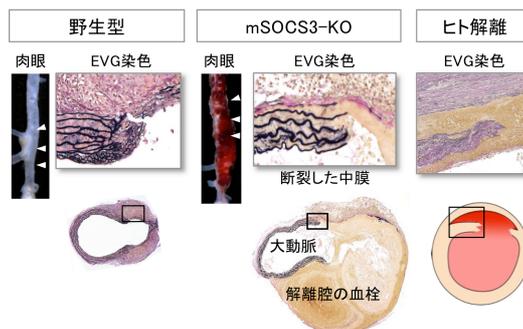


図 2. mSOCS3-KO では 6 週後までにヒトと類似した解離を発症した。

解離発症前の1週目の大動脈を用い、遺伝子発現を調べた。コントロールと比較し、sham、アンジオテンシン II 負荷により発現に変化のあった827遺伝子の機能を調べた。解離に先だって細胞増殖、続いて炎症応答に関連する遺伝子群で発現が亢進しており、それはmSOCS3-KOでより強い傾向にあった。また、mSOCS3-KOでは平滑筋の細胞骨格に関連する遺伝子群で発現が抑制されていた。解離発症前に増殖している細胞を同定するため平滑筋マーカーである $\alpha$ SMAと細胞増殖マーカーであるKi67の二重染色を行った。平滑筋と外膜に浸潤した炎症細胞で細胞増殖が見られた(図3)。

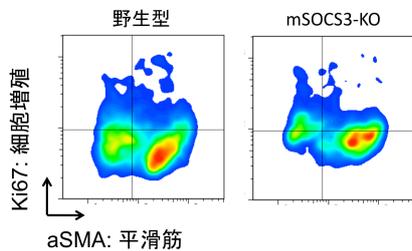


図3. mSOCS3-KOでは平滑筋および非平滑筋で細胞増殖シグナルが高い傾向にあった。

解離発症前のマクロファージIL-6系シグナルについて野生型とmSOCS3-KOを比較したところ、中膜損傷に浸潤したマクロファージの数やIL-6下流のSTAT3活性化に差はなかった。そこでマクロファージの機能を評価するため、大動脈組織のフローサイトメトリーを行ってマクロファージの活性化マーカーであるLy-6Cの発現状態を比較した。すると野生型の中膜損傷に浸潤したマクロファージでは炎症性M1:抗炎症性M2がおよそ1:1であったのに対し、mSOCS3-KOではM1:M2が2:1に増加していた(図4)。

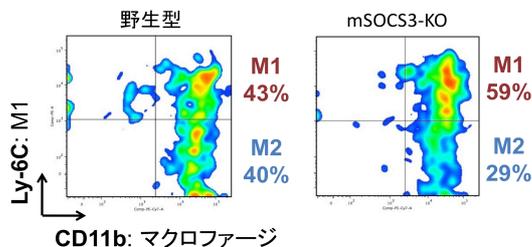


図4. mSOCS3-KOのマクロファージは野生型と比較しM1分化能が亢進していた。

#### ヒト解離組織

解離した血管では外膜、外膜に近い中膜、血腫内部で多くのマクロファージ浸潤が見られた。ま

た、STAT3活性化も同部位でより強く見られ、マクロファージSTAT3活性化も見られた。また、細胞増殖マーカーであるKi67も外膜や外膜に近い中膜で強く発現していた。

#### まとめ

マクロファージのIL-6感受性を高めたmSOCS3-KOではアンジオテンシンIIによる解離を発症することを発見し、解離発症前の大動脈ですでに遺伝子発現、マクロファージ機能分化に変化が起こっていることを発見した。

mSOCS3-KOでは解離に先立って細胞増殖・炎症応答に関連する遺伝子群で発現亢進が、平滑筋の細胞骨格に関連する遺伝子群で発現抑制が見られたが、これらの変化はヒト解離の遺伝子発現を解析した過去の報告(*Eur J Vasc Endovasc Surg* 2002)と同様の変化であった。さらに、本研究ではマウス解離では中膜平滑筋と外膜に浸潤した炎症細胞で、ヒト解離では外膜に近い中膜の平滑筋と外膜の炎症細胞で細胞増殖シグナルが亢進していることを同定した。外膜炎症細胞にはマクロファージが含まれており、細胞増殖しながら炎症性のM1に機能分化し、炎症の増悪、組織構築の破壊を招いて解離へと進展することが示唆された。また、平滑筋における細胞増殖は、遺伝子発現で示された平滑筋の細胞骨格の変化、ひいては大動脈組織の脆弱性に寄与している可能性があり、大動脈組織強度について今後検討していく。

マクロファージ機能分化が大動脈に与える影響について分子的な解析を継続するとともに、マクロファージ分化制御を応用した解離抑制療法について研究を進展させている。

#### 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)

[学会発表](計11件)

1. Satoko Ohno: "Molecular Pathogenesis of Aortic Dissection: Macrophage-mediated Changes in Vascular Smooth Muscle-specific Gene Expression" 第79回日本循環器学会学術集会. 2015年4月25日. 大阪国際会議場(大阪府・大阪市)

2. Satoko Ohno: "Involvement of Macrophage IL-6 Signaling in Aortic Dissection" 第 31 回国際心臓研究学会. 2014 年 11 月 28 日. ウィンクあいち (愛知県・名古屋市)
3. Satoko Ohno: "A Common Gene Network Governs The Cellular Phenotypes in Acute Aortic Dissection" American Heart Association Scientific sessions 2014. 17/11/2014. Chicago (USA)
4. Satoko Ohno: "Molecular determinant of the development of acute aortic dissection" ESC Congress 2014. 02/09/2014. Barcelona (Spain)
5. Satoko Ohno: "Involvement of Macrophage Cytokine Signaling in Acute Aortic Dissection" The 18th International Vascular Biology Meeting. 15/04/2014. みやこメッセ (京都府・京都市)
6. Satoko Ohno: "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 年 03 月 23 日. 東京国際フォーラム (東京都・千代田区)
7. Satoko Ohno: "Deciphering the Sequential Molecular Events during Onset of Acute Aortic Dissection" American Heart Association Scientific Sessions 2013. 17/11/2013. Dallas (USA)
8. 大野聡子: "マクロファージ IL-6 シグナル亢進は大動脈解離を増悪させる" 第 9 回西日本血管機能研究会. 2013 年 8 月 10 日. ホテル日航福岡 (福岡県・福岡市)
9. Satoko Ohno: "Macrophage IL-6

Signaling is Critically Involved in the Progression of Acute Aortic Dissection " 第 77 回日本循環器学会学術集会. 2013 年 03 月 16 日. パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

10. 大野聡子: "マクロファージ IL-6 シグナル亢進は大動脈解離を重症化させる" 第 35 回高血圧学会総会. 2012 年 09 月 20 日. ウェスティンナゴヤキャッスル (愛知県・名古屋市)
11. 大野聡子: "大動脈瘤と大動脈解離における STAT3 経路の役割" 第 49 回日本臨床分子医学会学術集会. 2012 年 4 月 14 日. みやこメッセ (京都府・京都市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

大野 聡子 (OHNO, Satoko)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号: 80569418

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者

( )

研究者番号: