

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461142

研究課題名(和文)異なるタイプの動脈瘤(紡錘瘤・嚢状瘤・解離性動脈瘤)発症機序の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of development of different types of aneurysm

研究代表者

磯田 菊生(Isoda, Kikuo)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：00532475

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：IL-1Ra欠損マウスの自然発症大腿動脈瘤形成過程を詳細に観察し、炎症性動脈瘤はまず外膜側の炎症から始まり、次いで内膜肥厚を来し、その後血管径拡大・動脈瘤形成を来すことが分かった。この炎症性動脈瘤形成には炎症惹起能力の高いIL-1Ra欠損炎症細胞が大きく関与していることを明らかにし、論文発表することができた。またこの外膜炎症抑制には糖尿病治療薬の1つであるDPP-4阻害薬が有効であることを見出し、論文発表した。さらに、紡錘瘤や嚢状瘤、解離性動脈瘤では病変部の炎症細胞の構成成分が大きく異なり、発症機序解明につながる所見も得られた。更なる検討を継続し、論文化する予定である。

研究成果の概要(英文)：We detected that the IL-1Ra present in both bone marrow (BM)-derived cells and non-BM cells helps to suppress arterial inflammation and promote re-endothelialization, thus resulting in decreased neointimal formation and development of aneurysm. These novel findings shed new light on the mechanisms underlying the development of aneurysm. We also revealed that a dipeptidyl peptidase 4 inhibitor appeared to suppress neointimal formation by inhibiting inflammation, independently of its effects on glucose or cholesterol metabolism in mice. We have published these articles.

研究分野：分子血管学

キーワード：動脈瘤 炎症 サイトカイン 骨髄 DPP-4阻害

### 1. 研究開始当初の背景

食生活の欧米化や高齢化に伴って、脳卒中や心筋梗塞などの動脈硬化を基盤とした疾患が増加しており、中でも、治療の緊急性が高いと考えられる動脈瘤が、循環器領域で大きな問題として挙げられている。大動脈瘤が進行し、瘤が破裂した場合は致死率が非常に高く、その予後は不良である。このような動脈瘤径が拡大し、破裂の危険性が高い患者に対しては、人工血管置換術やステントグラフト等の、外科的血管内治療が施行され、破裂を未然に防ぐ治療が行われている。しかし瘤拡大を抑える有効な内科的治療は、血圧コントロールや禁煙等の、間接的な方法以外にないのが現状である。従って、動脈瘤の進展機序に作用する有効な内科的治療法が確立されれば、高齢者において身体的負担の大きい外科的治療を回避することができると共に、医療経済に及ぼす影響も大きい。

大動脈瘤の発症進展には炎症性サイトカインや Matrix metalloproteinases (MMPs) などが深く関与することが示唆されているが、その発症機序についてはまだ不明な点が多く、決定的な治療ターゲットは未知のままである。例えば MMPs 阻害剤を例にとっても、臨床的に動脈瘤の進展を抑制できたとの報告はない。このように動脈瘤治療法開発が進んでいない一因として、本疾患に対する適切な動物モデルが存在しなかったことがある。今日の動脈瘤モデルマウスは大動脈に薬物を塗布したり、持続的アンジオテンシン負荷や機械的な負荷を与えたりすることにより作製しており、慢性炎症を基盤とするヒトの動脈瘤モデルとして十分にその病態を反映してないと考えられている。そのためヒトで見られる動脈瘤に近似した自然発症動脈瘤モデル動物の開発が必要である。

申請者は 13 年前より炎症と心血管疾患との関連について研究を続けており、炎症物質のオステオポンチンが動脈硬化を促進すること(Circulation. 2003)や、抗炎症性サイトカインであるインターロイキン 1 受容体アンタゴニスト(以下 IL-1Ra)の欠損マウスが、過剰に惹起された炎症状態で血管傷害後の内膜肥厚(Circulation. 2003)や動脈硬化(Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004)、大動脈弁狭窄症(Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2010)が進行しやすいことを報告してきた。さらに最近、IL-1Ra 欠損マウスが血圧や血中コレステロールレベル非依存的に大腿動脈瘤を自然発症することを見出した(Am J Pathol. 2012)。このマウスでは生後 8 ヶ月齢より動脈血管面積と血管内皮 + 中膜面積が野生型マウスと比較して有意に増大し、9 ヶ月齢では肉眼的にも明らかな瘤を形成した。紡錘瘤の縦切りは動脈瘤の発症から進展までの全経過を観察できると言われている。正常血管の外膜側に多数の炎症細胞の集積が見られたのち内膜肥厚が生じ、その後急速に血管径拡大が見られている。これらの所見は

ヒトの炎症性動脈瘤と非常に類似しており、動脈瘤の発症機序の解明に有用なモデルと考えられる。更に興味深いことにこのマウスは 3 つのタイプの動脈瘤(紡錘瘤・嚢状瘤・解離性動脈瘤)の全てが自然発症を認めた。これらそれぞれのタイプ間や正常血管との比較をマイクロアレーや定量的 PCR、血管特異的プロテオーム解析を用いて行い、それぞれの動脈瘤発症機序にせまる予定である。

### 2. 研究の目的

高齢化が急速に進む我が国において、動脈瘤の罹患者は増加しており、医療行政的にも内科的治療が待望されるところであるが、同疾患が進行した患者に対しては、人工血管置換術やステントグラフト等を用いた血管内治療などの高額な介入が行われているのが現状である。その理由の 1 つとして適切な動脈瘤モデル動物が存在しないため、瘤の進行にいたる機序の解明が進んでおらず、瘤拡大を抑制する内科的な治療法の開発がなされていないことにある。

我々はこれまで、我々が独自に開発した自然発症動脈瘤マウスを用いて、動脈瘤の発症機序の解明に向けた研究を行ってきた。本申請課題では、上記モデルを利用し、紡錘瘤・嚢状瘤・解離性動脈瘤の発症の違いを免疫染色、マイクロアレー、プロテオーム解析等を用いて解明すると共に新たな治療ターゲットを発見することを目的としていた。

### 3. 研究の方法

(1) 10 年以上にわたり施行している免疫染色を 3 つのタイプの動脈瘤の縦切りで施行し、炎症細胞のタイプやサイトカイン、MMPs の発現状態や発現部位に差がないか検討する。更に、現在確立した解析法となっているマイクロアレーと RT-PCR を用いて 3 つのタイプの動脈瘤に対する特異的な遺伝子と共通して変化する遺伝子の同定を行う。既知の遺伝子であれば、それにより誘導されるタンパク発現を Western blot や免疫染色等により確認する。自然発症動脈瘤に関する解析は十分な報告がなされていないため、確立した解析法で得られた結果でも世界で初めてのデータが得られる可能性が非常に高いと思われる。

(2) IL-1Ra 欠損マウスの大動脈瘤発症には、まず動脈の外膜側有意に炎症細胞が集積することが示された。そこで我々は骨髄由来の炎症細胞と血管壁を構成する細胞それぞれの IL-1Ra がどの程度関与しているか検討することとした。この検討のため行った骨髄移植には、野生型マウスと IL-1Ra 欠損マウスより骨髄細胞を採取し、精製した骨髄細胞( $10^7$  cells/mouse)を致死量の照射を行ったマウスに移植し、4 パターンのマウスを作製した(IL-1Ra<sup>-/-</sup> マウス骨髄を IL-1Ra<sup>-/-</sup> マウスへ移植 (BMT<sup>IL-1Ra<sup>-/-</sup> Ra<sup>-/-</sup>)</sup>、

野生型マウスの骨髄を IL-1Ra<sup>-/-</sup> マウスへ移植 (BMT<sup>WT Ra<sup>-/-</sup></sup>)、IL-1Ra<sup>-/-</sup> マウスの骨髄を野生型マウスへ移植 (BMT<sup>Ra<sup>-/-</sup> WT</sup>)、および野生型マウスの骨髄を野生型マウスへ移植 (BMT<sup>WT WT</sup>)。移植後、それぞれのマウスに大腿動脈瘤形成の初期病変と同じ変化を惹起できるカフ傷害を加えた。傷害 2 週間後に灌流固定を行い、組織学的検討を行った。炎症性マクロファージの機能を明らかにするため、BMT<sup>Ra<sup>-/-</sup> Ra<sup>-/-</sup></sup> マウスと BMT<sup>WT Ra<sup>-/-</sup></sup> マウスより腹腔内マクロファージを採取し、mRNA 発現と遊走能の比較を行った。

(3) 最近の研究で dipeptidyl-peptidase-4 (DPP-4) 阻害薬に抗動脈硬化作用があることが報告された。しかし、外膜慢性炎症モデルにおいて DPP-4 阻害薬が血管の炎症や内膜肥厚を抑制するか、否かは明らかにされていない。そこで我々は DPP-4 阻害薬の 1 つである alogliptin (AGP) の LDL 受容体欠損 (LKO) マウスにおける慢性外膜炎症に対する効果を検討した。LKO マウス(8-10 週齢)に持続炎症としてカフ傷害を加え、通常食で飼育をした。DPP-4 阻害薬は無菌水にて溶解し、最終濃度を 1mg/mL とし 4 日に保管し、使用直前に室温に戻した。我々は AGP (20mg/kg/day) もしくは生食を傷害前日から 14 日間 1 日 1 回経口投与した。傷害 14 日後に 12 時間絶食後、血液サンプルを採取し、血清脂質レベルや glucagon-like peptide-1 (GLP-1) 活性の測定を行なった。採決後に麻酔下で血管を採取し、形態の観察や免疫染色を施行した。免疫染色は、平滑筋細胞に対し  $\alpha$ -smooth muscle cell actin ( $\alpha$ -SMA) 染色、細胞増殖検出には proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 染色、炎症細胞に対しては lymphocyte antigen 6 複合体 (Ly-6G) 染色を行った。サイトカイン・ケモカイン染色には TNF $\alpha$  染色と monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) 染色を行い、活性 nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) の検出には phospho-NF- $\kappa$ B p65 染色を用いた。血管傷害 3 日後に血管採取と RNA 抽出を行い、定量的 PCR を用いて TNF $\alpha$ 、MCP-1、IL-1、および GAPDH の発現を検討した。

(4) 我々はより大きな動脈瘤検体をえるため、IL-1Ra 欠損 (IL-1Ra<sup>-/-</sup>) マウスにアンジオテンシン II (Ang II) 負荷を行い腹部大動脈瘤形成が生じるかを検討することにした。IL-1Ra<sup>-/-</sup> マウスと野生型マウスを無作為に以下の 4 群に分けた。(a) 野生型マウスに生食投与群;(b) IL-1Ra<sup>-/-</sup> マウスに生食群;(c) 野生型マウスに Ang II 投与群;(d) IL-1Ra<sup>-/-</sup> マウスに Ang II 投与群の 4 群である。高血圧および血管炎症は Ang II (1000ng/kg/分) を浸透圧ポンプ (Alzet) を用いて持続投与することで惹起した。持続投与 7 日後、各群の 4 匹から 8 匹をと殺し、大動脈から mRNA

とタンパクを抽出した。収縮期血圧は持続投与開始前から 14 日後まで 1 日 1 回 tail-cuff 法 (MK-2000; Muromachi Kikai) にて測定した。7 時間の絶食後、血液を採取し、全コレステロールと high-density lipoprotein (HDL) コレステロール、および血清 IL-6 レベルを測定した。mRNA 発現は定量的 PCR を用いて解析した。採血後、灌流固定を行い、採取した大動脈の組織学的解析を行った。

(5) 最後に in vivo biotinylation 法の解析を行った。この方法は、疾患モデル動物に対して、抗体等のラベル化に広く用いられている水溶性ビオチン化試薬を直接血管内に投与・灌流し、in vivo におけるタンパク質の発現状態そのままに、細胞膜タンパク質をラベル化・回収出来る方法である。この利点は、直接ラベル化試薬を全身的に灌流するため、組織中の血管内皮細胞に発現するタンパク質を効率よくラベル化出来る、ラベル化に水溶性ビオチン化試薬を用いるため、細胞膜を透過せず、細胞内タンパク質の混入を効率よく排除出来る、In vitro で培養された細胞を用いる必要がないため、培養による artifact に干渉されない、ラベル化試薬を選択することで、細胞表面ばかりでなく、組織中に発現している細胞外マトリクス等の成分も視野に入れた解析も可能になる、等が挙げられる。本研究では、血管内皮細胞の解析だけでなく、細胞外マトリクスの変異も観察可能であり、内皮細胞・マトリクスの両面を同時に解析できる。このため、動脈瘤発症の分子マーカーを探索する上で、極めて有用な方法であると考えた。

#### 4. 研究成果

(1) IL-1Ra 欠損マウスの自然発症大腿動脈瘤形成過程を詳細に観察し、炎症性動脈瘤はまず外膜側の炎症から始まり、次いで内膜肥厚を来し、その後血管径拡大・動脈瘤形成を来すことが分かった。さらに、紡錘瘤や嚢状瘤、解離性動脈瘤では病変部の炎症細胞の構成成分が大きく異なり、発症機序解明につながる所見も得られた。

(2) 前述の炎症性動脈瘤形成には炎症惹起能力の高い IL-1Ra 欠損炎症細胞が大きく関与しているが示唆されたため、我々は次に骨髄移植による検討を行った。骨髄移植 4 週後、4 群間で体重 (BMT<sup>Ra<sup>-/-</sup> Ra<sup>-/-</sup></sup> マウス: 24.5  $\pm$  0.8, BMT<sup>WT Ra<sup>-/-</sup></sup> マウス: 25.5  $\pm$  0.7, BMT<sup>Ra<sup>-/-</sup> WT</sup> マウス: 25.3  $\pm$  0.6, BMT<sup>WT WT</sup> マウス: 26.1  $\pm$  0.6 g)、収縮期血圧 (90  $\pm$  9, 97  $\pm$  5, 100  $\pm$  4, or 96  $\pm$  8 mmHg)、および全コレステロール値 (101  $\pm$  4, 95  $\pm$  3, 98  $\pm$  3, 102  $\pm$  4 mg/dL) で有意差はなかった (各群 n=6 匹)。カフ傷害後、BMT<sup>WT Ra<sup>-/-</sup></sup> マウスの内膜肥厚は BMT<sup>Ra<sup>-/-</sup> Ra<sup>-/-</sup></sup> マウスと比較すると有意に減少したが (p<0.001)、BMT<sup>Ra<sup>-/-</sup> WT</sup> マ

ウス( $p < 0.01$ )や、 $BMT^{WT/WT}$  マウス( $p < 0.01$ )と比較すると有意に増大していた。一方、 $BMT^{Ra-/Ra-}$  マウスの内膜は、 $BMT^{WT/WT}$  の内膜肥厚より有意に増大していた ( $p < 0.05$ )。

以前の研究で血管傷害後の早期の再内皮化が内膜肥厚を抑制することが報告されているので、我々は内皮細胞マーカーである CD31 の免疫染色を行った。CD31 陽性面積は  $BMT^{Ra-/Ra-}$  マウス ( $n=12$ ) で他の 3 群より有意に減少していた (各群  $n=12$ ) ( $p < 0.001$ )。このことは、骨髄由来細胞からの IL-1Ra と非骨髄由来細胞からの IL-1Ra が共に傷害後の内皮細胞保護に寄与していることを示唆している。さらに、我々はマクロファージ (Mac3) と血管平滑筋 ( $\alpha$ -SMA) の免疫染色を施行した。外膜側の Mac3 陽性細胞は  $BMT^{Ra-/Ra-}$  マウス ( $n=12$ ) で他の 3 群と比較すると有意に増大していた (各群  $n=12$ ) ( $p < 0.001$ )、この 3 群間には有意差はなかった。 ( $BMT^{Ra-/Ra-}$  マウス:  $280 \pm 33$ 、 $BMT^{WT/Ra-}$  マウス:  $64 \pm 5$ 、 $BMT^{Ra-/WT}$  マウス:  $73 \pm 10$ 、 $BMT^{WT/WT}$  マウス:  $54 \pm 7$  (細胞数))。更に、新生内膜内の Mac3 陽性面積も  $BMT^{Ra-/Ra-}$  マウス ( $n=12$ ) で他の 3 群より有意に増大していた (各群  $n=12$ ) ( $p < 0.001$ )。このことは、IL-1Ra 欠損マクロファージが野生型マクロファージより傷害血管内で活性化していることを示唆している。一方、 $\alpha$ -SMA 陽性面積は  $BMT^{Ra-/Ra-}$  マウスの新生内膜で ( $n=12$ ) 他の 3 群と比較すると有意に減少していた (各群  $n=12$ ) ( $p < 0.001$ )。この結果は骨髄由来細胞と非骨髄由来血管構成細胞より分泌される IL-1Ra は共に傷害後の炎症を抑え、 $\alpha$ -SMA 陽性面積の割合を増加させたと考えられた。

Mac3 陽性細胞が  $BMT^{WT/Ra-}$  マウスで  $BMT^{Ra-/Ra-}$  マウスより有意に減少していたことより、我々は IL-1Ra がマクロファージの機能を変化させているのではないかと考えた。マクロファージ機能に及ぼす IL-1Ra の作用を検討するため、 $BMT^{Ra-/Ra-}$  マウスと  $BMT^{WT/Ra-}$  マウスから採取した腹腔内マクロファージにおける IL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$ 、および CCR2 の mRNA 発現を調べた。炎症性サイトカインに関しては、IL-1 ( $2.8$  倍、 $P < 0.01$ ) と TNF $\alpha$  ( $12.1$  倍、 $P < 0.01$ ) 共に  $BMT^{Ra-/Ra-}$  マウスより採取したマクロファージで  $BMT^{WT/Ra-}$  マウスより採取したマクロファージより有意に発現が亢進していた。更に、CCR2 mRNA レベルも  $BMT^{Ra-/Ra-}$  マウスより採取したマクロファージで  $BMT^{WT/Ra-}$  マウスより採取したマクロファージの  $4.9$  倍と有意に高値を示した ( $P < 0.001$ )。これらの結果は同じ刺激であっても、 $BMT^{Ra-/Ra-}$  マウスからのマクロファージは  $BMT^{WT/Ra-}$  マウスのマクロファージより過剰に活性化される可能性を示している。

次いで、CCR2 上昇の機能的意義を明らかにするため、MCP-1 に対する遊走能を  $BMT^{Ra-/Ra-}$  マウスと  $BMT^{WT/Ra-}$  マウスから

採取したマクロファージで比較した。 $BMT^{Ra-/Ra-}$  マウスより採取したマクロファージ ( $n=6$ ) の遊走能は  $BMT^{WT/Ra-}$  マウスより採取したマクロファージ ( $n=6$ ) の  $4.6$  倍亢進していた ( $P < 0.01$ )。これらの結果は  $BMT^{Ra-/Ra-}$  マウスにおける新生内膜内への炎症細胞浸潤増加の理由を示している可能性がある。IL-1Ra の免疫染色では、 $BMT^{WT/WT}$  マウスと  $BMT^{WT/Ra-}$  マウスの外膜側炎症細胞の多くが IL-1Ra 発現しているが、 $BMT^{Ra-/WT}$  マウスと  $BMT^{Ra-/Ra-}$  マウスの炎症細胞では IL-1Ra を発現していないことが確認された。一方、新生内膜と中膜平滑筋においては、 $BMT^{WT/WT}$  マウスと  $BMT^{Ra-/WT}$  マウスでは IL-1Ra 発現を認めたと、 $BMT^{WT/Ra-}$  マウスと  $BMT^{Ra-/Ra-}$  マウスでは IL-1Ra を発現していなかった。このことは、炎症細胞は骨髄由来であるが、内皮は非骨髄由来血管構成細胞から生じていることを示唆している。予想されたように、 $BMT^{Ra-/Ra-}$  マウスでは血清 IL-1Ra は検出されず、 $BMT^{WT/WT}$  マウスが 4 群で最も高い値を示した。興味深いことに、血清 IL-1Ra レベルは  $BMT^{Ra-/Ra- \rightarrow WT}$  マウスの方が  $BMT^{WT \rightarrow Ra-}$  マウスより有意に高値であった。この結果は非骨髄由来細胞が血清 IL-1Ra タンパクを分泌していることを示している。これらの実験系で得られた所見は骨髄由来細胞と非骨髄細胞の両方における IL-1Ra が外膜慢性炎症における血管のリモデリングを抑制していることを示していると思われた。

(3) LKO マウスを 生食(control) もしくは AGP にてカフ傷害後 14 日飼育した。血圧、空腹時血糖、および脂質レベルは AGP 群と生食群で有意差が無かった。非空腹時の採血で活性 GLP-1 レベルは AGP 群で生食群より有意に高値であり ( $22.2 \pm 1.9$  vs  $15.6 \pm 0.9$  pg/ml;  $p < 0.05$ )、DPP-4 阻害作用がえられていることが示された。

外膜慢性炎症 14 日後の新生内膜を計測したところ、生食群と比較して、AGP 群で有意に抑制されていた ( $1,087 \pm 127$  vs.  $1,896 \pm 140 \mu m^2$ ;  $p < 0.001$ )。  $\alpha$ -SMA 陽性面積は AGP 群で生食群と比較すると有意に減少していた (%  $\alpha$ -SMA 陽性面積:  $30.8 \pm 3.1$  vs.  $45.4 \pm 6.0\%$ ,  $P < 0.001$ )。細胞増殖を見た %PCNA 陽性核も、生食群と比較して AGP 群で有意に低下していた ( $1.5 \pm 0.2$  vs.  $11.5 \pm 0.8\%$ ;  $p < 0.001$ )。新生内膜内での Ly-6G 陽性面積も生食群より AGP 群で有意に減少していた ( $4.3 \pm 0.5$  vs.  $10.9 \pm 2.8\%$ ;  $p = 0.012$ )。

次に、サイトカイン・ケモカイン発現を RT-PCR と免疫染色で検討した。免疫染色による血管壁内 TNF $\alpha$  陽性面積と MCP-1 陽性面積は生食群と比較して AGP 群で有意に減少していた (TNF $\alpha$ :  $1.4 \pm 0.6$  vs.  $4.8 \pm 1.0\%$ ;  $p < 0.05$ , MCP-1:  $2.5 \pm 0.5$  vs.  $5.4 \pm 0.4\%$ ;  $p < 0.05$ )。RT-PCR による傷害血管の mRNA 発現は TNF $\alpha$ 、MCP-1、および

IL-1 いずれも AGP 群で有意に抑制されていた (TNF $\alpha$  :  $0.49 \pm 0.05$  vs.  $1.00 \pm 0.13$ ;  $p < 0.05$ , MCP-1:  $0.34 \pm 0.06$  vs.  $1.00 \pm 0.09$ ;  $p < 0.01$ , IL-1 :  $0.16 \pm 0.03$  vs.  $1.00 \pm 0.25$ ;  $p < 0.05$ ).

最後に傷害後の NF- $\kappa$ B 活性化に及ぼす AGP の作用を検討するため傷害 7 日目の pNF- $\kappa$ B 染色を施行した。生食群と比較して AGP 群で pNF- $\kappa$ B 陽性細胞は有意に減少していた ( $11.9 \pm 1.1$  vs.  $20.6 \pm 1.7$  %;  $p < 0.05$ ).

これらの結果をまとめると AGP は血糖やコレステロールのコントロール作用とは独立して、外膜慢性炎症に対する新生内膜肥厚抑制効果を持っていることが示された。これは、炎症性動脈瘤の炎症抑制効果を AGP は有している可能性を示唆している。

(4) 体重、心拍数、コレステロールレベルに 4 群間で有意差は見られなかった。Ang II 持続投与 14 日後の収縮期血圧は、IL-1Ra $^{-/-}$ マウス ( $110 \pm 1$  から  $171 \pm 7$  mmHg;  $p < 0.001$ ) と野生型マウス ( $98 \pm 3$  から  $135 \pm 5$  mmHg;  $p < 0.002$ ) の両方で有意な上昇が見られた。更に、IL-1Ra $^{-/-}$ マウスの収縮期血圧は野生型マウスと比較して有意に高かった。しかし、生食投与では IL-1Ra $^{-/-}$ マウスと野生型マウスの収縮期血圧に有意差はなかった。Ang II 誘導の IL-6 産生に対する IL-1Ra の作用を検討するために、血清 IL-6 レベルを測定した。Ang II 投与 IL-1Ra $^{-/-}$ マウスの血清 IL-6 レベルは ( $1046 \pm 250$  pg/mL)、AngII 投与野生型マウス ( $182 \pm 62$  pg/mL) の約 5.8 倍高値であった。投与 7 日後の定量的 PCR では IL-1Ra $^{-/-}$ マウスの大動脈では野生型マウスの大動脈と比較して IL-6 (2.1 倍,  $p < 0.01$ )、TNF $\alpha$  (4.1 倍,  $p < 0.01$ )、および MMP-9 (20.3-fold,  $p < 0.05$ ) の mRNA 発現が有意に高値であった。

腹部大動脈径に関しては、AngII 投与の IL-1Ra $^{-/-}$ マウスで AngII 投与の野生型マウスより有意な増大を認めた ( $1.51 \pm 0.34$  vs.  $0.80 \pm 0.04$  mm,  $p < 0.01$ )。組織学的検討では、IL-1Ra $^{-/-}$ マウスで野生型マウスより外膜側に有意な炎症細胞の集積を認めた。更に、エラスチン染色では IL-1Ra $^{-/-}$ マウスの中膜弾性板の断裂を認めた。免疫染色では TNF- $\alpha$  タンパクの発現が IL-1Ra $^{-/-}$ マウスで野生型マウスより有意に亢進していることが示された。

これらの結果は IL-1Ra の欠損が AngII 投与による炎症が増強し、腹部大動脈瘤を惹起することが示された。

(5) 各種大動脈瘤に水溶性ビオチン化試薬を直接血管内に投与・灌流し、in vivo におけるタンパク質の発現状態そのままに、細胞膜タンパク質をラベル化・回収することに成功した。今後は回収したサンプルの解析を進め、論文作成する予定である。

## 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 3 件)

Isoda K, Akita K, Isobe S, Niida T, Adachi T, Iwakura Y, Daida H. Interleukin-1 receptor antagonist originating from bone marrow-derived cells and non-bone marrow-derived cells helps to suppress arterial inflammation and reduce neointimal formation after injury. *J Atheroscler Thromb*, 査読有, 21, 2014, 1208-1218. <http://doi.org/10.5551/jat.25668>

Akita K, Isoda K, Shimada K, Daida H. Dipeptidyl-peptidase-4 inhibitor, alogliptin, attenuates arterial inflammation and neointimal formation after injury in low-density lipoprotein (LDL) receptor-deficient mice. *J Am Heart Assoc*, 査読有, 4, 2015, e001469. DOI:10.1161/JAHA.114.001469

Akita K, Isoda K, Okabayashi Y, Shimada K, Daida H. Lack of IkBNS accelerates atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice via increased interleukin-6 production. *Int J Cardiol*, 査読有, 2016, 211, 61-63. DOI:10.1016/j.ijcard.2016.02.142

[学会発表](計 16 件)

Kikuo Isoda, Sarasa Isobe, Koji Akita, Tomiharu Niida, Takehiko Kujiraoka, Yasunaga Shiraishi, Takeshi Adachi. Interleukin-1 Receptor Antagonist from both Bone Marrow-Derived Cells and Non-bone Marrow Cells Helps Suppress Arterial Inflammation and Reduces Neointimal Formation after Injury. The 78th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. Tokyo, 2014 年 3 月 21 日-23 日. Sarasa Isobe, Tomiharu Niida, Koji Akita, Takehiko Kujiraoka, Yasunaga, Shiraishi, Kikuo Isoda. The 78th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. Tokyo, 2014 年 3 月 21 日-23 日.

Koji Akita, Kikuo Isoda, Hiroyuki Daida. Deficiency of Interleukin-1 Receptor Antagonist Promotes Angiotensin II-induced Aortic Inflammation and Aneurysm. AHA Scientific Session 2014. Chicago, 2014 年 11 月 15 日-19 日.

Koji Akita, Kikuo Isoda, Hiroyuki

Daida. The Role of Interleukin-1 Receptor Antagonist in the Suppression of Aortic Inflammation and Aneurysm after Angiotensin II Infusion. Osaka, 2015年4月24日-26日.

Koji Akita, Kikuo Isoda, Hiroyuki Daida. Interleukin-1receptor antagonist contributes to the suppression of both angiotensin II-induced hypertention and organ damage. ESC congress 2015, London, 2015年8月29日-9月2日

〔図書〕(計 1件)

磯田菊生、代田浩之. 日本医事新報、心血管疾患発症に対する抗サイトカイン療法、2014、63

6. 研究組織

(1)研究代表者

磯田 菊生 (ISODA, Kikuo)  
順天堂大学・医学部・准教授  
研究者番号：00532475