

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870718

研究課題名(和文)好中球由来のMMP9を介した急性大動脈解離の発症機構

研究課題名(英文)Neutrophil-derived matrix metalloproteinase 9 triggers acute aortic dissection

研究代表者

清水 良子 (Shimizu-Hirota, Ryoko)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：30348643

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：大動脈解離(AAD)患者ではMMP9血中濃度が上昇し、患部血管手術標本ではMMP9が好中球と一致して上昇していた。BAPNを前投与したマウスにAngIIを投与してAADを惹起させるマウスモデルの検討から、MMP9阻害剤投与でAAD発症率が低下し、MMP9ノックアウトマウスではAADがほぼ完全に抑制された。好中球除去もAADの発症は減少した。AAD患部血管では酸化ストレスが有意に亢進し、酸化ストレス阻害剤投与でマウスAAD発症率とMMP9産生が減少した。血管平滑筋細胞と好中球の共培養から、血管平滑筋細胞をAngIIで刺激すると好中球のMMP9産生が亢進し、酸化ストレス阻害剤で抑制された。

研究成果の概要(英文)：We found MMP9 was elevated significantly in blood samples from acute aortic dissection (AAD) patients. Using a novel AAD model by infusing angiotensin II to immature mice that had been received a lysyl oxidase inhibitor, we found the incidence of AAD was reduced significantly following the administration of an MMP inhibitor and was almost blocked completely in MMP9(-/-) mice. Neutrophil depletion also significantly decreased the incidence of AAD. Oxidative stress is upregulated in the AAD aorta and an oxidative stress inhibitor reduced the incidence of AAD and the production of MMP9. Coculture experiments using vascular smooth muscle cells and neutrophils revealed the upregulation of MMP9 by neutrophils following AngII stimulation of VSMCs, which was blocked by ROS inhibitor. These data suggest that AAD is initiated by neutrophils that have infiltrated the aortic intima and released MMP9 in response to angiotensin II and the following oxidative stress upregulation.

研究分野：血管医学

キーワード：大動脈解離 MMP9

1. 研究開始当初の背景

急性大動脈解離 (AAD) は致死率が高い循環器救急疾患である。しかしながら AAD にはこれまで適切な動脈モデルがなく、発症機序の研究が進んでおらず、診断についても画像診断以外の有用なバイオマーカーは見つかっていない。これまで慢性血管病変でのマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) の関与は知られていたが、急性期大動脈解離での MMP の関与は明らかにされていなかった。研究開始当初、本研究者の予備的検討から、AAD 患者血液の各種 MMP 濃度のスクリーニングを行い、MMP9 が AAD 患者血液において上昇することが示唆された。また本研究者の予備的検討から幼若マウスにリシルオキシダーゼ阻害剤である BAPN を前投与して大動脈瘤を形成しておき、そこにアンジオテンシン II (AngII) を投与すると大動脈解離が惹起されることが明らかとなった。

2. 研究の目的

本研究ではまず MMP9 が AAD のバイオマーカーとして有用であることをヒト AAD 患者の血液検体および患部血管手術標本を用いて確認することを目的とする。さらに本研究者が世界で初めて確立した AAD マウスモデルを用いて、AAD 発症における MMP9 の機能的な関与を検討し、AAD の病態への MMP9 の関与を解明する。また細胞培養実験を用いて、AAD における MMP9 産生亢進の機序を明らかにする。本研究により、AAD の診断・治療法の向上を目指す。

3. 研究の方法

(1) ヒト未破裂大動脈瘤患者およびヒト急性期大動脈解離患者の血液検体の収集を増やして N を増やして血中 MMP9 を測定する。またヒト大動脈解離患者の手術検体を収集し、患部血管の組織免疫染色により MMP9 の発現、局在および血球との共局在を検討する。

(2) 幼若マウスにリシルオキシダーゼ阻害剤である BAPN を前投与して大動脈瘤を形成し、そこに AngII を投与して大動脈解離を惹起させ AAD マウスモデルを作成する。このマウスモデルの血管の組織免疫染色および zymography, RT-PCR を行い、AAD マウスモデル患部血管でもヒト検体同様好中球由来 MMP9 が上昇していることを確認する。

(3) AAD マウスモデルに MMP 活性阻害剤である ON04817 を全投与して AAD 発症率の変化を見る。また AAD マウスモデルに Gr1 抗体を前投与して好中球を除去し、AAD の発症率を確認する。さらに MMP9 ノックアウトマウスを用いて AAD モデルを作成し AAD 発症率を検する。

(4) 幼若マウスに BAPN を前投与したのち AngII を投与した群とノルエピネフリン (NE) を投与した群で AAD の発症率を比較する。AAD マウスモデル患部血管に DHE 染色を行い酸化ストレスの産生について検討する。ヒト大動脈解離患者患部検体標本の DHE 染色を行い AAD 患部血管での酸化ストレスを評価する。マウス Gr1 抗体投与群患部血管での DHE 染色を行う。酸化ストレス阻害剤である apocynin を AAD マウスモデルに投与して AAD 発症率および MMP9 産生への影響を検討する。

(5) 血管平滑筋細胞と好中球の共培養を行う。AngII で血管平滑筋細胞を刺激し、好中球からの MMP9 産生に与える影響を検討する。さらに apocynin を加えて MMP9 産生に変化が起こるかどうかを検討する。

4. 研究成果

(1) ヒト急性期大動脈解離患者ではヒト未破裂大動脈瘤患者にくらべて有意に血中 MMP9 濃度が上昇していた。またヒト大動脈解

離患者の患部血管では好中球の患部集積と MMP9 の発現上昇が見られ、MMP9 は好中球との共局在を示した。

(2) AAD マウスモデル患部血管でもヒト検体同様好中球由来 MMP9 が上昇していることが確認された。

(3) AAD マウスモデルに MMP 活性阻害剤である ONO4817 の前投与を行うと AAD の発症が抑制された。また AAD マウスモデルに Gr1 抗体を前投与して好中球を除去することでも AAD の発症率は抑制された。MMP9 ノックアウトマウスに BAPN を投与しても動脈瘤の形成に変化は見られなかったが、これに AngII を投与すると AAD の発症はほぼ完全に抑制された。

(4) 幼若マウスに BAPN を前投与したのちノルエピネフリン (NE) を投与しても AAD を惹起することはできなかった。AngII を投与して AAD を発症したマウスの患部血管の DHE 染色では酸化ストレスの亢進が確認された。ヒト大動脈解離患者患部検体標本の DHE 染色からも酸化ストレスの亢進が確認された。マウス Gr1 抗体投与群血管では DHE 染色は減少していた。酸化ストレス阻害剤である apocynin を AAD マウスモデルに投与すると AAD 発症は有意に減少し、血管での MMP9 産生は抑制された。

(5) AngII で血管平滑筋細胞を刺激すると共培養した好中球からの MMP9 産生は亢進した。さらに apocynin を加えると MMP9 産生は抑制された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Anzai A, Shimoda M, Endo J, Kohno T, Katsumata Y, Matsuhashi T,

Yamamoto T, Ito K, Yan X, Shirakawa K, **Shimizu-Hirota R**, Yamada Y, Ueha S, Shinmura K, Okada Y, Fukuda K, Sano M.

Adventitial CXCL1/G-CSF expression in response to acute aortic dissection triggers local neutrophil recruitment and activation leading to aortic rupture. 査読あり

Circulation Research 2015,116(4):612-23.
doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.304918.

〔学会発表〕(計 4 件)

清水良子、好中球由来 MMP9 が急性大動脈解離を誘発する、2015/04/23-25、ホテルニューオータニ東京 (東京都千代田区)、日本内分泌学会第 88 回学術総会

清水良子、好中球由来 MMP9 を介した急性大動脈解離の発症機構、2013/10/24-26、大阪国際会議場 (大阪府大阪市)、日本高血圧学会第 36 回総会

清水良子、好中球由来 MMP9 を介した急性大動脈解離の発症機構、2013/09/26-28、大阪千里阪急ホテル (大阪府豊中市)、日本血管生物医学会第 21 回学術集会、招待講演

清水良子、好中球由来 MMP9 を介した急性大動脈解離の発症機構、2013/08/16-17、大阪千里ライフサイエンスセンター (大阪府豊中市)、日本病態プロテアーゼ学会第 18 回学術集会

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

なし

6．研究組織

(1)研究代表者

清水良子（Shimizu-Hirota, Ryoko）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：30348643

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし