

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09157

研究課題名(和文) 腹部大動脈瘤の形成・進展におけるインテグリンの関与とその治療に向けた基盤構築

研究課題名(英文) The role of integrin in the development of abdominal aortic aneurysm

研究代表者

三好 亨 (MIYOSHI, Toru)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：70444651

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：腹部大動脈瘤は発見されてもその進展を完全に抑制することは临床上困難であり、一旦破裂するとその予後は極めて不良である。本研究では、腹部大動脈瘤の進展に  $\alpha 1$  インテグリンという細胞接着因子が関与することを、遺伝子改変ネズミを用いた実験で明らかにした。 $\alpha 1$  インテグリンが欠損すると、腹部大動脈瘤の破裂が有意に抑制された。 $\alpha 1$  インテグリンを標的とした新しい治療戦略の基盤となる結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：Abdominal aortic aneurysm is a silent disease, but lethal once ruptured. The prevention of AAA expansion and rupture is clinically difficult. This study investigated whether  $\alpha 1$  integrin, an adhesion molecule, is involved in the development of AAA in murine model. Genetic deficiency of  $\alpha 1$  integrin suppressed the rupture of AAA in angiotensin II infusion model. These findings suggest that  $\alpha 1$  integrin may be a promising target to treat AAA.

研究分野：動脈硬化性疾患の発症・進展における細胞外マトリックス関連分子の役割の解明

キーワード：腹部大動脈瘤 接着因子 インテグリン

## 1. 研究開始当初の背景

腹部大動脈瘤は偶然発見されてもその進展を完全に抑制することは临床上困難であり、さらに一旦破裂するとその予後はきわめて不良である。これまで、多くの研究者によって腹部大動脈瘤における炎症に関連する分子と細胞外マトリックス分解の関連が検討されている。しかし、そのメカニズムは未だ十分解明されていない。申請者らはこれまで動脈硬化に重要な慢性炎症に関する分子の探索、ならびにその病態への関与について基礎的検討を行い、その研究成果を発表してきた。これまでの検討で、接着因子の一つである VACAM-1 の遺伝子多型がマウス動脈硬化の進展に関与することを見出し、siRNA を用いた発現抑制の治療応用への可能性も報告した。さらに、別の接着分子である CD44 がヒト腹部大動脈瘤壁に多く発現し、マウスでの実験で CD44 の欠損が慢性炎症と細胞外マトリックス分解の制御を介して、腹部大動脈瘤の進展を抑制することを発見した。このように接着因子が腹部動脈瘤の重要な背景である慢性炎症や細胞外マトリックス分解に関与するメカニズムを明らかにしてきた。さらに、我々は別の接着因子である 1 インテグリンと細胞外マトリックスであるコラーゲンの接着が炎症関連因子の発現増加に重要であることを発見し報告した。これまでの報告によると、1 インテグリンは、炎症や酸化ストレスに対する細胞の活性化に促進的に働き、線維化を抑制するとの報告がある。さらに、予備実験として ApoE 欠損マウスを用いた腹部大動脈瘤モデルでの 1 インテグリンを確認したところ、拡大部の組織に著名な発現増加を認めた。以上のことから、1 インテグリンが腹部大動脈瘤の進展に関与するのではないかと着想するに至った。

## 2. 研究の目的

具体的には、右記の3つの目的を設定した。

ヒト大動脈瘤組織における 1 インテグリンの発現と細胞外マトリックス分解の関連を明らかにする。: 人工血管置換術後に得られたヒト手術標本を用いて、1 インテグリンの発現レベル・部位ならびに炎症細胞浸潤、細胞外マトリックス分解酵素の発現を解析する。

マウス腹部動脈瘤モデルを用いて 1 インテグリンを介する炎症遺伝子ネットワークを明らかにする。: 1 インテグリン/ApoE 二重欠損マウスを作成し、アンジオテンシン II 持続皮下注射によって誘導できるマウス腹部大動脈モデルを作成し、ApoE 単独欠損マウスとの違いを組織学的に解析する。さらに、遺伝子発現変化をマイクロアレイを用いて解析する。

1 インテグリンを標的とした分子イメージングならびに大動脈瘤進展抑制療法の効果を明らかにする。: 1 インテグリンを標的とした分子イメージングの基礎確立、ならびに 1 インテグリン抗体による腹部動脈瘤進展抑制の基礎的検討を行う。

## 3. 研究の方法

ヒト大動脈瘤組織における 1 インテグリンの発現と細胞外マトリックス分解の関連の検討: ヒト腹部大動脈瘤の人工血管置換術の際に得られた大動脈瘤組織全体を収集 (10 症例を目標)。組織はシート状に展開した後、分割する。各分割組織は HE 染色ならびに EVG 染色で観察し、" 正常ゾーン"、" 炎症ゾーン"、ならびに " 無構造ゾーン" に分類する。各ゾーンにおける 1 インテグリン、マクロファージ、リンパ球、マスト細胞を免疫組織学的に検討し、1 インテグリン発現細胞を詳細に調べる。また、ゼラチンゼイモグラフィを行い各分割組織の細胞外マトリックス分解酵素活性を評価する。最終的に総合的にヒト腹部大動脈瘤組織における、1 インテグリンと炎症所見・マトリックス分

解の関連を解析する。また、組織はすべて -80 に保存し、後のマウスの実験結果から 1 インテグリン関連分子（炎症、アポトーシス、細胞外マトリックスの発現を再度検討する。

1 インテグリンを介する炎症性遺伝子ネットワークの解明：腹部動脈瘤モデルとしては、ApoE 欠損マウスにアンジオテンシン II の持続皮下注を 4 週間行う、アンジオテンシン II 誘発モデルを用いる。表現系を詳細に検討するため 1 インテグリン/ApoE 二重欠損マウスと ApoE 単独欠損マウスの両群間での大動脈瘤の進展や病変部での浸潤細胞、サイトカイン・マトリックス分解酵素の発現を検討する。また、免疫組織学的検討、リアルタイム PCR、ゼラチンザイモグラフィも行う。実験的腹部大動脈瘤における 1 インテグリンの分子病態制御機構解明のためマイクロアレイを行う。1 インテグリン/ApoE 二重欠損マウスと ApoE 欠損マウスに腹部大動脈瘤を作製後、遺伝子発現プロファイルを GeneChip(R)Array (Affymetrix 社) を用いて調べ、解析ソフト GeneSpring GT など で解析する。遺伝子発現の検討は、細胞外マトリックスの合成・分解、炎症関連分子、アポトーシス、酸化ストレスなどを主として検討する。

1 インテグリンを標的とした分子イメージングならびに大動脈瘤進展抑制療法の基礎的検討：具体的には以下の 2 つの方向で検討を進める。(A) 1 インテグリンを標的とした生体分子イメージングならびに薬物デリバリーシステムの基礎確立； 1 インテグリン抗体を表面にコートしたリポソームを作成。これを大動脈瘤の生体分子イメージングならびに薬物送達システムに応用する。リポソーム内に体外から検出できる蛍光物質を封入し、可視化を行う。

(B) 1 インテグリン関連の炎症性遺伝子に対する遺伝子治療の基礎的検討； 1 インテグリン抗体を表面修飾した標的リポソーム

を用いて、マウス腹部大動脈瘤の進展抑制効果を検討し、その基盤を確立する。リポソーム内には様々な物質、薬物を封入できるが、本研究ではまず 1 インテグリンを介した炎症性遺伝子に対する siRNA を濃縮して封入する。

#### 4. 研究成果

ヒト大動脈組織において、1 インテグリンの発現は増強していた。とくに動脈瘤が拡大途中の部位で炎症が強く、1 の発現増強はその部位と一致していた。

アンジオテンシン II にて誘導されるマウス腹部大動脈瘤を作成すると、1 インテグリン欠損マウスにおいて、その発生ならびに破裂による死亡が減少した。

1 インテグリン欠損マウスと野生型マウスの組織を比較すると、アポトーシスに関連する遺伝子の変化が認めら、組織でも 1 欠損マウスでアポトーシスが減少していた。

#### 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)

1. Miyoshi T, Suetsuna R, Tokunaga N, Kusaka M, Tsuzaki R, Koten K, Kuniyoshi K, Ito H. Effect of Azilsartan on Day-to-Day Variability in Home Blood Pressure: A Prospective Multicenter Clinical Trial. J Clin Med Res. 2017 Jul;9(7):618-623. doi: 10.14740/jocmr3050w. Epub 2017 May 22. PMID:28611863 査読有
2. Miyoshi T, Murakami T, Sakuragi S, Doi M, Nanba S, Mima A, Tominaga Y, Oka T, Kajikawa Y, Nakamura K, Ito H. Comparable effect of aliskiren or a diuretic added on an angiotensin II receptor blocker on

augmentation index in hypertension: a multicentre, prospective, randomised study.

Open Heart. 2017 Mar 11;4(1):e000591. doi: 10.1136/openhrt-2017-000591. eCollection 2017. PMID:28409014  
査読有

3. Miyoshi T, Nakamura K, Doi M, Ito H. Impact of Ezetimibe Alone or in Addition to a Statin on Plasma PCSK9 Concentrations in Patients with Type 2 Diabetes and Hypercholesterolemia: A Pilot Study. Am J Cardiovasc Drugs. 2015 Jun;15(3):213-9. doi: 10.1007/s40256-015-0119-2. 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

1. H. Otsuka, T. Miyoshi, K. Ejiri, K. Kohno, M. Nakahama, M. Doi, M. Munemasa, M. Murakami, A. Takaishi, K. Nakamura, H. Ito. Remote ischemic preconditioning prevents contrast induced acute kidney injury in patients with stable coronary artery disease following elective PCI: results from the multicenter randomised study. ESC2017, 2017/8/26, Fira Barcelona Gran Via (Barcelona, Spain)
2. T. Ono T. Miyoshi Y. Ohno G. Syokoku K. Yamamoto K. Tokioka Y. Kawai H. Ito. Cardio-ankle vascular index, a novel parameter of subclinical atherosclerosis predicts prognosis in patients at high risk for cardiovascular disease. ESC2017, 2017/8/26, Fira Barcelona Gran Via (Barcelona, Spain)

3. Y. Ohno T. Miyoshi T. Ono K. Nakamura H. Morita H. Ito. Significant impact of type 2 diabetes mellitus on the association of arterial stiffness with left ventricular hypertrophy and left ventricular diastolic function. ESC2017, 2017/8/26, Fira Barcelona Gran Via (Barcelona, Spain)

4. 三好 亨、中村 一文、伊藤 浩. LCZ696 はイソプロテレノール持続投与によって誘発されるラット心筋線維化を抑制する. 第 20 回日本心不全学会学術集会, 2016/10/7, ロイトン札幌 (北海道札幌市)

5. Toru Miyoshi , Kunihisa Kohno , Hirohiko Asonuma , Satoru Sakuragi , Hajime Nakahama , Takefumi Oka , Hiromi Matsubara , Yusuke Kawai , Masayuki Doi , Kazufumi Nakamura , Hiroshi Itoh. Low Number of Circulating CD34 Positive Cell is Associated with Greater Progression of Coronary Calcium Determined by MDCT. 第 80 回日本循環器学会総会, 2016/3/17, 仙台国際センター (宮城県仙台市)

〔図書〕(計 0 件)

〔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：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://okayama-u-cvm.jp>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

三好 亨 (MIYOSHI Totu)  
岡山大学・大学病院・講師  
研究者番号：70444651

### (2) 研究分担者

中村 一文 (NAKAMURA Kazufumi)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授  
研究者番号：10335630

米澤 朋子 (YONEZAWA Tomoko)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：30304299

吉田 賢司 (YOSHIDA Masashi)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・講師  
研究者番号：70532761

伊藤 浩 (ITO Hiroshi)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：90446047