

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10250

研究課題名(和文) 硫化水素(H₂S)による画期的な大動脈瘤治療法の開発

研究課題名(英文) Potential novel treatment for aortic aneurysm with hydrogen sulfide

研究代表者

大塚 裕之(Otsuka, Hiroyuki)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：30441645

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：大動脈瘤は慢性炎症による壁脆弱化のため大動脈の一部が拡張して破裂に至る疾患であり。一方で硫化水素は細胞保護作用や抗炎症作用等を有する生体内の生理活性ガスとして注目されている。本研究によって、ヒト腹部大動脈瘤の病態に内因性H₂Sは関与しておらず、外因性H₂Sドナー(DATS)の刺激により腹部大動脈瘤の病態におけるIL-6系シグナル、MMP-9の抑制効果はなく、MMP-9活性は上昇を認めた。当初の予想に反して、外因性H₂S donor ,Diallyl trisulfide(DATS)には、MMP-9の産生促進効果がある可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Aortic aneurysm is a common and fatal disease, of which molecular mechanism involves chronic inflammation and tissue destruction. On the other hands, Hydrogen sulfide (H₂S) has been recognized as a gasotransmitter molecule with a variety of physiological functions on circulation. In this project, H₂S is not affect the formation of human abdominal aortic aneurysm, and Diallyl trisulfide (DATS), a stable H₂S donor has not been shown to significantly inhibit the expression of IL-6 and MMP-9 on the abdominal aortic aneurysm. However, It was suggested that DATS might have the effect of promoting the production of MMP-9 on the human abdominal aortic aneurysm.

研究分野：大動脈疾患

キーワード：大動脈瘤 硫化水素

1. 研究開始当初の背景

(1) 臨床的背景

大動脈瘤は、原因不明の慢性炎症のため大動脈壁の局所的な脆弱化から拡張をきたし、無症状のまま経過し、突如破裂による突然死を来す疾患である。治療の主眼は破裂予防に置かれるが、有効な薬物療法は無く、確立された治療法は外科的手法のみである。この現状を打開するには病態解明、病態に基づく革新的な治療法、そして治療効果を判定するための新たな病態診断法の開発が急務である。

(2) 学術的背景

従来、大動脈瘤の病態は不明で治癒も不可能と信じられていたが、ストレス応答分子 JNK 阻害薬により炎症病態を制御し、大動脈瘤を治癒させることが可能である。大動脈瘤における JNK 活性化機構には不明な点が多いが、酸化ストレスの関与が指摘されている。近年、一酸化窒素 (NO) と一酸化炭素 (CO) に次ぐ第 3 番目の生理活性ガスとして、硫化水素 (H_2S) が注目されている。 H_2S は CBS、CSE、3MST のいずれかの酵素で L-システイン等から内因性に産生され、細胞保護作用、抗炎症作用を示し、障害組織の JNK 活性を抑制する。現時点では作用の分子メカニズムには不明な点が多いが、その強力な組織保護・抗酸化作用から循環器系疾患への応用が試みられている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、大動脈瘤病態における内因性 H_2S の役割を明らかにし、外因性 H_2S による動脈瘤形成抑制を検討し、治療的応用法を開発することである。

3. 研究の方法

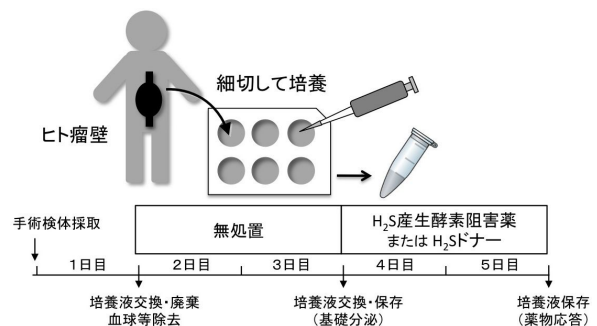
ヒト瘤壁組織：腹部大動脈瘤の人工血管置換術に際して、瘤壁組織の一部を採取する。ヒト大動脈瘤壁を採取し、瘤壁の組織培養を行う。瘤壁組織培養液に外因性 H_2S donor, Diallyl trisulfide (DATS), を添加し刺激を行い、培養液中の炎症性シグナルの

変化を評価。評価項目としては、動脈瘤形成の際、最も影響していると考えられている炎症性サイトカイン IL-6 の値を ELISA 法を用いて、外因性 H_2S donor, Diallyl trisulfide (DATS), 刺激前後の変化を評価した。コントロールとして DMEM+DMSO を用いることとした。DATS の刺激濃度は 0.1M, 0.01M とした。

(1) ヒト大動脈瘤壁組織培養液中の IL-6, MMP-9 の値を ELISA 法にて測定する。

(2) ガスクロマトグラフィーにて、大動脈瘤壁から発生する H_2S を測定する。

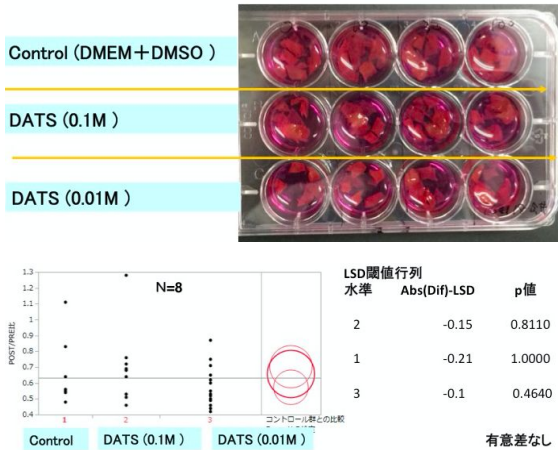
瘤病態における H_2S の機能を検討するために瘤壁組織を全層構造を保ったまま細切 (2 mm 角程度) し培養する。10 日程度は維持可能であり、炎症性サイトカインおよび MMP 分泌アッセイに適している。



	アッセイ方法
形態学的評価	灌流固定標本の瘤径計測、超音波エコー
組織学的解析	ヘマトキシリン・エオジン染色 弾性線維 (EVG) 染色、アザン染色
H_2S 産生系	H_2S 産生酵素、サルフェン硫黄プローブ
ECM破壊応答	MMP-9、MMP-2 (ゼイモグラム)
炎症応答	マルチプレックスアッセイ (Bio-Plex) STAT3、JNK、p38、ERK、Akt、NFkB
網羅的評価	DNAマイクロアレイ

4. 研究成果

(1) 瘤壁培養液中の IL-6 を PRE, POST それぞれ測定
POST/PRE 比で、DATS 刺激による IL-6 抑制効果
を評価した。



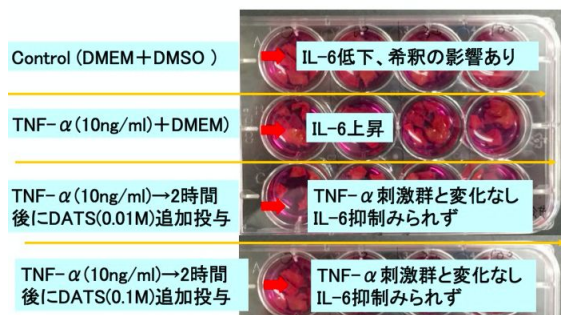
DATS 刺激 0.1M, 0.01M では、瘤壁培養液中の IL-6 を有意に抑制する効果は認められなかった。

以上の結果より

DATS 刺激前に TNF- α (10ng/ml) を加えることで、培養液中の IL-6 が更に増加した状況で、TNF- α を介した IL-6 が DATS 刺激にて抑制されるかを検討した。

この結果は、TNF- α の刺激により培養液中の IL-6 は増加したが、DATS 投与により IL-6 は抑制されなかった。

IL-6 産生促進の観点から、TNF- α の刺激により、動脈瘤壁培養液中の IL-6 産生を促進したが、この環境においても、DATS 投与による IL-6 抑制効果はないと考えられた。



動脈瘤形成に關与する細胞外基質 (MMP-9, MMP-2) の分解亢進を DATS 投与により抑制できるかの検討を Zymogram を用いて検討した。

結果は DATS 投与群において、MMP-9 活性は上昇を認め、当初の予想に反して、外因性 H₂S donor, Diallyl trisulfide (DATS) には、MMP-9 の産生促進効果がある可能性が示唆された。

(2) ガスクロマトグラフィーにて、大動脈瘤壁から発生する H₂S を測定する。

腹部大動脈瘤の人工血管置換術に際して、瘤壁組織の一部を採取し、採取後の瘤壁をホモジネートし、クエン酸ナトリウムにて処理した後、0.1ml の上澄みガスを測定した。結果は動脈瘤壁より硫化水素、硫化ジメチルの発生は証明できなかった。

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)
原著 (全て査読あり)

Ohno T, Aoki H, Ohno S, Nishihara M, Furusho A, Hiromatsu S, Akashi H, Fukumoto Y, Tanaka H;
Cytokine Profile of Human Abdominal Aortic Aneurysm: Involvement of JAK/STAT Pathway.
Ann Vasc Dis 11: 84-90, 2018.
DOI:10.3400/avd.oa.17-00086

Furusho A, Aoki H, Ohno-Urabe S, Nishihara M, Hirakata S, Nishida N, Ito S, Hayashi M, Imaizumi T, Hiromatsu S, Akashi H, Tanaka H, Fukumoto Y;
Involvement of B Cells, Immunoglobulins, and Syk in the Pathogenesis of Abdominal Aortic Aneurysm.
J Am Heart Assoc 7: e007750, 2018.
DOI:10.1161/JAHA.117.007750

Nishihara M, Aoki H, Ohno S, Furusho A, Hirakata S, Nishida N, Ito S, Hayashi M, Imaizumi T, Fukumoto Y;
The role of IL-6 in pathogenesis of abdominal aortic aneurysm in mice.
PLOS One 12: e0185923, 2017.
DOI:10.1371/journal.pone.0185923

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 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 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大塚 裕之 (OTSUKA, Hiroyuki)
久留米大学・医学部・助教
研究者番号：30441645

(2) 研究分担者

青木 浩樹 (AOKI, Hiroki)
久留米大学・付置研究所・教授
研究者番号：60322244

明石 英俊 (AKASHI, Hidetoshi)
久留米大学・医学部・教授
研究者番号：80184084

田中 啓之 (TANAKA, Hiroyuki)
久留米大学・医学部・教授
研究者番号：70197466

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()