

令和元年5月27日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09522

研究課題名(和文) 高血圧及びその臓器障害抑制に対する抗サイトカイン療法有効性の実証

研究課題名(英文) Validation of efficiency of anti-cytokine therapy for suppression of hypertension and organ damage

研究代表者

磯田 菊生 (Isoda, Kikuo)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00532475

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)：IL-1Raが動脈瘤形成に影響するかを検討するため、IL-1Ra欠損マウスと野生型マウスにアンジオテンシンII(以下AngII)の28日負荷を施行した。しかし、28日間Ang IIをIL-1Ra欠損マウスに負荷すると、致死性の大動脈破裂を生じた。そこで、14日間のみ負荷し、28日後に解析を施行した。Ang II負荷を14日で中止すると、28日目の血圧は有意差がなかったが、腹部大動脈径はIL-1Ra欠損マウスで有意に増大していた。抗IL-1 中和抗体である01BSURを投与すると、コントロールのIgG2投与と比較して負荷14日目の高血圧を抑制し、28日目の大動脈拡大も有意に減少させた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、Ang II負荷誘導の腹部大動脈瘤形成抑制にIL-1 中和抗体が有効であることを示した。さらに、動脈硬化抑制にIL-6受容体抗体が有効であることも実証した。これらの結果は動脈瘤や動脈硬化形成に抗サイトカイン療法が有効であることを示唆しており、新たな観点からの治療法開発につながると思われる。更に、抗サイトカイン療法により、動脈瘤の外科手術を減らすことが可能となれば、医療経済負担の軽減にもつながり、社会的意義が高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Wild-type (WT) and IL-1Ra-deficient (IL-1Ra^{-/-}) mice were infused with Ang II using subcutaneous osmotic pumps for 28 days. However 28-day infusion with Ang II in IL-1Ra^{-/-} mice significantly increased the occurrence of fatal aortic rupture ($p < 0.0001$). Then, both types of mice were infused with Ang II for only 14 days, and histological analyses were performed at 28 days. Interestingly, abdominal aortic aneurysm (AAA) in IL-1Ra^{-/-} mice increased more significantly than those in WT mice (89% vs. 6%, $p < 0.001$), although SBP did not differ at 28 days in either IL-1Ra^{-/-} and WT mice (117 ± 4 vs 115 ± 3 mmHg, $p = 0.71$). Histological analyses revealed numerous inflammatory cells around the abdominal aorta in IL-1Ra^{-/-}, but not WT mice. Finally, we determined that treatment with 01BSUR decreased Ang II-induced AAA in IL-1Ra^{-/-} mice compared with IgG2a treatment. These results suggest suppression of IL-1 may provide an additional strategy to protect against AAA in hypertensive patients.

研究分野：分子血管学

キーワード：アンジオテンシン 炎症 サイトカイン 動脈瘤 IL-1 中和抗体 IL-6受容体拮抗薬

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高血圧症の主因となるアンジオテンシン II (以下 AngII) は血圧上昇をきたすのみならず、炎症を惹起することで大動脈や腎臓を含めた多数の臓器障害を促進する。現在 AngII の作用を抑えるためアンジオテンシン変換酵素阻害薬や AngII 受容体拮抗薬等が開発され、血圧コントロールや臓器障害予防に大きく寄与している。しかし、それらの薬剤投与にも関わらず、十分な降圧効果が得られなかったり、大動脈を主体とする臓器障害抑制が得られなかったり患者は残存している。そこで従来の治療法とは全く異なった観点からの高血圧治療法を開発することは、降圧を得ることはもちろん大動脈障害抑制により大動脈瘤の手術費用軽減や透析患者減少をもたらし、医療経済的にも大きな意義がある。

申請者は長年にわたり炎症と心血管疾患との関連についての研究を継続的に行ってきた。その中で、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) の欠損が、惹起された炎症状態を増悪させ、血管傷害後の新生内膜肥厚 (Isoda K, et al. *Circulation*. 108(5): 516-8, 2003) や動脈硬化促進 (Isoda K, et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 24(6): 1068-73, 2004 ; Isoda K, Ohsuzu F. *J Atheroscler Thromb*. 13: 21-30, 2006) をもたらすことを報告してきた。しかし、AngII 負荷誘導の高血圧や炎症に対する IL-1Ra の効果については、他施設を含め未だに明らかにされていない。

最近、我々は平成 27 年度までの動脈瘤研究進行中 (Isoda K, et al. *Am J Pathol*. 180: 1254-63, 2012 ; Isoda K, et al. *J Atheroscler Thromb*. 21(11): 1208-18, 2014) に AngII 負荷により IL-1Ra 欠損マウスは野生型マウスより有意に高い血圧上昇を認め (149 ± 3 vs. 129 ± 5 mmHg, $P < 0.001$)、有意に大きな腹部大動脈瘤を生じることを見出した。組織学的検討では大動脈外膜側への多数の炎症細胞集積と弾性線維の破壊を生じていることが分かった。

今回の研究の目的は、抗炎症性サイトカインである IL-1Ra 欠損が AngII 負荷による血圧上昇や動脈瘤悪化にどのように関与しているかの機序解明を行うこと、AngII 負荷を行った野生型マウスと IL-1Ra 欠損マウスに抗 IL-1 薬を投与し、抗サイトカイン療法が血圧や動脈瘤抑制に有用であることを実証することであった。

2. 研究の目的

高血圧患者は本邦において推定 4300 万人といわれている。近年様々な降圧薬が開発され、血圧をコントロールすることにより、高血圧に起因する死亡者数は以前と比較すると有意に減少しているが、現在も高血圧に起因する死亡数は年間約 10 万人と報告されている。これは現在の降圧薬治療では十分な降圧が得られなかったり、臓器障害を抑えられない患者が多数存在し、新たな視点からの高血圧治療開発の必要性を示唆している。我々はこれまでに、抗炎症性サイトカインである IL-1Ra が心血管疾患抑制に寄与することを報告してきている。本申請課題では、抗炎症性サイトカインが高血圧やそれによる臓器障害抑制に有用であり、新たな治療法になり得るか明らかにすることを目的としていた。

3. 研究の方法

(1) 野生型マウスと IL-1Ra 欠損マウスに浸透圧ポンプを用いて AngII 負荷を行い、血圧の変化や大動脈の組織学的変化を比較した。更に血中のサイトカインや血圧上昇に関与するタンパク発現の測定を行い比較した。大動脈より mRNA を抽出し、サイトカインや MMP 等の mRNA 発現を RT-PCR でチェックした。AngII 負荷による血圧上昇や臓器障害に対し、抗サイトカイン療法として現在使用可能な抗 IL-1 薬の作用を野生型マウスと IL-1Ra 欠損マウスで検討し、有効性を検討した。

(2) I κ BNS は NF- κ B の活性を抑制する I κ B 核タンパクの 1 つである。我々は、LDL 受容体欠損マウス (LDLr^{-/-}) において I κ BNS 遺伝子を欠損させる (I κ BNS^{-/-}/LDLr^{-/-}) とマクロファージよりの IL-6 増加を介して動脈硬化を促進することを示している (Akita K, et al. *Int J Cardiol*. 211: 61-3, 2016)。その研究では IL-6 増加が動脈硬化形成促進に大きく寄与していることが示唆された。しかし、抗 IL-6 受容体抗体 (MR16-1) が動脈硬化抑制しうるかは、明らかでなかった。そこで我々は、高脂肪食投与 16 週後の LDLr^{-/-} マウスと I κ BNS^{-/-}/LDLr^{-/-} マウスにおける動脈硬化病変における PBS (コントロール) と抗 IL-6 受容体抗体の MR16-1 (2mg) の効果を検討した。組織学的定量評価と免疫染色で STAT3 活性の抑制効果を定量評価した。

(3) 我々は以前の研究で、LDL 受容体欠損マウス (LDLr^{-/-}) において I κ BNS 遺伝子を欠損させる (I κ BNS^{-/-}/LDLr^{-/-}) と TLR4 を介した自然免疫を介して動脈硬化促進を来す可能性が示唆された。自然免疫活性には、LPS 使用が一般的であるが、I κ BNS^{-/-}/LDLr^{-/-} マウスに LPS を静注すると著明なショックを来し早期に死亡してしまい、動脈硬化評価を行える週齢に達することはできなかった。そこで我々は、TLR4 を活性化することが報告されているコール酸含有高脂肪食を使用して I κ BNS の自然免疫に対する効果を検討することにした。コール酸含有高脂肪食とコール酸を含まない高脂肪食投与し、6 週後の LDLr^{-/-} マウスと I κ BNS^{-/-}/LDLr^{-/-} マウスにおける動脈硬化病変をまず観察した。更に、大動脈根部における炎症細胞の集積を検討するため、

Mac-3 の免疫染色を施行した。ついで自然免疫と IL-6 の関係を明らかにするため大動脈根部における TLR4、IL-6、および pSTAT3 の免疫染色を施行した。血中の IL-6 レベルも明らかにするため採血を施行し、ELISA にて測定を行った。最後に 1kBNS はコール酸含有高脂肪食投与後の単球表現型の切り替えに関与しているか、否かを検討するため、血液細胞の FACS を施行した。

(4) 現在 *in vivo* biotinylation 法の解析を進行中である。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) Ang II 負荷 14 日後に行った IL-1Ra^{-/-}マウスの腹部大動脈を用いた real-time PCR は、野生型マウスの腹部大動脈と比較して、IL-6(43.7 倍、 $p<0.001$)、TNF- α (5.8 倍、 $p<0.01$)、および MM-9(55.8 倍、 $p<0.001$)の各 mRNA が有意に増加していることを示した。我々は zymography を施行し、IL-1Ra^{-/-}マウスと野生型マウスの大動脈における MMP-2 と MMP-9 の発現を調べた。IL-1Ra^{-/-}マウスの腹部大動脈では、野生型マウスの腹部大動脈と比較して、活性化 MMP-2 は 2.3 倍($p<0.01$)増加しており、活性化 MMP-9 は 6.6 倍増加していた。これらの結果は、IL-1Ra 欠損は Ang II 刺激後の MMP-2 と MMP-9 産生を促進していることを示している。腹部大動脈径は IL-1Ra^{-/-}マウスで野生型マウスより有意に拡大していた(0.944 ± 0.253 vs. 0.49 ± 0.08 mm、 $p<0.05$)。

次に我々はより著明な腹部大動脈瘤を観察するため、Ang II の 28 日負荷を施行した。しかし、28 日間 Ang II を IL-1Ra^{-/-}マウスに負荷すると、致死性の動脈破裂を生じた(89% vs. 6%、 $p<0.01$)。そこで、IL-1Ra^{-/-}マウスと野生型マウスに Ang II を 14 日間のみ負荷し、28 日後に組織学的解析をすることにした。また 28 日間の血圧と脈拍のモニターも行った。ベースラインの収縮期血圧は、2 群間で差がなかった(IL-1Ra^{-/-}マウス: 149 ± 2.0 vs. 野生型マウス: 126 ± 3.0 mmHg)。14 日目の Ang II 負荷中止後は両群のマウス共に、収縮期血圧は 3 日目に有意に増加し、5 日目にほぼピークとなり、Ang II 負荷中の 14 日までピークに達した血圧は維持された。ピークの血圧は IL-1Ra^{-/-}マウスで野生型マウスより有意に高値であった(IL-1Ra^{-/-}マウス: 104 ± 2.5 (n=16) vs. 野生型マウス: 106 ± 1.9 mmHg (n=16))。両群のマウス共に 17 日目より血圧の低下を示し、21 日でほぼベースラインの値に戻った。興味深いことに、脈拍は有意に血圧が上昇している間は、IL-1Ra^{-/-}マウスで野生型マウスより有意に低値を示した。

Ang II 負荷を 14 日で中止すると、28 日目の血圧と脈拍は IL-1Ra^{-/-}マウス(n=8)と野生型マウス(n=8)で有意差がなかったが(117 ± 4 vs. 115 ± 3 mmHg、 $p=0.71$; 601 ± 15 vs. 635 ± 16 bpm、 $p=0.75$)、興味深いことに腹部大動脈径は IL-1Ra^{-/-}マウスで野生型マウスより有意に増大していた(1.47 ± 0.14 vs. 0.59 ± 0.02 mm、 $p<0.001$)。マクロ病理所見は、IL-1Ra^{-/-}マウスで、腎動脈下に腹部大動脈瘤を認めたが、野生型マウスでは見られなかった。マイクロ造影 CT でも、解離を伴わない腹部大動脈瘤が IL-1Ra^{-/-}マウスのみに見られた。一方、Ang II 負荷を行わなければ、浸透圧ポンプ植込み 28 日後の大動脈径は二群間で差がなかった(IL-1Ra^{-/-}マウス: 0.42 ± 0.01 (n=8) vs. 野生型マウス: 0.43 ± 0.02 mm (n=8))。

ベースラインの組織学的検討では、IL-1Ra^{-/-}マウスと野生型マウスで差は見られなかった。次に浸透圧ポンプ植込み 14 日目の組織を検討してみると IL-1Ra^{-/-}マウスの腹部大動脈周囲に著明な好中球が見られたが、野生型マウスではほとんど見られなかった。IL-6 の免疫染色では、IL-1Ra^{-/-}マウスは野生型マウスより有意に広範囲で発現が見られた。TNF- α の発現も Ang II 負荷 14 日後で、IL-1Ra^{-/-}マウスにおいて有意に広範囲で見られた。

浸透圧ポンプ植込み後 28 日目では、IL-1Ra^{-/-}マウスの腹部大動脈周囲に好中球とマクロファージを多数認めたが野生型マウスでは見られなかった。さらに、IL-1Ra^{-/-}マウスでは、弾性板の破壊と血管平滑筋の減少を認めた。これらの所見は、Ang II 負荷終了後も IL-1Ra が欠損していると大動脈の炎症が持続し、有意な動脈瘤が形成されることを示している。

IL-1Ra^{-/-}マウスに IL-1 中和抗体の 01BSUR を投与すると、コントロールの IgG2 投与と比較して Ang II 負荷 14 日目の血圧上昇を抑制し、28 日目の大動脈拡大も有意に減少させた。興味深いことに、01BSUR は野生型マウスにおいても、Ang II 負荷 14 日目の血圧を有意に抑制した。野生型マウスの Ang II 負荷 14 日目の大動脈径は生食負荷と有意差がなかったため、01BSUR 投与による抑制効果は有意とならなかった。

01BSUR を IL-1Ra^{-/-}マウスに投与すると、Ang II 負荷 14 日目の RT-PCR では、IgG2 を投与し

た野生型マウスと比較して大動脈内の IL-6、TNF- α および MMP-9 の mRNA 発現の有意差は消失した。浸透圧ポンプ植込み 28 日後の組織学的解析においても、O1BSUR 投与は IgG2 投与と比較して大動脈周囲の炎症細胞浸潤を有意に抑制していることが示された。更に O1BSUR 投与は IgG2 投与と比較して IL-1Ra-/-マウスにおける腹部大動脈の弾性板破壊や、血管平滑筋細胞の変性も有意に抑制した。これらの所見は O1BSUR が Ang II 誘導の大動脈炎症を抑制し、大動脈瘤形成を防ぐことを示唆している。

以上の結果は IL-1 の阻害は Ang II 負荷後の大動脈炎症と動脈瘤形成を有意に抑制することを示し、IL-1 阻害は高血圧患者における腹部大動脈瘤進行抑制の新たな追加治療になる可能性を示唆している。

(2) 高脂肪食投与 16 週後の LDL r -/-マウスと IkbNS-/-/LDLr-/-マウスにおける動脈硬化病変における PBS(コントロール)と抗 IL-6 受容体抗体の MR16-1(2mg)の効果を検討した。PBS もしくは MR16-1 は脂肪食負荷 16 週の間は、週 1 回投与した。MR16-1 は有害事象を起こさなかった。収縮血圧と体重は 4 群間で有意差がなかった。更に、血清コレステロール、LDL コレステロール、中性脂肪、および HDL コレステロールも 4 群間で差がなかった。

高脂肪食投与 16 週後の LDL r -/-マウスと IkbNS-/-/LDLr-/-マウスにおける動脈硬化病変に対する MR16-1 の効果を検討した。PBS 処置では IkbNS-/-/LDLr-/-マウスは LDL r -/-マウスと比較して有意に広範囲の動脈硬化病変を認めた ($p < 0.01$)。しかし、MR16-1 処置は IkbNS-/-/LDLr-/-マウスと LDL r -/-マウスとの動脈硬化病変の有意差を消失させた。興味深いことに、MR16-1 投与は PBS を投与した LDLr-/-マウスよりも有意に動脈硬化病変を減少させた ($p < 0.05$)。PBS 投与下では、大動脈根部の動脈硬化病変も、IkbNS-/-/LDLr-/-マウスは LDL r -/-マウスと比較して有意に大きな病変を認めた ($p < 0.05$)。MR16-1 投与は IkbNS-/-/LDLr-/-マウスと LDL r -/-マウスの大動脈根部の動脈硬化病変を PBS 投与群より有意に減少させた。これらの結果は、抗 IL-6 受容体抗体は LDL コレステロールや HDL コレステロールといった主要な交絡因子に影響を及ぼさずに IkbNS-/-/LDLr-/-マウスと LDL r -/-マウスの IkbNS の作用を補助していることを示しており、IL-6 の抑制は動脈硬化形成を予防する効果があることを示唆している。MR16-1 と PBS 投与両群の動脈硬化病変における STAT 活性を検討するため、高脂肪食投与 16 週後の 4 群における pSTAT3 染色を施行した。PBS 投与 IkbNS-/-/LDLr-/-マウスは PBS 投与 LDL r -/-マウスと比較して、動脈硬化病変内に有意に多くの pSTAT 陽性核を認めた。MR16-1 投与は PBS 投与と比較して、IkbNS-/-/LDLr-/-マウスと LDL r -/-マウスの両方の動脈硬化病変内の pSTAT3 陽性核を減少させた。STAT3 活性を定量化するため、動脈内の全ての核における pSTAT3 陽性核の比率を計算した。MR16-1 投与 IkbNS-/-/LDLr-/-マウスの pSTAT3 陽性核比率は PBS 投与群より有意に減少した (8.4 ± 1.5 vs. $47.3 \pm 3.1\%$, $p < 0.05$)。興味深いことに、MR16-1 投与は LDLr-/-マウスにおいても、PBS 投与と比較して pSTAT3 陽性核比率は有意に減少した (7.2 ± 1.8 vs. $27.7 \pm 1.5\%$, $p < 0.01$)。

以上の結果は抗 IL-6 療法が脂質異常や炎症により惹起された動脈硬化抑制につながる可能性を示している。

(3) コール酸含有高脂肪食とコール酸を含まない高脂肪食投与し、6 週後の LDL r -/-マウスと IkbNS-/-/LDLr-/-マウスにおける動脈硬化病変を観察した。収縮期血圧は 4 群間で有意差がなかった。大動脈表面の動脈硬化病変はコール酸含有高脂肪食投与 IkbNS-/-/LDLr-/-マウスで、他の 3 群と比較して有意に広範囲に見られた ($p < 0.01$)。興味深いことに、コール酸を含まない高脂肪食は負荷 6 週間後で、IkbNS-/-/LDLr-/-マウスと LDL r -/-マウスの動脈硬化病変に有意差を生じなかった。コール酸含有高脂肪食の 6 週間負荷は、大動脈根部の動脈硬化病変も、IkbNS-/-/LDLr-/-マウスで、他の 3 群と比較して有意に大きな動脈硬化病変を生じた ($p < 0.05$)。コール酸を含まない高脂肪食 6 週間負荷では IkbNS-/-/LDLr-/-マウスと LDL r -/-マウスの大動脈根部の動脈硬化病変に有意差を認めなかった。これらの結果は、コール酸含有高脂肪食の 6 週間負荷は IkbNS-/-/LDLr-/-マウスの動脈硬化病変を有意に促進したことを示している。

コール酸含有高脂肪食とコール酸を含まない高脂肪食投与 6 週後の LDL r -/-マウスと IkbNS-/-/LDLr-/-マウスにおける大動脈根部における炎症細胞の集積を検討するため、Mac-3 の免疫染色を施行した。コール酸含有高脂肪食投与では IkbNS-/-/LDLr-/-マウスは LDL r -/-マウスより有意に大動脈壁面積に占める Mac-3 陽性面積が大きかったが (27.8 ± 1.7 vs. $18.1 \pm 2.4\%$, $p < 0.01$)、コール酸を含まない高脂肪食負荷では、IkbNS-/-/LDLr-/-マウスと LDL r -/-マウスで有意差を認めなかった (21.7 ± 1.5 vs. $21.1 \pm 2.1\%$)。以上の結果は、コール酸含有高脂肪食は IkbNS-/-/LDLr-/-マウスの大動脈におけるマクロファージ集積を有意に促進したことを示している。

コール酸含有高脂肪食とコール酸を含まない高脂肪食投与 6 週後の LDL r -/-マウスと IkbNS-/-/LDLr-/-マウスにおける大動脈根部における TLR4、IL-6、および pSTAT3 の発現を検討するため、これらのタンパクの免疫染色を施行した。コール酸を含まない高脂肪食の 6 週間負荷では、IkbNS-/-/LDLr-/-マウスと LDL r -/-マウスでこれら 3 つのタンパクの発現に有意差を認めなかった。しかし、コール酸含有高脂肪食投与では IkbNS-/-/LDLr-/-マウスは LDL r -/-マウスより有意に TLR4 発現が増加した (22.8 ± 1.6 vs. $15.3 \pm 2.7\%$, $p < 0.05$)。IL-6 タンパク発現も IkbNS-/-/LDLr-/-マウスは LDL r -/-マウスより有意に増加していた ($22.4 \pm$

1.5 vs. 13.1 ± 2.2%, p<0.05)。さらに、IkBNS-/-/LDLr-/-マウスは LDL r -/-マウスより有意に大動脈壁面積に占める pSTAT3 陽性面積が大きかった(31.8 ± 1.3 vs. 19.0 ± 2.5%, p<0.01)。これらの結果は、IkBNS の欠損はコール酸含有高脂肪食負荷後の TLR4 発現を増加させると共に IL-6/STAT3 シグナル系を活性化し、結果として IkBNS-/-/LDLr-/-マウスの動脈硬化形成を有意に促進したことを示している。

コール酸含有高脂肪食とコール酸を含まない高脂肪食投与6週後の血清 IL-6 レベルを検討するため、4 群から採血検体を採取した。コール酸含有高脂肪食投与では IkBNS-/-/LDLr-/-マウスは LDL r -/-マウスより有意に血清 IL-6 レベルが高値であったが(15.2 ± 1.9 vs. 8.3 ± 1.5pg/mL, p<0.01)、コール酸を含まない高脂肪食負荷では、IkBNS-/-/LDLr-/-マウスと LDL r -/-マウスで有意差を認めなかった(5.6 ± 1.5 vs. 5.8 ± 0.8 pg/mL)。これらの所見は、コール酸含有高脂肪食が IkBNS-/-/LDLr-/-マウスにおいて高 IL-6 血症を誘導したことを示唆している。

コール酸含有高脂肪食負荷は IkBNS-/-/LDLr-/-マウスは LDL r -/-マウスと比較して、動脈硬化と炎症を増加させたため、IkBNS はコール酸含有高脂肪食投与後の単球表現型の切り替えに関与しているか、否かを検討した。そこで我々は4群のマウスより採取した末梢血の単球サブセットを検討した。コール酸含有高脂肪食負荷は IkBNS-/-/LDLr-/-マウスの末梢血は LDL r -/-マウスの末梢血と比較して Ly6C^{hi} の割合が有意に増加していたが、Ly6C^{lo} の割合は低下していた。この所見は、IkBNS 欠損はコール酸含有高脂肪食負荷に対する炎症反応を増強し、IkBNS-/-/LDLr-/-マウスの動脈硬化形成に影響していることを示している。

以上の結果をまとめると、コール酸含有高脂肪食は TLR4 を介して早期炎症反応を惹起する。

IkBNS 欠損は TLR4 発現と NF-κB 活性化を促進し、コール酸含有高脂肪食負荷後 IL-6 を含む TLR4 依存遺伝子を誘導する。動脈硬化病変内で STAT3 が活性化され、動脈硬化形成促進を起こす。今回の研究で、コール酸含有高脂肪食の6週間負荷で、IkBNS-/-/LDLr-/-マウスの泡沫細胞リッチな動脈硬化病変において IL-6 発現と STAT3 活性化が増加した。このことは、IkBNS 欠損は TLR4/IL-6/SATA3 経路を介して炎症と動脈硬化病変進展を促進することを示している。

NF-κB とその制御因子の IkBNS タンパクは宿主免疫反応制御において重要な役割をしている。今回の研究で我々はコール酸含有高脂肪食誘導の炎症に関与する IkBNS の役割を評価した。結論としてコール酸含有高脂肪食はたった6週間で、IkBNS-/-/LDLr-/-マウスに著明な動脈硬化病変を惹起した。動脈硬化抑制自然免疫の障害により生じた TLR4/IL-6/SATA3 経路のような炎症の過剰な活性化が動脈硬化抑制自然免疫の障害で生じること示した。これらの結果は動脈硬化治療の新しい治療戦略発見につながる可能性がある。

(4) 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。今後はサンプル数を増やすと共に解析を進め、論文作成する予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Akita K, Isoda K, Sato-Okabayashi Y, Kadoguchi T, Kitamura K, Ohtomo F, Shimada K, Daida H. An Interleukin-6 Receptor Antibody Suppresses Atherosclerosis in Atherogenic Mice. *Front Cardiovasc Med*, 査読有、4、2017、84.

Isoda K, Akita K, Kitamura K, Sato-Okabayashi Y, Kadoguchi T, Isobe S, Ohtomo F, Sano M, Shimada K, Iwakura Y, Daida H. Inhibition of interleukin-1 suppresses angiotensin II-induced aortic inflammation and aneurysm formation. *Int J Cardiol*, 査読有、270、2018、221-227.

Kitamura K, Isoda K, Akita K, Miyosawa K, Kadoguchi T, Shimada K, Daida H. Lack of IkBNS promotes cholate-containing high-fat diet-induced inflammation and atherogenesis in low-density lipoprotein (LDL) receptor-deficient mice. *Int J Cardiol Heart Vasc*, 査読有、23、2019、100344.

[学会発表](計40件)

Koji Akita, Kikuo Isoda, Yayoi Okabayashi, Yuko Ishii, Kazunori Shimada, Hiroyuki Daida. An IL-6 receptor antibody suppresses IkBNS deficiency induced atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. ESC congress 2016, Roma, 2016年8月27日-8月31日.

Kitamura Kitamura, Kikuo Isoda, Koji Akita, Yayoi Okabayashi, Kazunori Shimada, Hiroyuki Daida. An anti-Interleukin-1beta antibody suppresses both angiotensin II-induced hypertension and aortic aneurysm. ESC congress 2017, Barcelona, 2017年8月26日-8月30日.

Kikuo Isoda, Kenichi Kitamura, Koji Akita, Yayoi Okabayashi, Tomoyasu Kadoguchi, Kazunori Shimada, Hiroyuki Daida. An Anti-Interleukin-1 Antibody Suppresses Both Angiotensin II-induced Renal Inflammation and Hypertension. AHA Scientific Session 2017. Anaheim, 2017年11月11日-15日.

Kenichi Kitamura, Kikuo Isoda, Koji Akita, Yayoi Okabayashi, Tomoyasu Kadoguchi, Kazunori Shimada, Hiroyuki Daida. Suppression of IL-1 Inhibited Both Angiotensin II-induced Hypertension and Aortic Aneurysm. The 82nd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. Osaka, 2018年3月10日-12日.

Kai Ishii, Kikuo Isoda, Kenichi Kitamura, Koji Akita, Yayoi Okabayashi, Tomoyasu Kadoguchi, Fumie Ohtomo, Kazunori Shimada, Hiroyuki Daida. Deficiency of Interleukin-1 receptor antagonist continues angiotensin II induced aortic inflammation and promotes aneurysm formation after the cessation of its infusion. ESC congress 2018, Barcelona, 2018年8月25日-8月29日.

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。