

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19973

研究課題名(和文) 塩分過剰による大動脈解離増悪メカニズム：IL-17によるECM制御機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of worsening aortic dissection by high salt via IL-17 pathway

研究代表者

西田 憲史(NISHIDA, Norifumi)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：50624508

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：塩分過剰はIL-17を介してマウス大動脈解離を増悪させた。マウスへの塩分負荷は血漿IL-17Aを変化させずIL-17受容体を増加させ、NFκBを活性化させたことからIL-17感受性を高める可能性が示唆された。また、IL-17ノックアウトはECM遺伝子群の発現パターンを大きく変化させ、その制御因子であるTGF-β経路(pSmad2、Smad7)を活性化し、塩分過剰はTGF-β経路に対して抑制的に作用した。以上から塩分過剰はIL-17を介してECM代謝異常、大動脈解離増悪を引き起こすことが示された。

研究成果の概要(英文)：In this project, we investigated the mechanism of worsening aortic dissection by high salt intake and the involvement of IL-17. High salt induced IL-17 receptor expression without affecting plasma IL-17, and activated NFκB in aorta in an IL-17-dependent manner, suggesting the increase the sensitivity of aortic tissue to IL-17. In addition, deletion of IL-17 gene showed higher activity of Smad2, upregulation of ECM genes, and increase in medial collagen fibers in aorta. Interestingly, high salt induced expression of Smad7, a negative regulator of Smad signaling, and suppressed Smad2 activation in an IL-17-dependent manner. We propose that high salt and IL-17 synergistically dysregulate ECM metabolism in aorta to exacerbate AD.

研究分野：血管外科、分子血管病態学

キーワード：大動脈解離 塩分過剰 IL-17 細胞外マトリックス

1. 研究開始当初の背景

【臨床的背景】

大動脈解離は大動脈中膜が突然断裂する致死性疾患である。本邦において増加傾向にあり、社会的責任が大きくなる50歳以上の男性に多く発症することから、社会的な影響も大きい。しかし、大動脈解離の分子病態解明は進んでおらず、発症は予防できず、また一旦発症すると手術、安静、降圧療法以外に打つ手がないのが現状である。手術が施行されても、遠位部に解離腔を残すことが多く、保存的加療と同様、組織破壊の増悪により解離部の瘤化、破裂、種々の臓器合併症を起こすことが予後を左右する重要な臨床上的問題となる。その問題点を解決する上で、大動脈解離増悪のメカニズム解明は急務である。

【予備的検討:塩分過剰による解離の増悪】

この現状を解決するために、申請者は大動脈解離の病態解明に取り組んでいる(科研費 若手 B、H25-26)。申請者は既報(Circ 2012)に基づき、コラーゲン/エラスチン架橋酵素阻害薬 BAPN とアンジオテンシン II 投与により、2週間かけて大動脈解離が発症・増悪するモデルを開発した。このモデルのトランスクリプトーム(自験)は、ヒト大動脈解離の遺伝子発現変化を(Euro J Vasc Endovasc Surg 2002)良く再現し、炎症応答、細胞増殖関連遺伝子の亢進と細胞外マトリックス(ECM)関連遺伝子の抑制を認めた。

このモデルの開発により、解離発症のみならず、解離増悪の病態を解析することが可能となった。

最近、塩分過剰が心血管イベントの危険因子であることが報告され(N Eng J Med 2014)、大動脈解離でも危険因子となる可能性がある。事実この解離モデルが塩分過剰(1%NaCl 水投与)で増悪することを申請者は見いだした(図1)。このメカニズムの解明は、解離の発症・増悪および各種合併症を抑制するための治療介入へと繋がる。

【予備的検討:塩分過剰とIL-17】

特筆すべきことに、申請者はIL-17ノックアウト(KO)マウスでは、塩分過剰による解離増悪作用が完全に消失することを発見した(図2、第79回日本循環器学会総会、ESC congress 2015 VBA 部門 YIA 受賞、科研費 若手 B、H25-26)。

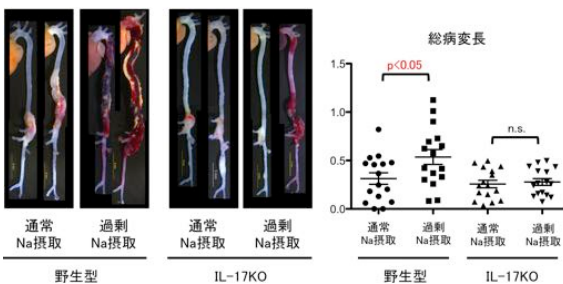


図1 塩分過剰は大動脈解離を増悪させ、IL-17KO でその効果は抑制される。

IL-17 は線維芽細胞、血管内皮細胞、マクロファージなど広範囲に渡る細胞に作用して、炎症、組織障害を誘導する炎症性サイトカインであり、Th17 細胞及び  $\gamma \delta$  T 細胞から分泌される。近年 Th17 細胞は塩分過剰で活性化することが示された(Nature 2013)。

さらに申請者は、IL-17KO マウスの大動脈において ECM 遺伝子発現が亢進していることを発見した。これは IL-17 が ECM 形成を抑制するという驚くべき発見である。

これら一連の発見から申請者は、塩分過剰が IL-17 を介して ECM を脆弱化させ、大動脈解離を増悪させるとの仮説を立てるに至った。

2. 研究の目的

塩分過剰による IL-17 活性化機序及び、IL-17 による ECM 制御機構を明らかにすることで、塩分過剰が大動脈解離を増悪させるメカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

大動脈解離マウスモデルとして、コラーゲン/エラスチン架橋酵素阻害薬 BAPN と Ang II 投与による大動脈解離モデル(BAPN+AngII モデル(B+A))、Circulation 2012 改変)を用いた。

また、塩分過剰は 1%NaCl を飲水として投与し、モデル作成時はモデル作成1週間前からの投与とした。

計画1. 塩分過剰による IL-17 系活性化機序の解明

血漿 IL-17a 濃度を Bio-Plex を用いて測定した。また、IL-17 関連因子(IL-17 受容体ほか)を、塩分過剰状態のマウス大動脈解離組織を採取し、リアルタイム PCR を用いて検討した。また IL-17 経路の下流である NFkB と  $\alpha$  SMA の蛍光免疫二重染色を行い、イメージングサイトメトリーを用いて評価した。

計画2. 塩分過剰が ECM へ及ぼす影響の解明

野生型マウス及び IL-17KO マウスの大動脈組織を用いて、網羅的遺伝子解析を行い、ECM に着目した解析を行った。

計画3. IL-17 による ECM 制御機構の解明

野生型マウス及び IL-17KO マウスの大動脈組織を用いて、ウェスタンブロット及びピクロセリウスレッド染色を行い、IL-17 による ECM 関連因子への影響を検討、解析を行った。

4. 研究成果

成果(1)塩分過剰は IL-17 感受性を高める。塩分過剰は、血漿 IL-17a 濃度を変化させなかった。しかし、IL-17 受容体を増加させ(図2)、NFkB を活性化した(図3)ことから、塩分過剰が IL-17 感受性を高める可能性が示唆された。

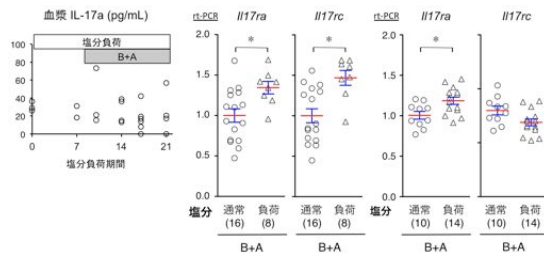


図 2 塩分負荷は血漿 IL-17a 濃度を変化させず、IL-17 受容体を増加させる。

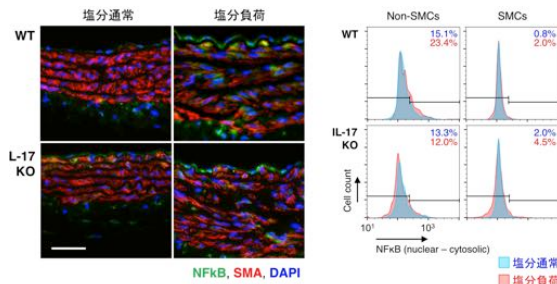


図 3 塩分負荷は非 SMC 陽性細胞で NFkB を活性化 (15.1→23.4%) し、その効果は IL-17KO マウスでは抑制された (13.3→12.0%)。

成果(2)大動脈解離刺激は ECM 遺伝子群に大きな影響を及ぼし、IL-17KO は ECM 遺伝子群発現パターンを大きく変化させる。マウス大動脈解離モデルの網羅的遺伝子解析で、図 4 のヒートマップの通り、大動脈解離刺激及び IL-17KO により多数の ECM 遺伝子群に変動を起こすことが示された。

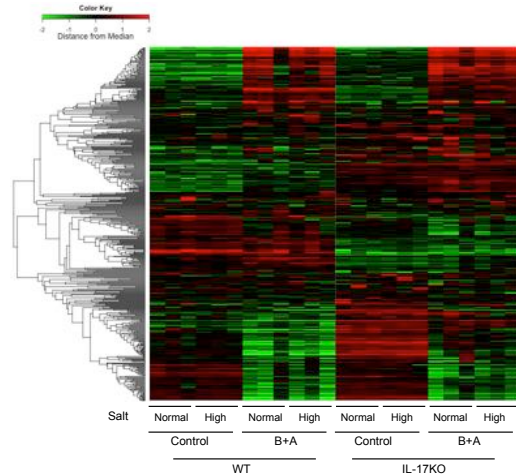


図 4 ECM 関連遺伝子のヒートマップ

成果(3)IL-17 は TGF-β 経路を介して ECM 代謝を抑制する。野生型マウス大動脈において塩分負荷は TGF-β 経路の抑制分子 Smad7 の発現を亢進させる一方、IL-17KO マウス大動脈では Smad7 の発現低下と、Smad2 活性亢進が認められた(図 5)。また、マウス大動脈組織のピクロシリスレッド染色では、野生型マウスと比較して IL-17KO マウスでは中膜コラーゲン線維が増加していた(図 6)。

TGF-β 経路は ECM 代謝制御因子であることから、IL-17 は TGF-β 経路を介して ECM 代謝を抑制すると考えられた。

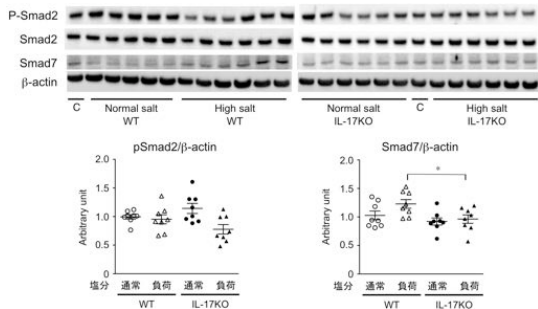


図 5. pSmad2、Smad7 のウェスタンブロッティング

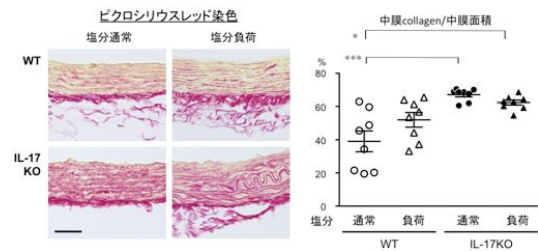


図 6. マウス大動脈組織ピクロシリスレッド染色

まとめ

成果(1)-(3)から、塩分過剰は IL-17 を介して ECM 代謝異常、大動脈解離増悪を引き起こすことが示された。塩分過剰/IL-17 経路は大動脈解離の有効な予防および治療ターゲットとなる可能性が高い。今後は、塩分過剰による TGF-β 経路への影響を引き起こすメカニズムの解明を行い、さらなる病態解明と予防・治療ターゲットの同定を目指していく。

## 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 Aya Furusho, Hiroki Aoki, Satoko Ohno-Urabe, Michihide Nishihara, Aya Furusho, Saki Hirakata, Norifumi Nishida, Sohei Ito, Makiko Hayashi, Tsutomu Imaizumi, Shinichi Hiromatsu, Hidetoshi Akashi, Hiroyuki Tanaka, Yoshihiro Fukumoto  
Involvement of B Cells, Immunoglobulins, and Syk in the Pathogenesis of Abdominal Aortic Aneurysm.

J Am Heart Assoc. 2018; Mar 15 ; 7 (6) :e007750.

DOI: 10.1161/JAHA.117.007750. 査読有

② Satoko Ohno-Urabe, Hiroki Aoki, Michihide Nishihara, Aya Furusho, Saki Hirakata, Norifumi Nishida, Sohei Ito, Makiko Hayashi, Hideo Yasukawa, Tsutomu Imaizumi, Hidetoshi Akashi, Hiroyuki Tanaka, Yoshihiro Fukumoto

Role of Macrophage Socs3 in the Pathogenesis

of Aortic Dissection.  
J Am Heart Assoc. 2018; Jan 17;  
7(2) :e007389.  
DOI: 10.1161/JAHA.117.007389. 査読有

③Michihide Nishihara, Hiroki Aoki, Satoko Ohno, Aya Furusho, Saki Hirakata, Norifumi Nishida, Sohei Ito, Makiko Hayashi, Tsutomu Imaizumi, Yoshihiro Fukumoto  
The role of IL-6 in pathogenesis of abdominal aortic aneurysm in mice  
PLoS ONE 12(10): e0185923.  
<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0185923>  
3 2017 査読有

〔学会発表〕(計 23 件)

①High Salt and IL-17 Synergistically Worsen Aortic Dissection by Dysregulation of Extracellular Matrix  
西田憲史、青木浩樹、大野聡子、西原通秀、古荘文、平方佐季、林真貴子、伊東壮平、安川秀雄、福本義弘  
第 82 回日本循環器学会学術総会 2018.3.25  
大阪国際会議場 (大阪府大阪市)

②塩分過剰による大動脈解離の増悪には IL-17 が関与する：マウス解離モデルを用いた検討  
西田憲史、青木浩樹、大野聡子、西原通秀、古荘文、平方佐季、林真貴子、伊東壮平、福本義弘  
第 53 回高血圧関連疾患モデル学会学術総会 2017.11.24 九州大学百年講堂 (福岡県福岡市)

③Synergistic effect of high salt and IL-17 worsens aortic dissection by dysregulation of extracellular matrix.  
N. Nishida, H. Aoki, S. Ohno, M. Nishihara, A. Furusho, S Hirakata, S.Ito, M. Hayashi, H. Yasukawa, Y. Fukumoto  
European Society Of Cardiology 2017 Congress 2017.08.29. Barcelona(Spain)

④High Salt Activates NFkB Pathway and Causes Worsening Aortic Dissection via IL-17 Pathway  
西田憲史、青木浩樹、大野聡子、西原通秀、古荘文、平方佐季、林真貴子、伊東壮平、安川秀雄、福本義弘  
第 81 回日本循環器学会学術総会 2017.3.18  
金沢フォーラス (石川県金沢市)

⑤Molecular mechanism of worsening aortic dissection by high salt through IL-17 pathway.  
N. Nishida, H. Aoki, S. Ohno, M. Nishihara, A. Furusho, S Hirakata, S.Ito, M. Hayashi, H. Yasukawa, Y. Fukumoto  
European Society Of Cardiology 2016 Congress 2016.08.27 Roma(Italy)

〔図書〕(計 1 件)

Aoki H, Ohno S, Furusho A, Nishihara M, Nishida N, Hirakata S, Yoshimura K  
Mouse model of abdominal aortic aneurysm induced by CaCl<sub>2</sub>.  
Mouse Models of Vascular Diseases. Editor. Sata M, Springer, Tokyo: 211-226, 2016

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西田 憲史 (NISHIDA Norifumi)  
久留米大学・医学部・助教  
研究者番号：50624508

### (2) 研究分担者

なし  
( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

なし  
( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

なし  
( )