

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10753

研究課題名(和文) 活性型ビタミンD投与による大動脈瘤形成抑制効果の検討

研究課題名(英文) Potent Inhibiting Effect of Activated vitamine D3 on Aortic Aneurysm Dilatation

研究代表者

新美 清章 (NIIMI, Kiyooki)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50467312

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：calsitriol投与でMCP-1の遺伝子発現抑制を示せた一方で、エラスチンを主成分とする弾性繊維などの細胞外マトリックスの分解を促進するMMP-9や炎症メディエーターのIL-1bとMMP-9では遺伝子発現を促進する結果となり、calsitriolのマクロファージに対する抗炎症効果は確認できず、活性型ビタミンDの動脈瘤抑制効果は認めなかった。一方、モデルの過程で、ぜんそく治療薬であるモンテルカストでのマウスの実験で動脈瘤抑制効果を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回当初目的としたcalsitriolが大動脈瘤の原因となる炎症メディエーターの抑制効果を示せなかったが、研究の過程で腹部大動脈瘤モデルマウスの確立(イソフルレンにて麻酔したマウスの皮下に浸透圧ポンプを植え込み、アンジオテンシンを1000ng/kg/minの容量で28日間投与)、さらに喘息治療薬であるロイコトリエン拮抗薬のモンテルカストで大動脈瘤抑制効果をマウスで確認できたことは今後の動脈瘤治療への1つの方向性を示すことができ、またマウスの動脈瘤モデル作製に精通したことより、今後の研究に生かせる意義がある。

研究成果の概要(英文)：The activity of endogenous MCP-1 was significantly lower in the calsitriol group than in the Saline group. However, there was no significant difference in expression level of IL-1 and MMP-9 causing degeneration of the extracellular matrix between the Saline and calsitriol groups. In that series, we decided to evaluate another anti-inflammatory subject that can suppress atherosclerotic disease. Montelukast is a selective CVS-LT1receptor antagonist that could suppress atherosclerotic diseases. We evaluated the in vitro properties of montelukast and its in vivo activities in an angiotensin -infused apolipoprotein E-deficient AAA mouse model. Relative to control, montelukast significantly suppressed gene expression of MMP-2, MMP-9, and IL-1. In vivo, montelukast significantly decreased aortic expansion and induced infiltration of M2 macrophages.

研究分野：血管外科学

キーワード：腹部大動脈瘤 活性型ビタミンD ビタミンD アディポサイトカイン アディポネクチン動脈硬化 炎症メディエーター モンテルカスト M2マクロファージ

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ビタミン D 欠乏症が死因の大きな要因の一つである心血管病(CVD)と関連があるということがビタミン D に関する最近の公衆衛生的な研究で明らかになった。さらに活性型ビタミン D や選択的 VDR 活性物質の投与が慢性腎疾患患者の CVD 発症リスク軽減に参与していることも報告された。以上のように、CVD とビタミン D の関連についての研究成果は近年著しく成果をあげており、これらの成果は動脈硬化と関連して発症する大動脈瘤の形成メカニズムの解明に発展すると期待される。

2. 研究の目的

ビタミン D には抗酸化作用や慢性腎疾患の心血管疾患発症リスク予防に参与している。腹部大動脈瘤は本邦でも増加しており、食生活の欧米化などがあるとされるが、その原因は動脈硬化を主体とし、慢性炎症が原因とされ、ビタミン D との関連を明らかにしたい。

3. 研究の方法

In vitro マウスマクロファージを使用し、TNF- α で刺激したのち、calcitriol を含む培地を添加し、PCR を用いて MMP-9 や IL-1 β の遺伝子発現解析

In vivo でマウスを用いた動脈瘤モデルを作製し、VitD の投与が及ぼす効果の評価やその背景にある因子、瘤組織でのレセプター発現の検討。

4. 研究成果

[In vitro]

J774A.1 マウスマクロファージを使用。マクロファージを培養後、matrix metalloproteinases(MMPs)や cytokines の発現を誘導するため TNF- α (20ng/ml)で刺激した。具体的には、24well プレートを用いて 1well あたり 4×10^5 個のマクロファージと TNF- α を含む細胞懸濁液と DMEM 培地を入れ、24 時間反応させた。その後、calcitriol を含む培地を添加し、マクロファージから mRNA を抽出し、逆転写酵素にて cDNA を生成した後 qPCR を用いて遺伝子発現解析を行った。

calcitriol 添加濃度は投与なし(control)、10nM、100nM の 3 種類の濃度で行った。qPCR 時には GAPDH、TNF- α 、interleukin(IL)-6、monocyte chemoattractant protein(MCP)-1 のプライマーを使用した。GAPDH 当たりの相対的発現量を比較することで評価した。

結果：MCP-1 (control vs 10nM vs 100nM; 0.94 vs 0.71 vs 0.62)であり calcitriol を添加した群はいずれも control に対して有意に遺伝子発現が抑制された($p < 0.05$)。IL-6 (control vs 10nM vs 100nM; 0.98 vs 0.95 vs 0.84)、TNF- α (control vs 10nM vs 100nM; 0.90 vs 0.85 vs 0.92)ではグループ間に有意差は認めなかった。

結論：calcitriol 投与で大動脈瘤形成に参与する炎症性メディエーターである MCP-1 の遺伝子発現が抑制された。IL-6、TNF- α では有意差を認めなかった。今回の実験では、calcitriol 投与による抗炎症効果の有無を検討することは不十分であると考えられた。

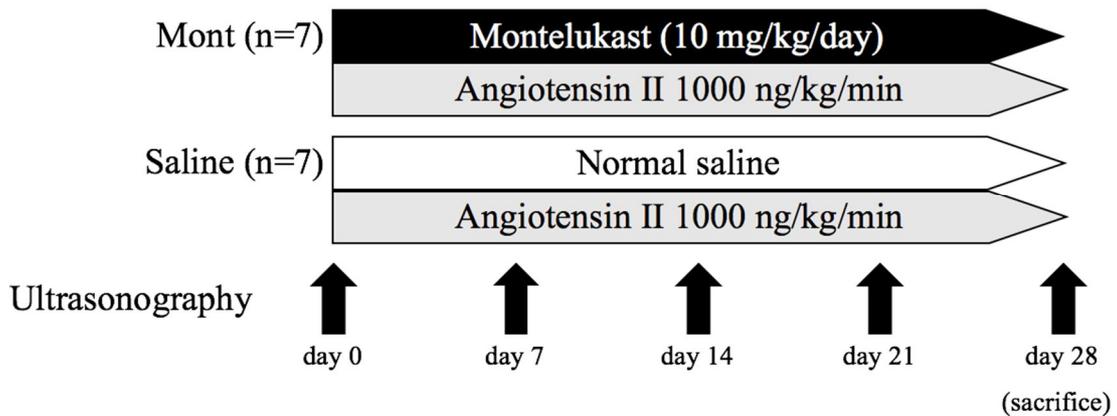
これらの研究課程の中で、閉塞性呼吸器疾患で用いられるロイコトリエン拮抗薬であるモンテルカストナトリウム(Mont)の心血管疾患に対する有効性が報告されていることがわかり、calcitriol の negative data をうけ、抗炎症作用のある M2 マクロファージが大動脈瘤形成を抑制することと関連し、モンテルカストのマクロファージに対する作用と大動脈瘤に対する治療効果を検討。

【方法】

In vitro; TNF- α で刺激したマウス由来マクロファージ(M1 マクロファージ)を Mont と共に培

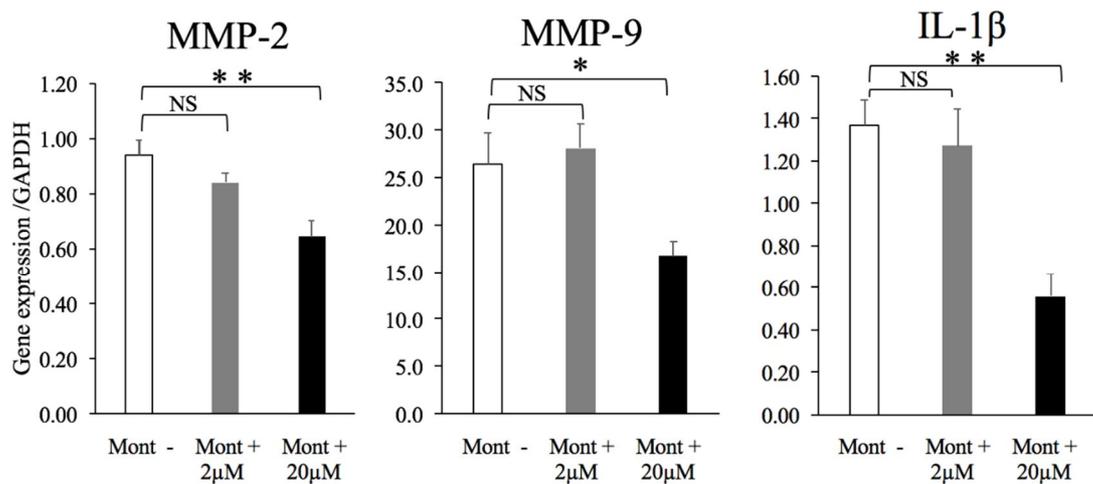
養し、炎症性サイトカインの遺伝子発現を解析した。Mont を添加したマクロファージ(M0 マクロファージ)の Arginase-1 の遺伝子発現及び細胞表面抗原を分析した。

In vivo; 24 週以上の雄の ApolipoproteinE^{-/-}-マウスに対し浸透圧ポンプを使用してアンギオテンシン を持続皮下注射しマウス動脈瘤モデルを作製した。Mont 群(n=7)には Mont 10mg/kg/day を、生食群(n=7)には生理食塩水を、ポンプを移植した日から連続 28 日間投与した。28 日後に大動脈瘤径、瘤壁の中膜のエラスチンの割合、MMP 活性、炎症性サイトカイン、M2 マクロファージを測定した。



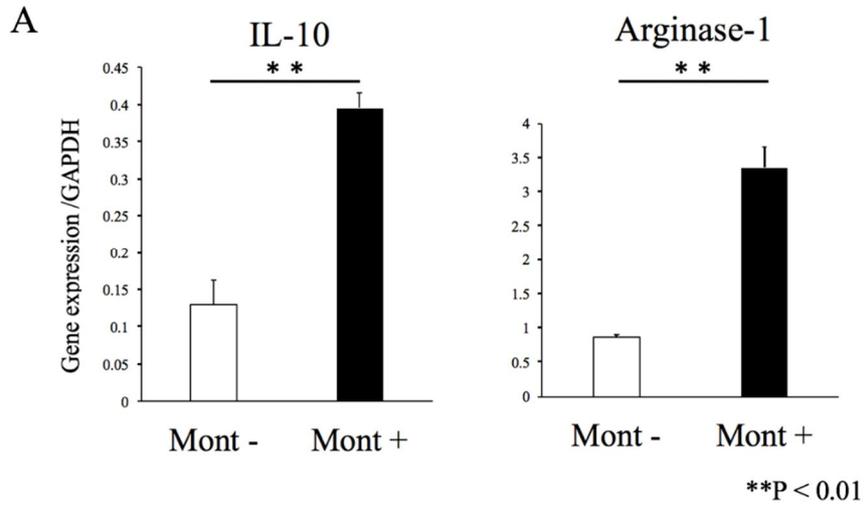
【結果】

In vitro: Mont は M1 マクロファージの MMP2、MMP9、IL-1 β 、NF- κ B の遺伝子発現を有意に抑制し、M0 マクロファージの Arginase-1 の遺伝子発現及び細胞表面抗原発現を有意に促進した。



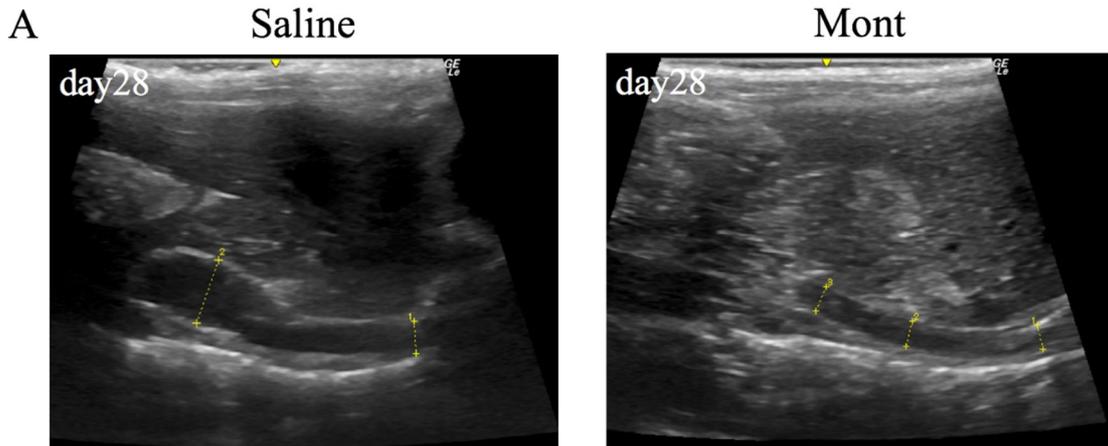
*P < 0.05 **P < 0.01

M1 マクロファージの MMP2、MMP9、IL-1 β 、NF- κ B の遺伝子発現の比較

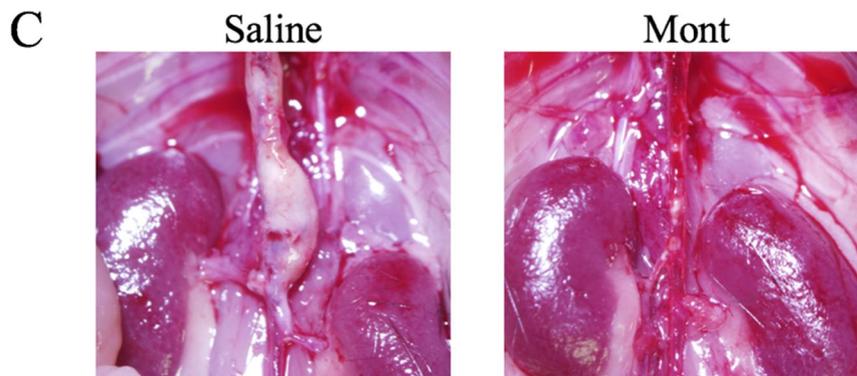


モンテルカスト添加マクロファージでの IL-10 および Arginase 発現の比較

In vivo; Mont 群で有意に瘤径拡大が抑制され(生食群 2.44mm vs Mont 群 1.59mm, $p < 0.01$)、エラスチン分解が有意に抑えられ(生食群 45% vs Mont 群 56%, $p < 0.05$)、MMP2 活性も有意に低下していた(生食群 1234 μ M vs Mont 群 734 μ M, $p < 0.05$)。さらに、Mont 群で有意に M2 マクロファージが増加していた(生食群 7.5% vs Mont 群 14.7%, $p < 0.05$)。

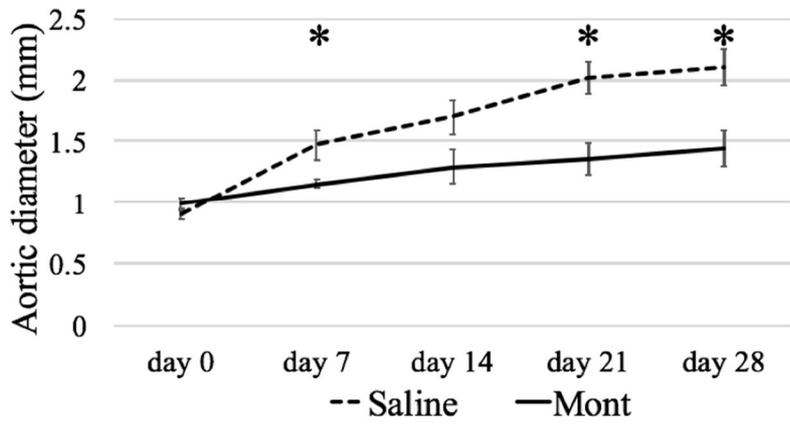


胸腹部大動脈での腹部超音波での瘤径の比較



28 日後の腹部大動脈の比較

B



*P < 0.05

添加 28 日後での瘤径の比較

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Hayashi K, Kobayashi K, Shimizu M, Tsuchikawa Y, Kodama A, Komori K, Nishida Y | 4. 巻 40(10) |
| 2. 論文標題 Self-efficacy is an independent predictor for postoperative six-minute walk distance after elective open repair of abdominal aortic aneurysm | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Disabil Rehabil. | 6. 最初と最後の頁 1114-1118 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09638288.2017.1287962 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 新美清章、小山明男、川井陽平、秋田直宏、藤井孝之、榊原昌志、鶴岡琢也、高橋範子、杉本昌之、児玉章朗、坂野比呂志、古森公浩 | 4. 巻 29(1) |
| 2. 論文標題 Direct oral anticoagulant導入後の深部静脈血栓症例の検討 | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Jpn J Phlebol | 6. 最初と最後の頁 13-19 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Sugimoto M, Takahashi N, Niimi K, Kodama A, Banno H, Komori K | 4. 巻 67(4) |
| 2. 論文標題 Long-term fate of renal function after open surgery for juxtarenal and pararenal aortic aneurysm | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 J Vasc Surg. | 6. 最初と最後の頁 1042-1050 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jvs.2017.07.121 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Sugimoto M, Takahashi N, Niimi K, Kodama A, Banno H, Komori K | 4. 巻 50 |
| 2. 論文標題 Anatomical Suitability of the GORE EXCLUDER Iliac Branch Endoprosthesis in Japanese Patients with Common Iliac Aneurysms Treated by Standard EXCLUDER Endografts | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Ann Vasc Surg. | 6. 最初と最後の頁 179-185 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.avsg.2017.11.071 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Banno H, Akita N, Fujii T, Tsuruoka T, Takahashi N, Sugimoto M, Niimi K, Komori K | 4. 巻 56 |
| 2. 論文標題 Proximal bare stent may reduce bird-beak configuration, which is associated with distal migration of stent graft in the aortic arch. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Ann Vasc Surg | 6. 最初と最後の頁 108-113 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.avsg.2018.08.081 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Tanaka A, Ishii H, Suzuki S, Ota T, Oshima H, Usui A, Komori K, Murohara T | 4. 巻 24(2) |
| 2. 論文標題 Influence of False Lumen Status on the Prognosis of Acute Type A Aortic Dissection without Urgent Surgical Treatment | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Atherosclerosis and Thrombosis | 6. 最初と最後の頁 169-175 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5551/jat.35675 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|----------------------|
| 1. 著者名 Sugimoto M, Koyama A, Niimi K, Kodama A, Banno H, Komori K | 4. 巻 43 |
| 2. 論文標題 Long-term Comparison of Endovascular and Open Repair of Abdominal Aortic Aneurysms: Retrospective Analysis of Matched Cohorts with Propensity Score. | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Annals of Vascular Surgery | 6. 最初と最後の頁 96-103 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.avsg.2017.01.011 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Hayashi K, Kobayashi K, Shimizu M, Tsuchikawa Y, Kodama A, Komori K, Nishida Y | 4. 巻 40(10) |
| 2. 論文標題 Self-efficacy is an independent predictor for postoperative six-minute walk distance after elective open repair of abdominal aortic aneurysm. | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Disability and Rehabilitation | 6. 最初と最後の頁 1114-1118 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09638288.2017.1287962 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------------|
| 1. 著者名 Hoshina K, Ishimaru S, Sasabuchi Y, Yasunaga H, Komori K | 4. 巻 Epub ahead of print |
| 2. 論文標題 Outcomes of Endovascular Repair for Abdominal Aortic Aneurysms: A Nationwide Survey in Japan. | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Annals of Surgery | 6. 最初と最後の頁 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/SLA.0000000000002508 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 秋田直宏、藤井孝之、川井陽平、鶴岡琢也、榊原昌志、高橋範子、杉本昌之、新美清章、徳田順之、坂野比呂志、碓氷章彦、古森公浩 |
| 2. 発表標題 当科における弓部大動脈瘤の治療方針とその成績 |
| 3. 学会等名 第46回日本血管外科学会学術総会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 新美清章、川井陽平、榊原昌志、秋田直宏、藤井孝之、鶴岡琢也、高橋範子、杉本昌之、坂野比呂志、古森公浩 |
| 2. 発表標題 Direct oral antioagulant(DOAC)導入後の深部静脈血栓症例の検討 |
| 3. 学会等名 第46回日本血管外科学会学術総会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 新美清章、池田脩太、秋田直宏、藤井孝之、川井陽平、榊原昌志、鶴岡琢也、高橋範子、杉本昌之、坂野比呂志、古森公浩 |
| 2. 発表標題 静脈うっ滞性潰瘍治療中に生じたスルファジアジン軟膏による接触性皮膚炎の2例 |
| 3. 学会等名 第38回日本静脈学会総会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Komori K |
| 2. 発表標題 Current status of the treatment for the patients with AAA in Japan nationwide surgery in Japan |
| 3. 学会等名 14th Chinese Capital Vascular Symposium (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Komori K |
| 2. 発表標題 Open Surgery Is The Best Treatment For Juxtarenal And Pararenal AAAs In Good Risk Patients |
| 3. 学会等名 VEITH symposium Connecting The Vascular Community 45th Annual (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 秋田直宏、緒方藍歌、藤井孝之、田畑光紀、小山明男、杉本昌之、新美清章、児玉章朗、坂野比呂志、成田裕司、碓氷章彦、古森公浩 |
| 2. 発表標題 他家間葉系幹細胞を用いた大動脈瘤治療の可能性 |
| 3. 学会等名 第117回日本外科学会定期学術集会 |
| 4. 発表年 2017年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

名古屋大学 血管外科
<http://www.vasc surg.jp/>
 名古屋大学医学系研究科・医学部医学科 血管外科（外科学第一）
http://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_J/laboratory/clinical-med/clinical-med/surgery/vascular-surg/

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|--|---|----|
| 研究分担者 | 古森 公浩 (KIMIHIRO Komori) (40225587) | 名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901) | |
| 研究分担者 | 坂野 比呂志 (BANNO Hiroshi) (80584721) | 名古屋大学・医学部附属病院・講師 (13901) | |
| 研究分担者 | 杉本 昌之 (SUGIMOTO Masayuki) (00447814) | 名古屋大学・医学部附属病院・病院講師 (13901) | |