

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16385

研究課題名(和文) クラリスロマイシンの多面的効果による、大動脈解離の分子病態是正を介した治療研究

研究課題名(英文) Therapeutic effects of aortic dissection by administration of Clarithromycin in mice

研究代表者

内田 亘 (UCHIDA, Wataru)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号：90770868

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：慢性期のB型大動脈解離やA型解離術後の残存解離に対する、薬物療法の瘤径拡大抑制効果は一定でない。一方、遺伝性疾患を除き、大動脈解離の発症・進展は、高血圧を背景に、慢性炎症を基盤とした動脈硬化に起因する。抗生物質のクラリスロマイシン(CAM)は、抗菌作用だけでなく「抗炎症作用」などの多面的効果を持つことが分かっている。本研究では、大動脈解離における一連の炎症反応を是正する新たな薬物介入療法として、CAMによる大動脈解離の発症予防及び瘤径拡大抑制効果について、その是非を明らかにすることを目的とした。CAM投与は抗炎症作用および細胞外基質の改善を介して解離性大動脈径拡大を抑制する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物実験でのクラリスロマイシンの経口投与は、大動脈解離の大動脈径拡大抑制効果を示した。既に全世界で一般的に抗菌薬として臨床使用されているクラリスロマイシンは、現在は大動脈解離に対して適応外使用である。しかしながら、クラリスロマイシンは比較的容易に臨床応用ができる可能性があり、前述した社会的必要性の高さを考慮すれば、医学的意義のある研究成果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The cause of enlarged aortic dissection is associated with increased inflammatory cytokines. Aortic Dissection is caused by the destruction of the extracellular matrix (ECM), such as elastin and collagen, which provide mechanical strength to the aortic wall. Clarithromycin (CAM) is known to be an antibiotic among macrolides and has been reported to exert a range of biologic effects, including altering the expression of inflammatory factors. In this study, we investigated whether CAM could prevent the enlargement of dissected aortic aneurysm using mice models of dissected aortic aneurysm. Administration of CAM suppressed the progression of dissected aortic aneurysm through the anti-inflammatory and the existence of abundant collagen secreted including -SMA, -actinin positive cells.

研究分野：心臓外科

キーワード：大動脈解離 クラリスロマイシン 抗炎症作用 細胞外基質 抗生物質

1. 研究開始当初の背景

【大動脈解離】

大動脈解離は内膜に亀裂が生じ、中膜が裂けることにより急性発症し、大動脈破裂や閉塞症状、大動脈弁逆流等で生命に危険が及ぶ疾患である。平成 27 年人口動態統計では「大動脈瘤及び解離」による死亡率は全死亡率の 1.3%を占めており、高齢化に伴い増加している。

B 型解離や A 型解離術後の残存解離の手術適応の多くは瘤径の拡大であるが、人工血管(グラフト)置換術は、破裂予防効果は絶大だが手術侵襲が大きく、リスクも高い。一方、カテーテル治療のステントグラフト内挿術は低侵襲だが、大動脈解離の場合、解剖学的制限のため、多くの場合が適応外となる。

再解離や、残存解離の瘤径拡大および破裂を予防するために血圧コントロールとして降圧薬(遮断薬等)が用いられるが、降圧療法のみでの瘤径拡大抑制効果は一定でなく、慢性期の再手術が回避できるとは言い切れない。従って、降圧療法だけでなく新たな分子病態を制御する低侵襲介入療法の開発が望まれる。

【薬剤による瘤径拡大抑制の期待】

腹部大動脈瘤に対する薬物療法として 遮断薬やスタチン、ACE 阻害剤、ARB、テトラサイクリン系抗生物質ドキシサイクリン、マクロライド系抗生物質ロキシシロマイシンによる瘤径拡大抑制・破裂予防を期待した効果が臨床試験で評価されているが、ACC/AHA ガイドラインでの推奨クラスはそれぞれ a~III と様々である。一方で、大動脈解離の慢性期のガイドラインでは、明らかなエビデンスを持つ有効な薬剤は現在のところない。

【クラリスロマイシン(CAM)による炎症抑制効果】

マクロライド系抗生物質クラリスロマイシン(CAM)は、14 員環構造による MMP 制御作用を持つことが知られている。また、CAM の長期少量投与による、びまん性汎細気管支炎や慢性呼吸器疾患に対して、抗生物質としての効果だけでなく、抗炎症作用による臨床効果が知られている。その分子メカニズムとして、好中球遊走や炎症局所への集積の抑制、NF- κ B シグナリング抑制を介した好中球 IL-8 の産生抑制が示された(*Auris Nasus Larynx*. 2016;43:131.)。加えて、CAM は、虚血性心疾患における心血管イベントの抑制や(*Circulation* 2002;105:1555-60.)、心筋炎および移植後心拒絶に対する効果も報告されている(*Cardiovasc ther.* 2012;30:301)。これらの報告から、CAM は抗菌作用だけでなく、多面的効果としての「抗炎症作用」を持つことが示された。

我々はこれまでに、クラリスロマイシンの抗炎症作用を利用して、大動脈瘤に対する予防効果を調べた。クラリスロマイシンを大動脈瘤モデルマウスに経口投与すると、大動脈瘤の発症・進展抑制効果が得られ、クラリスロマイシンによる瘤破裂予防効果が示あることを明らかにした(*J Vasc Surg.* 2018;68:82S-92S.)。

2. 研究の目的

本研究計画では、大動脈解離における一連の炎症反応を是正する新たな薬物介入療法として、クラリスロマイシンによる大動脈解離の瘤径拡大抑制効果について、その是非を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 動物実験

「動物の愛護および管理に関する法律」を遵守し、名古屋大学内の動物実験安全委員会での承認を得た(承認番号 M220113-001)。野生型マウス(C57BL/6J)は、日本 SLC から購入した。

モデル作成：6-8 週齢の野生型マウス C57BL/6J)に、300 mg/kg/day BAPN および 1000 ng/min/kg Angiotensin-II を、背部皮下に埋入した浸透圧ポンプ(Alzet 2004 4 週間持続注入用、Alzet 2002 2 週間持続注入用)を用いて 2 週間持続注入し、大動脈解離モデルを作成した。

投与：BAPN および Angiotensin-II の持続注入 2 週間後に、ランダムにクラリスロマイシン群(CAM 群、n=10)と生理食塩水群(SAL 群、n=10)に分け、CAM もしくは SAL の経口投与を開始する。投与は 1 日 1 回、2 週間行った。また、Angiotensin-II も引き続き 2 週間の持続注入を行った。

図 1 に study protocols を示す。

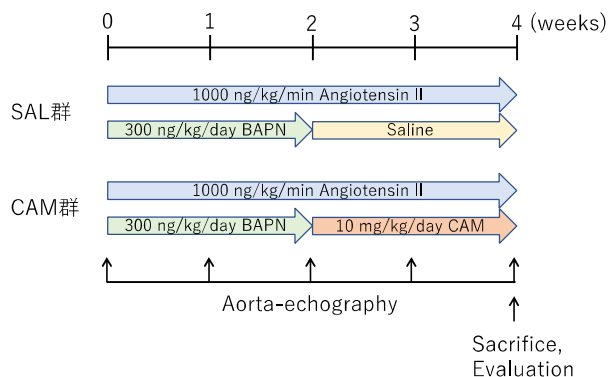


図1 Study protocols

評価方法：経時的（0,1,2,3,4週毎）に大動脈エコーを行い、大動脈径計測をした。4週後に屠殺し、死亡率の算出、大動脈の解剖学的所見、組織学的評価(Elastica Van Gieson 染色、エラスチン構造観察)、免疫組織化学染色（コラーゲン染色、TGF- β 、マクロファージ、 α -actinin、 α -SMA）ELISAによる生化学的評価（IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-4、IL-10、TGF- β 1）を行った。

（2）統計学的評価

データは、IBM SPSS software program, version 25 を用いて統計学的評価を行った。死亡率は、カプランマイヤー法によるログランク検定を用いた。大動脈径は、two-way factorial analysis of variance (ANOVA)を用いた。また、2群間比較では、unpaired t-testを用いた。統計学的有意差は、 $P < 0.05$ とした。

4. 研究成果

結果(1)：大動脈径と死亡率

0週の大動脈最大短径は、SAL群 1.1 mm、CAM群 1.1 mm だった ($P=0.15$)。2週後では、SAL群 2.0 mm、CAM群 1.9 mm と徐々に拡大した。 ($P=0.46$)。3週後では SAL群 2.4 mm、CAM群 1.9 mm ($P=0.07$)。4週後では SAL群 2.7 mm、CAM群 1.8 mm ($P<0.01$) となり、SAL群は有意に拡大していったのに対し、CAM群では有意に大動脈瘤径の拡大が抑制された。また、大動脈瘤破裂による死亡率は、SAL群 30%、CAM群 0% ($p=0.07$) だった。

結果(2)：解剖学的所見と組織学的評価

大動脈壁は、中膜の解離によりエラスチンの欠損が見られ、CAM群は欠損部をコラーゲンが補う様に集積していた。

結果(3)：免疫組織化学染色

M1 マクロファージ特異的マーカーの iNOS、M2 マクロファージ特異的マーカーの Arginase-1 を用いて蛍光免疫染色を行ったところ、SAL群に比べCAM群で iNOS 陽性率が有意に低下し (SAL群 28% vs CAM群 4%, $P<0.05$)。一方で Arginase-1 陽性率が有意に増加していた (SAL群 7% vs CAM群 21%, $P<0.05$)。また、SAL群に比べ、CAM群で α -actinin、 α -SMA および TGF- β 1 陽性率の有意な上昇を認めた (α -actinin: 16% vs 4%, $p<0.01$ 。 α -SMA: 10% vs. 3%, $p<0.05$ 。 TGF- β 1: 0.8% vs 0.1% $p<0.05$)。外膜に存在する α -actinin、 α -SMA 陽性細胞が平滑筋様細胞に分化して、細胞外基質 (ECM) の合成促進因子 TGF- β の産生を促すことが推察された。

結果(4)：生化学的評価

ELISA で組織中タンパク発現量を測定したところ、SAL群に比べ、CAM群で IL-1 β (332 vs 800 pg/mL. $p<0.01$)、IL-6 (334 vs 727 pg/mL. $p<0.01$)の有意な低下および TGF- β 1 (1649 vs 162 pg/mL. $p<0.01$)、IL-4(2519 vs 1129 pg/mL. $p<0.01$)の有意な増加を認めた。

以上の結果から、CAM投与は抗炎症作用および細胞外基質の改善を介して動脈壁を修復し、解離性大動脈径拡大を抑制する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 内田亘、成田裕司、西俊彦、大野司、芦田真一、林泰成、伊藤英樹、寺澤幸枝、徳田順之、六鹿雅登、藤本和朗、秋田利明、碓氷章彦
2. 発表標題 The possibility of Clarithromycin for the treatment of type B aorta dissection
3. 学会等名 第72回日本胸部外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Uchida W, Narita Y, Yamawaki-Ogata A, Ito H, Terazawa S, Tokuda Y, Mutsuga M, Fujimoto KL, Akiata T and Usui A
2. 発表標題 The possibility of Clarithromycin for the treatment of type B aorta dissection
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Sessions Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 内田亘、西俊之、大野司、林泰成、宗像寿祥、伊藤英樹、寺澤幸枝、徳田順之、六鹿雅登、藤本和朗、成田裕司、大島英揮、秋田利明、碓氷章彦
2. 発表標題 解離性大動脈瘤に対するクラリスロマイシンの瘤拡大抑制効果
3. 学会等名 第71回日本胸部外科学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------