

機関番号：17601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590830

研究課題名（和文） 腹部大動脈瘤の形成におけるマスト細胞の関与

研究課題名（英文） Role of mast cells in the development of abdominal aortic aneurysm

研究代表者

鶴田 敏博 (TSURUDA TOSHIHIRO)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：10389570

研究成果の概要（和文）： ヒト腹部大動脈瘤の病態解明と内科的治療法の開発基盤を目的とした。本研究は腹部大動脈壁外膜側に分布する「マスト細胞」が瘤径に相応して増加することに着目した。マスト細胞欠損ラットを用いて動脈瘤モデルの作成を試みたところ、ワイルドタイプに比べて瘤形成が生じにくいことを見出した。一方、ワイルドタイプのラットに動脈瘤モデル作成しマスト細胞の膜安定化剤を投与したところ瘤形成が生じにくかった。マスト細胞とマクロファージを共培養するとマクロファージ由来の MMP-9 が著増し、マスト細胞膜安定化剤の前処置により MMP-9 産生が抑制された。以上から、マスト細胞がマクロファージと協調しながら腹部大動脈瘤形成に関与し、同細胞の活性化を抑制することで腹部大動脈瘤の進展を抑制できる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）： Main purpose of the research was aimed at better understanding the pathophysiology of abdominal aortic aneurysm (AAA), and at pursuing a potential medical therapy for the disorder. We specifically focused on the adventitial layer on the pathogenesis. The number of “mast cells” was found to increase in the outer media or adventitia of human AAA. Aneurysmal dilatation of the aorta was seen in the control rats following peri-aortic application of calcium chloride (CaCl_2) treatment, but not in the mast cell-deficient rats. The tranilast, an inhibitor of mast cell degranulation, attenuated AAA development in the rodent models. In the cell culture experiment, a mast cell directly augmented MMP-9 activity. These data suggest that adventitial mast cells play a critical role in the progression of AAA. In addition, inhibition of mast cell activity might be a potential therapeutic target for attenuating the development/progression of AAA.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：臨床心血管病態学

1. 研究開始当初の背景

腹部大動脈瘤は動脈硬化を基盤とし、腹部

大動脈が正常の1.5倍以上に限局性に拡張する疾患である。米国での調査(Hallett JW, Jr. *Mayo Clin Proc* 75:395-399, 2000)によれば、50歳以上の人口の5%に腹部大動脈瘤が発生し破裂による死亡は年間15,000人に達するとされる。高齢化社会を迎えたわが国においても同疾患の患者数は益々増加すると予想されている。予防的(期待的)手術の成績は向上してきており、現在、厳密な血圧コントロールの下、定期的に超音波やCT検査で瘤径を測定して増大傾向(>4~5cm)である場合は破裂死を予防するため手術適応となる。しかしながら破裂を予測することは難しく、また罹患年齢は高く、他の基礎疾患を有する場合は手術不可となる場合もあり、その場合は内科での患者管理が非常に重要となる。年齢、高血圧、喫煙等が腹部大動脈瘤の危険因子となることは知られているが、未だその発症機序は明らかでない。それゆえ、腹部大動脈瘤の発症、進展機序の解明ならびに瘤径の拡大抑制を目指した新規的治療法の開発が必要と考えられる。

血管壁は内膜、中膜、外膜の3層から構成されるが、腹部大動脈瘤の中膜~外膜側にはマクロファージやリンパ球等の炎症細胞が増加することが知られている。これらの炎症細胞が血管壁に浸潤する理由は未だ明らかでないが、腹部大動脈瘤の進展にこれらに関与している可能性が示唆される(Eliason JL, et al. *Circulation* 112:232-240, 2005, Longo GM, et al. *J Clin Invest* 110:625-632, 2002, Xiong W, et al. *J Immunol* 172:2607-2612, 2004)。我々はこれまで心血管リモデリングにおける血管外膜の役割について検討してきた(*Histo Histopathol.* 2008;23:127, *Hypertension.* 2006;48:972, *Cardiovasc Res.* 2006;70:158, *Cardiovasc Res.* 2005;65:921, *Eur J Pharmacol.* 2005;508:201, *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;325,80)。これらの中で我々は血管外膜を構成する線維芽細胞の活性化が血管硬化に関与し、この活性化はcAMPやcGMP依存性に制御されることを見出し、同シグナリングを利用した心血管リモデリングの治療法の基盤を確立した。また、血管内皮障害に伴い血管外膜に集簇したマクロファージ由来の

マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)が血管の拡張性リモデリングに関与することを明らかとした。これらの研究成果は血管外膜が血管壁全体の構築の改変(リモデリング)に寄与する可能性があることを支持するものである(Herrmann J et al. *Cardiovasc Res.* 2001;51:762, Moos MPW et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:2386, Michel J-B et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:1259)。これらの研究成果を基に本申請では腹部大動脈瘤の瘤拡大の機序について外膜に焦点を当てて検討したい。

我々は即時型アレルギーをはじめとする種々の生体反応に関与するとされる「マスト細胞」に着目した。マスト細胞は血管外膜にも存在し、血管障害や動脈硬化との関連性が報告されている。マスト細胞の膜受容体であるc-kitとそのリガンドであるstem cell factorはマスト細胞の分化・増殖に重要な役割を果たしている。最近、マスト細胞がアレルギー反応のみならず、他の血球系細胞を動員して、炎症、血管新生、組織の再構築(リモデリング)に積極的に関与することが知られるようになった(Puxeddu I, et al. *Int J Biochem Cell Biol* 35:1601, 2003)。すなわち、腹部大動脈壁に分布するマスト細胞は炎症細胞の動員や血管新生を促進し、コラーゲンやエラスチンを破壊するマトリックスメタロプロテアーゼを産生することで血管壁のリモデリングに関与している可能性が示唆される。我々は血管外膜に分布するマスト細胞が炎症の「引き金」的な役割を果たし腹部大動脈瘤の進展に関与しているとの仮説を立てた。さらに、マスト細胞の機能制御により腹部大動脈瘤壁の炎症機転を制御することにより、瘤の拡大進行を抑制できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、腹部大動脈瘤の進展機序を明らかとし、腹部大動脈瘤患者に対する内科的治療戦略の基盤を確立することであり、下記の3つをサブテーマとして研究を遂行した。

3. 研究の方法

(1) ヒト正常大動脈、動脈硬化性大動脈、腹部大動脈瘤ならびに腹部大動脈瘤破裂症

例におけるマスト細胞数と局在分布

(2) マスト細胞欠損ラット (WsRC-Ws/Ws) を用いて作成した腹部大動脈瘤モデルでの動脈瘤形成におけるマスト細胞の役割の検討

(3) マスト細胞脱顆粒抑制薬による腹部大動脈瘤進展抑制効果

4. 研究成果

我々はヒト腹部大動脈瘤壁の外膜側にマスト細胞が瘤径に相応して増加することを見出した。また腹部大動脈瘤壁には「脱顆粒した」マスト細胞が数多く分布し、stem cell factor やその受容体である c-kit のリン酸化が亢進していた。マスト細胞が欠損した Ws/Ws ラットと野生型 (+/+) ラットの腹部大動脈外膜に塩化カルシウムで塗布したところ、14 日間の観察期間中で Ws/Ws ラットで瘤形成の生じにくいことを見出した。これらの瘤形成は外膜への T リンパ球の浸潤や MMP-9 活性、新生血管数の減少と関連していた。また、野生型ラットの腹部大動脈外膜に塩化カルシウムを塗布し、マスト細胞膜安定化剤 (トラニラスト) を 14 日間、継続投与すると瘤形成が抑制されることを見出した。また、自然発症アポリポ蛋白 E 欠損マウスにアンジオテンシン II を投与して腹部大動脈瘤モデルを作成した。このモデルでは粥状動脈硬化プラークを生じ瘤部の外膜側にマスト細胞が集積し一部脱顆粒していたが、プラーク内や肩部にマスト細胞を検出できなかった。この腹部大動脈瘤マウスモデルにトラニラストを投与したところ、塩化カルシウム塗布モデルと同様に、瘤形成が抑制された。ヒト腹部大動脈切片の顕微鏡下での観察で興味深かったことは、ヒト腹部大動脈瘤壁中外膜側におけるマクロファージの分布は動脈硬化性大動脈のそれとほとんど変わらないことだった。この病理学的所見は上記の動物モデルでも同様だった。ヒト腹部大動脈瘤壁での二重免疫組織染色では MMP-9 活性の 98% 以上はマクロファージ由来で一部 T リンパ球だった。一方、マスト細胞や平滑筋細胞には MMP-9 免疫活性を検出できなかった。そこで、マスト細胞はマクロファージの MMP-9 活性を亢進することで動脈瘤の形成に寄与

しているのではないかと考えた。フォルボールエステル (PMA) とカルシウムイオノフォア (A23187) で活性化させたマスト細胞株とマクロファージ株を共培養したところ、MMP-9 活性が著増することを見出した。さらに活性化マスト細胞の培養上清をマクロファージへ添加しても同等の MMP-9 活性を認め、一部は抗 IFN- γ 抗体の前処置にて減少した。マスト細胞とマクロファージの共培養上にトラニラストを添加すると MMP-9 活性が減少し、活性化マスト細胞から培養上清中への IFN- γ 分泌も低下した。これらの研究より腹部大動脈外膜に分布するマスト細胞がマクロファージと協調しながら腹部大動脈瘤形成に関与している可能性が示唆された。また、同細胞の外膜への動員や活性化を抑制することで腹部大動脈瘤の進展を抑制できる可能性がある。

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 5 件)

Tsuruda T, Kato J, Hatakeyama K, Kojima K, Yano M, Yano Y, Nakamura K, Nakamura-Uchiyama F, Matsushima Y, Imamura T, Onitsuka T, Asada Y, Nawa Y, Eto T, Kitamura K. Adventitial mast cells contribute to pathogenesis in the progression of abdominal aortic aneurysm. *Circ Res*. 102:1368-1377, 2008. 査読有

Masuyama H, Tsuruda T, Sekita Y, Hatakeyama K, Imamura T, Kato J, Asada Y, Stasch JP, Kitamura K. Pressure-independent effects of pharmacological stimulation of soluble guanylate cyclase on fibrosis in pressure-overloaded rat heart. *Hypertens Res*. 32:597-603, 2009. 査読有

Tsuruda T, Hatakeyama K, Masuyama H, Sekita Y, Imamura T, Asada Y, Kitamura K. Pharmacological stimulation of soluble guanylate cyclase modulates hypoxia inducible factor-1 α in rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*.

297:H1274-H1280, 2009. 査読有

12. Tsuruda T, Imamura T, Hatakeyama K, Asada Y, Kitamura K. Stromal cell biology: a way to understand the evolution of cardiovascular diseases. *Circ J*.

74(6):1042-1050, 2010. 査読有

Tsuruda T. Herbal dietary supplement: continuing to explore cardiovascular protection. *Cardiovasc Res*.

88(3):387-388, 2010. 査読有

[学会発表](計8件)

Tsuruda T, Kitamura K. Adventitial mast cells in the progression of abdominal aortic aneurysm. 第41回日本動脈硬化学会総会・学術総会, 2009年7月17~18日(山口)[招請講演]

鶴田敏博. 腹部大動脈瘤の進展における血管外膜の炎症機転と内科学的治療法の基盤確立. 第50回日本脈管学会総会 共催シンポジウム 財団法人循環器病研究振興財団「バイエル循環器病研究助成」第16回研究発表会, 2009年10月30日(東京)

Tsuruda T, Masuyama H, Hatakeyama K, Imamura T, Asada Y, Kitamura K. Pharmacological stimulation of soluble guanylate cyclase modulates hypoxia inducible factor-1 in rat heart. 第74回日本循環器学会学術集会, 2010年3月5~7日(京都)

Tsuruda T, Masuyama H, Hatakeyama K, Imamura T, Kato J, Asada Y, Kitamura K. Soluble guanylate cyclase-cGMP stimulation on cardiovascular remodeling associated with hypertension. International Symposium on Cardiovascular Endocrinology and Metabolism. CVEM 2010, March 31-April 1, 2010 (Nara, Japan).

Hatakeyama K, Matsuura Y, Imamura T, Tsuruda T, Nishihira K, Shibata Y, Kodama T, Asada Y. PTX3 is involved in the pathogenesis of unstable angina associated with intraplaque hemorrhage. European Society of Cardiology Congress 2010. August 28-September 1, 2010 (Stockholm, Sweden).

Sakamoto S, Tsuruda T, Hatakeyama K, Sekita Y, Imamura T, Asada Y, Kitamura K. Site specificity of adventitial inflammation during the development of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. European Society of Cardiology Congress 2010. August 28-September 1, 2010 (Stockholm, Sweden).

Tsuruda T, Nagamachi S, Endo G, Nishimura M, Matsuyama M, Hatakeyama K, Onitsuka T, Imamura T, Asada Y, Kitamura K. Increased glucose metabolic activity in abdominal aortic aneurysm: relation to facilitative glucose transporters and matrix metalloproteinases. European Society of Cardiology Congress 2010. August 28-September 1, 2010 (Stockholm, Sweden).

Tsuruda T, Nagamachi S, Sekita Y, Sakamoto S, Hatakeyama K, Imamura T, Asada Y, Onitsuka T, Kitamura K. Increased glycolysis activity in macrophages contributes to the progression of abdominal aortic aneurysm. American Heart Association. Scientific Sessions 2010. November 13-17, 2010 (Chicago, IL, USA).

[図書](計6件)

鶴田敏博、北村和雄. 腹部大動脈瘤の発症と進展機序: 血行力学 vs. 炎症・免疫応答. *血管* 32(2):37-43, 2009.

鶴田敏博、北村和雄. 腹部大動脈瘤の発症・進展とアドレノメデュリン. *Vascular Medicine* 5(3):70-76, 2009. (先端医学社、東京)

鶴田敏博、北村和雄. 大動脈瘤の分子細胞生物学. 大動脈瘤と炎症細胞(マスト細胞とマクロファージ). *血管医学* 10(3):21-29, 2009. (メディカルレビュー社、東京)

鶴田敏博. 免疫寛容機構の破綻と腹部大動脈瘤の形成. 財団法人木村記念循環器財団 研究助成業績報告集 第17集 p.15~31, 2010.

鶴田敏博、畠山金太、北村和雄. 大動脈疾患 - 大動脈解離と胸腹部大動脈瘤: 診断と

治療の進歩 1.病因と病態生理 3.分子機構と新展開 2)マスト細胞と大動脈疾患
日本内科学会雑誌 99 (2) :245-250, 2010.
鶴田敏博、畠山金太、北村和雄. 炎症と動脈硬化. マクロファージ・血管構築細胞群
日本臨床 69(1) 45-49, 2011.

〔産業財産権〕
出願状況 (計 2 件)

名称：動脈瘤の予防及び/又は治療薬
発明者：鶴田敏博、北村和雄、加藤丈司、
畠山金太
権利者：宮崎大学
種類：用途特許
番号：特開 2008-19221
出願年月日：2006 年 7 月 14 日
国内外の別：国内

名称：マトリックスメタロプロテアーゼ活性抑制組成物
発明者：鶴田敏博
権利者：宮崎大学
種類：用途特許
番号：特願 2010-187078
出願年月日：2010 年 8 月 24 日
国内外の別：国内

取得状況 (計 0 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〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

鶴田 敏博 (TSURUDA TOSHIHIRO)
宮崎大学・医学部・助教
研究者番号：10389570

(2)研究分担者

浅田 祐士郎 (ASADA YUJIRO)
宮崎大学・医学部・教授
研究者番号：70202588

畠山 金太 (HATAKEYAMA KINTA)
宮崎大学・医学部・講師
研究者番号：60325735

北村 和雄 (KITAMURA KAZUO)
宮崎大学・医学部・教授
研究者番号：50204912

加藤 丈司 (KATO JOHJI)
宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター・教授
研究者番号：20274780

鬼塚 敏男 (ONITSUKA TOSHIO)
宮崎大学・医学部・教授
研究者番号：60108595

(3)連携研究者

研究者番号：