

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20790548

研究課題名（和文） 大動脈瘤の発生及び伸展における HMGB1 の役割

研究課題名（英文） The role of HMGB1 in the development and expansion of aortic aneurysm

研究代表者

河野 隆志（KOHNO TAKASHI）

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：60327509

研究成果の概要（和文）：

塩化カルシウム塗布によるマウス大動脈瘤モデルで検討を行った。大動脈瘤モデル群は sham 群(生理食塩水塗布)に比して著明に high-mobility group box 1 (HMGB1)の発現が亢進していることが確認された。次に、大動脈瘤モデルに抗 HMGB1 中和抗体もしくはコントロール抗体を投与して検討したところ、中和抗体投与により大動脈瘤径拡大は抑制された。また炎症性サイトカイン発現、細胞外マトリックス分解酵素(matrix metalloproteinase; MMP)-9 活性、及びマクロファージ浸潤が中和抗体投与群では軽減することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Experimental AAA model was induced by periaortic application of calcium chloride in male mice. The protein expression of HMGB1 was increased in the AAA, compared with those in control mice. We administered neutralizing anti-HMGB1 antibody (AAA/antiH) or control antibody (AAA/C) to AAA mice subcutaneously. HMGB1 blockade suppressed experimental AAA formation. The expression of proinflammatory cytokines, metalloproteinase-9 activity, and the number of macrophages in the aorta were reduced in AAA/antiH compared with AAA/C.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：分子血管病態学、大動脈瘤、炎症性サイトカイン、自然免疫

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会の到来および食生活の欧米化に伴い、動脈硬化症に起因した大動脈瘤症例は増加している。動脈瘤破裂を予測する血液

マーカーや非手術的治療戦略の新たな開発は大動脈瘤診療において極めて意義が高く、未だに解決されていない大動脈瘤の発生及び進展の機序を解明することは急務である。

大動脈瘤症例では、動脈瘤の進行性拡大に伴う破裂が不良な予後と関連することが知られているが、定期的な画像検査によってもこれらを予測することはしばしば困難である。血液マーカーにより大動脈瘤の進行性拡大や破裂を予測することができれば、手術適応を検討する上で有用な情報となる。また大動脈瘤治療は人工血管置換術が主な治療法であるが、高齢者や全身状態不良な症例ではその適応が困難な場合があり、新たな非手術的治療の開発は大動脈瘤診療において急務と考えられる。

大動脈瘤は、慢性炎症を伴う動脈硬化性変化と特徴づけられ、浸潤した炎症細胞や平滑筋細胞より分泌されるMMPが、コラーゲン、エラスチン、テナシンXを分解することによって、動脈瘤は進行性に拡大する。動脈瘤における慢性炎症を惹起する要因として、機械的ストレス、酸化ストレス、炎症性サイトカイン (tumor necrosis factor- α [TNF- α]、interleukin-1 β [IL-1 β]、interleukin-6 [IL-6])などが報告されているが、これらの刺激がHMGB1の発現を亢進させることが最近報告されている。HMGB1はクロマチン編成に關与する非ヒストン核蛋白として当初は同定されたが、細胞外ストレスによってマクロファージや平滑筋細胞などが活性化されるとHMGB1が細胞外に放出され、炎症性サイトカイン、接着因子、MMPの発現亢進に寄与することが明らかにされた。

2. 研究の目的

本研究ではマウス大動脈瘤モデルを使用して、大動脈瘤の発生及び伸展におけるHMGB1の役割を明らかにすることを目的とする。

(1)マウス腹部大動脈瘤モデルを作成し、動脈瘤壁におけるHMGB1の発現を評価し、その局在について免疫組織染色を用いて検討する。

(2)炎症性サイトカイン、MMP、接着因子の発現、炎症性細胞浸潤も測定し、HMGB1発現との関連について検討する。

(3) HMGB1 中和抗体投与を行った大動脈瘤モデルを作成する。中和抗体によって起こる、動脈瘤形成や進展の変化及び大動脈瘤壁の炎症及び細胞外マトリックスの変化を評価する。

3. 研究の方法

(1)大動脈瘤モデルの作製

生後7週の野生型マウスを用い、ペントバルビタール麻酔下に開腹し、腎動脈から腸骨動脈分岐部を露出する。同部位に0.5M塩化カルシウムを浸した3X5mmのガーゼを15分間留置し、その後生食で洗浄して大動脈瘤モデルを作成した(AAA群)。生食のみの処置を行う群をsham群とした。AAA群においては、以下に示した通り、コントロール抗体群

とHMGB1中和抗体群の2群にわけて検討した。

Sham群(n=10)

大動脈瘤コントロール抗体群(n=10);コントロール抗体(200ug/日腹腔内注射、3日毎、4週間)

大動脈瘤 HMGB1 中和抗体群(n=10);HMGB1中和抗体 (200ug/日腹腔内注射、3日毎、4週間)

抗体投与量は既報に基づいて決定した(Biochem Biophys Res Commun. 2007; 360(2): 394)。

(2)大動脈径の評価

大動脈瘤摘出後に、既報に従い瘤径の測定を行った(Nat Med. 2005 Dec;11(12):1330-8.)。

(3)大動脈の摘出と組織固定

大動脈摘出の際にはペントバルビタールを大量投与した。最大に拡大した大動脈部位を採取し、一部は分子生物学的検討用の検体として生理食塩水で洗浄した後に-80℃で保存した。残りは病理学的検討のために4%パラホルムアルデヒドで固定した。

(4)大動脈組織におけるHMGB1、サイトカイン、接着因子の発現

Western blotting法;大動脈組織よりcell lysis bufferを用いて蛋白を抽出し、HMGB1の発現を検討した。

Real-time RT-PCR;大動脈組織よりRNAzolを用いてRNAを抽出し、大動脈壁におけるHMGB1、各種サイトカイン及び関連物質(TNF- α 、TNF- α converting enzyme [TACE]、monocyte chemoattract protein-1 [MCP-1]、接着因子(inter-cellular adhesion molecule 1 [ICAM1])、白血球細胞表面マーカー(CD68)の発現をreal time RT-PCRを用いて定量化する(TaqMan Gene Expression Assay, ABI Prism 7700 Detection system)。

(5)大動脈組織におけるMMPの定量

大動脈より抽出された蛋白を用いて、MMP-2及び-9の活性についてゼラチンゼイモグラフィーを用いて評価した。

(6)病理学的検討

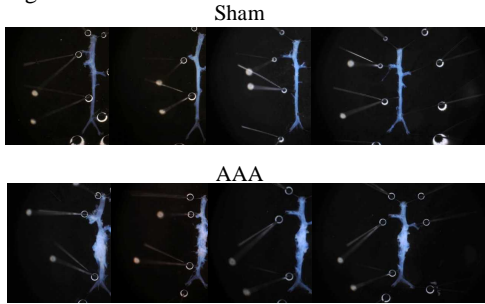
パラフィン包埋標本の6 μ mの切片を作成した。Hematoxylin and Eosin 染色、elastica van Gieson 染色により大動脈瘤における中膜層の菲薄化と弾性線維の破壊などの変化を評価した(J Clin Invest 2000;105:1605-1612)。免疫組織化学的検査は、既報に基づき免疫ペロキシダーゼ法で行った(Cardiovasc Res. 2009 Feb 15;81(3):565-73)。HMGB1抗体を用いてその発現の局在を検討した。またMac3(マクロファージ)抗体も用いて、大動脈壁への炎症細胞浸潤についても検討した。

4. 研究成果

(1)大動脈瘤モデルにおけるHMGB1の発現

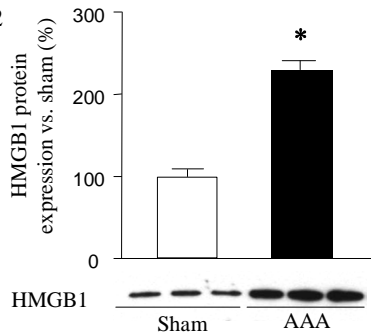
AAA群では術後4週の時点で安定して動脈瘤形成されていることを確認した(Fig.1)。

Fig. 1



AAA 群は sham 群に比して著明に HMGB1 の発現が亢進していることが確認された(Fig.2)。

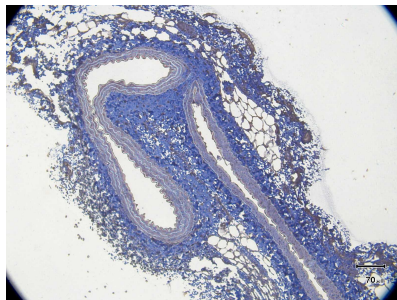
Fig. 2



*: $p < 0.05$ vs. sham

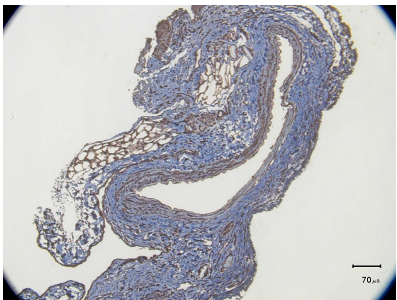
HMGB1 の免疫組織染色も施行したが、同様に sham 群と比較して(Fig.3A)大動脈瘤モデル群は(Fig.3B)で HMGB1 陽性細胞数が有意に増加しており、HMGB1 の発現は主に浸潤する炎症細胞に由来していた。

Fig. 3A



Sham

Fig. 3B



AAA

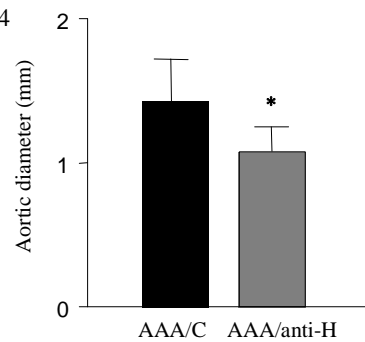
HMGB1 発現と MMP-2/-9 活性の間には有意な正の相関関係があることが確認された。また HMGB1 発現は動脈瘤径との間にも相関を示した。

(2)大動脈瘤モデルにおける HMGB1 中和抗体投与の影響

以上の通りマウス大動脈瘤モデルにおける HMGB1 発現を確認した後に、HMGB1 と大動脈瘤発生及び伸展の関連を検討するために抗 HMGB1 中和抗体を用いた。

中和抗体群はコントロール抗体群に比して、有意に大動脈瘤径が縮小していることが確認された(Fig.4)。

Fig. 4



*: $p < 0.05$ vs. AAA/C

AAA/C: 大動脈瘤コントロール抗体群

AAA/anti-H: 大動脈瘤 HMGB1 中和抗体群

また病理学評価でも、中膜層の菲薄化と弾性線維の破壊などの動脈瘤の特徴的变化が、HMGB1 中和抗体投与により軽減されることを明らかにした。

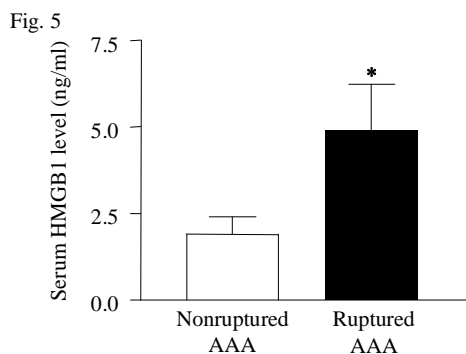
また HMGB1 中和抗体投与により MMP-9 活性が著明に抑制されることも確認された。

定量的 RT-PCR 法を用いたところ、TNF- α 、MCP-1、ICAM1、CD68 の発現が HMGB1 中和抗体投与により抑制されることを明らかにした。

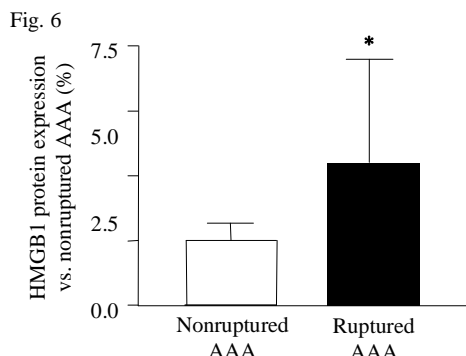
免疫組織染色の評価でも、マクロファージ浸潤が HMGB1 中和抗体投与により軽減していることを明らかにした。

(3)今後の展望

我々は、ヒト腹部大動脈瘤の血清及び大動脈瘤検体を用いた臨床研究も行っている。腹部大動脈瘤症例では、破裂例の血清 HMGB1 値は未破裂例に比して有意に上昇していることを確認した(Fig. 5)。また動脈瘤壁における HMGB1 の発現は、未破裂例と比較して破裂例でより亢進しており(Fig. 6)、瘤径の拡大に相関して亢進していた。



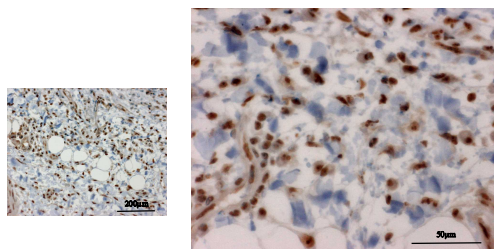
*: $p < 0.05$ vs. nonruptured AAA



*: $p < 0.05$ vs. nonruptured AAA

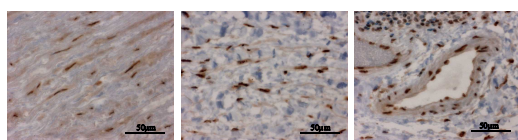
ヒト動脈瘤検体でも HMGB1 発現と MMP 活性の相関が確認され、その局在として、好中球やマクロファージなどの炎症細胞に加えて、平滑筋細胞、線維芽細胞、内皮細胞にあることが確認された(Fig.7 and 8)。

Fig. 7



Inflammatory cells

Fig. 8



Smooth muscle cells Fibroblasts Endothelial cells

以上のように、HMGB1 の腹部大動脈瘤の発生及び伸展における意義が臨床及び基礎研究の両面から確認された。今後は平滑筋細

胞やマクロファージ培養細胞による実験を行い、HMGB1 中和抗体による動脈瘤伸展の抑制機序について更なる機序の確認が必要と考える。本研究の結果から、大動脈瘤の伸展や破裂の予測マーカーとしての HMGB1 測定の確立、また HMGB1 を標的とした大動脈瘤治療の臨床応用が期待される。

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0件)

[学会発表](計6件)

Kohno T, Anzai T, Ohki T, Itabashi Y, Yoshizawa A, Yamada S, Yoshikawa T, Ogawa S. Increased High-Mobility Group Box1 Expression at Ruptured Plaque was Associated with Microvascular Damage after Reperfusion in Patients with Myocardial Infarction. 第74回日本循環器学会総会 2010年3月6日 京都

河野隆志, 安斉俊久, 内藤広太郎, 宮庄拓, 岡本実, 横田博, 山田晋吾, 前川裕一郎, 高橋寿由樹, 吉川勉, 石坂彰敏, 小川聡. 心筋梗塞後治癒過程と左室リモデリングにおける high-mobility group box 1 protein の役割. 第19回日本循環薬理学会 2009年11月21日 京都

Kohno T, Anzai T, Kaneko H, Shimizu H, Shimoda M, Miyasho T, Okamoto M, Yokota H, Yamada S, Yoshikawa T, Okada Y, Ishizaka A, Yozu R, Ogawa S. High mobility group box 1 protein expression is associated with expansion and rupture of human abdominal aortic aneurysm. The 82nd annual session meeting of American Heart Association. 15 Nov 2009 Orlando, USA.

河野隆志, 安斉俊久, 志水秀行, 山田晋吾, 吉川勉, 石坂彰利, 四津良平, 小川聡. 胸部大動脈瘤置換術後の血清 HMGB1 値の上昇は肺酸化障害と関連する 第57回日本心臓病学会学術集会 2009年9月20日 札幌

Kohno T, Kohno T, Anzai T, Shimizu H, Kaneko H, Jo Y, Yamada S, Yoshikawa T, Ishizaka A, Yozu R, Ogawa S. Serum high mobility group box 1 protein elevation is associated with acute respiratory distress syndrome following thoracic aortic aneurysm repair. European Society of Cardiology Congress 2009. 2 Sep 2009 Barcelona, Spain

河野隆志, 安斉俊久, 安西淳, 金子英弘, 眞野恵範, 内藤広太郎, 前川裕一郎, 宮庄拓, 山田晋吾, 横田博, 吉川勉, 石坂彰敏, 小川聡. ST 上昇型心筋梗塞にお

ける血清 HMGB1 値上昇の臨床的意義 .
第 29 回心筋梗塞研究会 2009 年 7 月 11
日 東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

河野 隆志 (KOHNO TAKASHI)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号 : 60327509

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし