

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22390161

研究課題名(和文) 腹部大動脈瘤におけるアドレノメデュリン・マスト細胞の意義と新たな治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new therapies and significance of adrenomedullin and mast cells in the abdominal aortic aneurysm.

研究代表者

北村 和雄 (Kitamura, Kazuo)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：50204912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円、(間接経費) 4,110,000円

研究成果の概要(和文)：腹部大動脈瘤の病態・進展機序は不明である。我々はヒト大動脈瘤組織中のマスト細胞からアドレノメデュリン(AM)が産生されることを報告した。本研究は腹部大動脈瘤モデルマウスを作成し、AMの役割を明らかにすることであった。12週齢雄ApoE^{-/-}マウス及びAM^{+/-} ApoE^{-/-}マウスにアンジオテンシンIIを投与した。更にApoE^{-/-}マウスにAM製剤を投与し、死亡率、腹部大動脈瘤発生率や動脈径を観察した。しかし、いずれのモデルでも腹部大動脈瘤の発生率や死亡率は各群間で差はなく、本研究でAMの関与は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：Abdominal aortic aneurysm (AAA) develops based on advanced atherosclerosis; however, the underlying pathogenesis remains unknown. Adrenomedullin (AM) is widely expressed in various organs and tissues, and has anti-inflammatory, anti-oxidant and angiogenic activity. We have reported that AM is produced in mast cells of human AAA and that AM exhibited the anti-fibrotic activity on fibroblasts. We investigated the role of AM in the development of AAA in 12 weeks-old male apoE^{-/-} mice bred with AM heterozygous, or its role when recombinant human (rh)AM was administered to the apoE^{-/-} male mice, which was infused with 1000ng/kg/min of angiotensin II for 28 days. Mortality tended to be higher in rhAM at 3000ng/kg/hr. Both the incidence and the size of AAA were not significant between the groups. Because of dual nature of AM action on progression or protection of AAA, we may not have observed the biological actions of AM in the development of AAA.

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：アドレノメデュリン 腹部大動脈瘤 マスト細胞

1. 研究開始当初の背景

大動脈瘤の破裂もしくは解離による死亡は、全死因の約 1%前後である(日本 2012 年: 1.3%、米国 2006 年: 0.6%)。大動脈瘤の好発部位は腹部大動脈で全体の約 75%を占める。腹部大動脈瘤の危険因子として、高血圧、喫煙、加齢などが挙げられるが、これらは動脈硬化の危険因子でもあり、動脈硬化と腹部大動脈瘤は強い関連があると考えられている。実際、腹部大動脈瘤の組織像の特徴として、中膜平滑筋層の菲薄化が観察される。シェアストレスや張力が低下すると血管平滑筋細胞の機能低下やアポトーシスを生じる。さらに、大動脈外膜側には炎症細胞の浸潤や新生血管が増生し、マトリックスメタプロテアーゼ (MMP)の産生源となる。ヒト腹部大動脈瘤組織中の MMP の活性は上昇しており(Tsuruda T et al. *Circulation Research*. 2008;102:1368-1377)、大動脈壁の弾性線維は減少し、膠原線維の占める割合は増加する。(Tsuruda T, Kitamura K. *Circulation Journal* 2009; 32: 37-43)。これらより、腹部大動脈瘤の進展機序として、血行力学的要因を背景に、動脈硬化、喫煙、高血圧、加齢を基盤として大動脈外膜に炎症・血管新生が生じ、中膜平滑筋細胞のアポトーシス、MMP の産生・活性化が起こり、細胞外基質の破壊・大動脈壁の菲薄化を経て、腹部大動脈瘤の進展に至ると考えられる。実際に我々はヒト腹部大動脈外膜のマスト細胞数が動脈硬化の進行とともに増加し、腹部大動脈瘤において更に増加することを確認した(Tsuruda T et al. *Circulation Research*. 2008; 102: 1368-1377)。また、マスト細胞とアドレノメデュリン(AM)の免疫活性の局在は一致した(Tsuruda T et al. *Cardiovasc Res*. 2006; 70: 158-164)。

AM は、ヒト褐色細胞腫から同定された 52 個のアミノ酸からなる降圧活性を有するペプチドで(Kitamura, K. et al. *BBRC*, 1993: 192, 553-560.)、機械的負荷や炎症性サイトカインにより血管平滑筋や線維芽細胞、マスト細胞などの種々の細胞で産生され、抗炎症作用、抗酸化作用、血管新生作用、抗線維化作用など様々な生理作用を有することが報告されている。

ヒトの腹部大動脈瘤壁内の AM 含量は、コントロールの正常大動脈と比較すると低下し(図 1 参照)(Tsuruda et al. *Vascular Medicine* 2009; 5: 70-76)、AM の免疫活性は

残存した血管平滑筋、外膜の線維芽細胞やマスト細胞に局在しており、瘤化に伴い中膜の血管平滑筋が減少したため、血管壁内の総 AM 含量が低下したと推察された。また、我々はマスト細胞と線維芽細胞との共培養系において、マスト細胞由来の AM が抗線維化作用を発揮することを確認した(Tsuruda T et al. *Cardiovasc Res*. 2006; 70: 158-164)。しかしながら、腹部大動脈瘤の進展において AM が保護的に作用するか促進因子か、その役割についてはよく分かっていない。

2. 研究の目的

動脈硬化、高血圧、酸化ストレスや炎症が亢進すると、血管平滑筋細胞や血管外膜に存在するマスト細胞・線維芽細胞などからの AM 産生は増加すると考えられる。AM は血管新生作用を有し(Fujita Y, et al. *Int J Urol*, 2002)、血管外膜へ炎症細胞を動員しやすい環境を作ると考えられる。また、AM は血管内皮細胞表面の接着因子の発現を誘導する(Hagi-Pavli E, et al. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004)。さらに AM は抗線維化作用を有する(Tsuruda T et al. *BBRC*, 2004, *Cardiovasc Res*, 2006)。

これらより我々は、「AM は腹部大動脈瘤の進展および大動脈破裂を促進する」と仮説をたてた。本研究の目的は腹部大動脈瘤形成における AM の役割を明らかにすることであった。

3. 研究の方法

腹部大動脈瘤モデルマウスとして、普通食で飼育した 12 週齢雄の ApoE^{-/-}マウスを使用した。ApoE は細胞からコレステロールを引き抜く作用があり、これが欠損した ApoE^{-/-}マウスでは動脈硬化が促進する。この ApoE^{-/-}マウスにアンジオテンシン (Ang) を投与すると、まずマクロファージが外膜側より大動脈内壁へ浸潤し、その後、大動脈解離を生じて解離腔に血液が流入し血栓を形成する。そして、血管外膜の炎症や血栓からのケモカインなどにより、マクロファージや線維芽細胞から MMP 産生が亢進しエラスチンが分解され、様々な大きさの動脈瘤を生じる(Daugherty A et al. *JCI* 2000; 105: 1605-1612, Manning MW, Daugherty A et al. *Vascular Medicine* 2002; 7: 45-54, Saraff

K, Daugherty A et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:1621-1626)。本実験では、ApoE^{-/-}マウス、及び ApoE^{-/-} と AM ヘテロノックアウトとのダブルノックアウトマウス (AM^{+/-} ApoE^{-/-}マウス)に Ang を 28 日間持続皮下投与し腹部大動脈瘤モデルの作成を試みた。更に、ApoE^{-/-}マウスにリコンビナントヒト AM (rhAM) を 300 ng/kg/hr、3000 ng/kg/hr 投与し、各マウス群間での死亡率、大動脈瘤発生率、腹部大動脈径を評価した。rhAM 投与量は、300 ng/kg/hr にて ApoE^{-/-}マウスの動脈硬化進展を抑制した既報 (Pan C.S. et al. *Peptides* 2010, 31; 1150-1158)、に基づいて行った。

4. 研究成果

Ang 投与 28 日後の血圧はコントロールと比較して上昇した。AM^{+/-} ApoE^{-/-}マウスと rhAM 投与群で血圧の有意な変化はみられなかった。また、体重や心拍数も全群間で有意な変化を観察しなかった (Table 1 参照)。

実験期間中に死亡したマウスは 7 例で、死因の内訳は、大動脈破裂 6 例、原因不明 1 例であった。死亡率 (大動脈破裂率) は rhAM 3000 ng/kg/hr 群が 20 % と高い傾向であったが (死亡率; ApoE^{-/-}マウス: 5.6 %, AM^{+/-} ApoE^{-/-}マウス: 3.6 %, rhAM 300 ng/kg/hr: 0 %, rhAM 3000 ng/kg/hr: 20 %)、統計学的に有意な変化を検出しなかった (Log-rank test, $p = 0.2735$) (Figure 2, 3 参照)。腹部大動脈瘤発生率 (大動脈破裂例を含む) についても、各群間で統計学的に有意な変化を検出しなかった (腹部大動脈瘤発生率; ApoE^{-/-}マウス: 50 %, AM^{+/-} ApoE^{-/-}マウス: 35 %, rhAM 300 ng/kg/hr: 37 %, rhAM 3000 ng/kg/hr: 35 %)。Ang を投与後 28 日間生存したマウスの腹部大動脈径は、コントロール群と比較すると Ang 投与群で大動脈径の増大を認めたもの (Kruskal-Wallis test, $p < 0.05$)、他の群間で統計学的な有意差を検出しなかった (Kruskal-Wallis test, $p = 0.8875$) (腹部大動脈径; ApoE^{-/-}マウスコントロール: 0.96 ± 0.1 mm, ApoE^{-/-}マウス: 1.39 ± 0.2 mm, AM^{+/-} ApoE^{-/-}マウス: 1.17 ± 0.1 mm, rhAM 300 ng/kg/hr: 1.33 ± 0.2 mm, rhAM 3000 ng/kg/hr: 1.22 ± 0.2 mm, 中央値 \pm 標準誤差) (Figure 4 参照)。

また、同モデルの ApoE^{-/-}マウスと AM^{+/-} ApoE^{-/-}マウスにおいて各々組織像を比較し

たが、大動脈外膜へ集積するマクロファージ、T リンパ球や微小血管数に有意な差はみられなかった (ApoE^{-/-}マウス $n=15$ vs. AM^{+/-} ApoE^{-/-}マウス $n=27$; マクロファージ: 33.3 ± 10.9 /mm² vs. 16.2 ± 5.5 /mm², Mann Whitney test, $p=0.1371$ 、T リンパ球: 11.0 ± 4.4 /mm² vs. 14.66 ± 3.2 /mm², Mann Whitney test, $p=0.5527$ 、微小血管: 14.8 ± 4.1 /mm² vs. 10.33 ± 1.9 /mm², Mann Whitney test, $p=0.6083$)。

1) 16 週齢の比較的若いマウスを用いた、2) 高脂肪食ではなく普通食で飼育した、3) 観察期間が短かった、ことなどから大動脈 (瘤) 径にバラつきが生じた可能性があった (0.8-2.8 mm) (Figure 5, 6 参照)。さらに AM^{+/-}マウスは胎生期死亡するため、本実験では AM^{+/-}マウスを用いたため AM の効果を充分観察できなかった可能性がある。rhAM を ApoE^{-/-}マウスに投与し補足的に評価したが、明らかな影響を見い出せなかった。

AM の血管新生、接着因子発現誘導、抗線維化作用により、AM は腹部大動脈瘤の進展および大動脈破裂を促進すると仮説をたてたが、一方で AM は抗炎症作用 (Ashizuka S et al. *Peptides.* 2005, Itoh T et al. *American Journal of Physiology.* 2007) や抗酸化作用 (Shimosawa T et al. *Circulation.* 2002) を有しており、これらの作用は腹部大動脈瘤進展に保護的に働くことが予想される。多面性を有する AM の生理学的活性が腹部大動脈瘤発生・進展に関わる種々の要因を相殺した可能性がある。

図 1

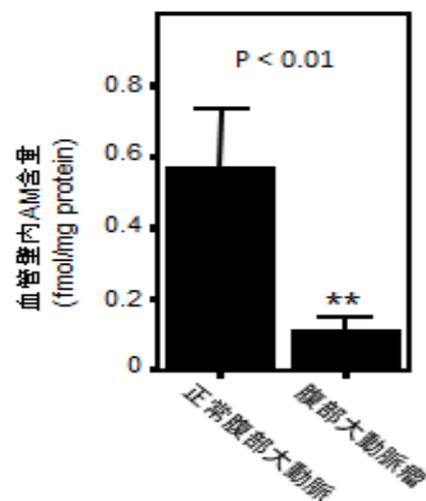


Table 1

マウスの体重・血圧・心拍数

	ApoE ^{-/-} AM ^{+/+}		ApoE ^{-/-} AM ^{+/-}		ApoE ^{-/-} AM ^{+/+}	
	Saline	Ang II 1000 ng/kg/min				
rhAM ng/kg/hr	0		300		3000	
体重 g	28.4±0.3	27.0±0.5	27.3±0.3	28.2±0.4	27.5±0.8	
収縮期血圧 mmHg	91±1	123±3 *	124±3 *	126±7 *	125±6 *	
心拍数 /min	580±8	621±17	599±13	610±12	554±16	
個体数	4	17	27	11	16	

Data are expressed as mean ± SEM *p < 0.05 vs. ApoE^{-/-}AM^{+/+} with saline.

図 2

生存率

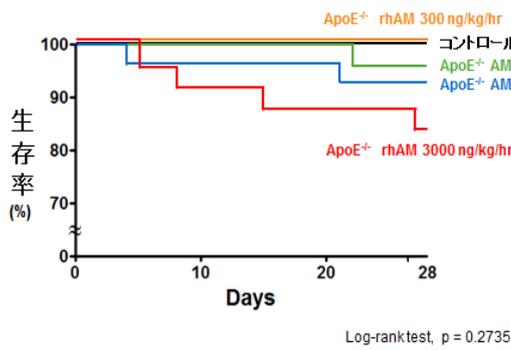


図 3

マウス各群の大動脈破裂率

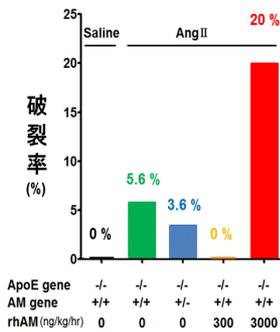


図 4

マウス各群の腹部大動脈瘤発生率

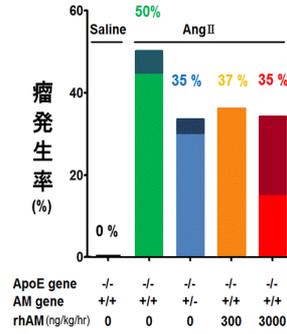


図 5

マウス各群の大動脈写真

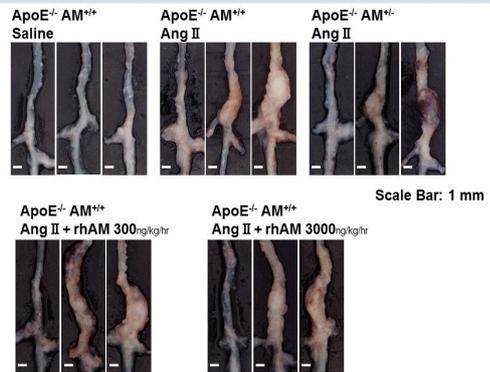
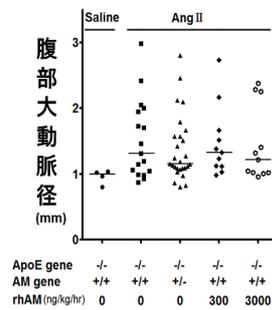


図 6

マウス各群の腹部大動脈径



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 6件)

Sakamoto S, Tsuruda T, Hatakeyama K, Shimosawa T, Asada Y, Kitamura K: Adrenomedullin does not contribute toward the development of abdominal aortic aneurysm in mice. 査読有
Health 2014; 6(10): 1077-1084

Tsuruda T, Hatakeyama K, Nagamachi S, Sekita Y, Sakamoto S, Endo GJ, Nishimura M, Matsuyama M, Yoshimura K, Sato Y, Onitsuka T, Imamura T, Asada Y, Kitamura K: Inhibition of development of abdominal aortic aneurysm by glycolysis restriction. 査読有
Arterioscler Thromb Vasc Biol 2012; 32: 1410-1417

Tsuruda T, Kitamura K: Adrenomedullin: Roles for structure and function in cardiac or vascular tissues. 査読有
Current Hypertension Reviews 2011; 7: 268-272

Kuwasako K, Kitamura K, Nagata S, Hikosaka T, Kato J: Function of the cytoplasmic tail of human calcitonin receptor-like receptor in complex with receptor activity-modifying protein 2. 査読有
Biochem Biophys Res Commun 2010; 392: 380-385

Nagata S, Kato J, Kuwasako K, Kitamura K: Plasma and tissue levels of proangiotensin-12 and components of the renin-angiotensin system (RAS) following low- or high-salt feeding in rats. 査読有
Peptides 2010; 31: 889-892

Tsuruda T, Imamura T, Hatakeyama K, Asada Y, Kitamura K: Stromal cell biology: a way to understand the evolution of cardiovascular diseases. 査読有
Circ J; 2010; 74; 1042-1050

[学会発表](計 9件)

坂元紀陽、鶴田敏博、畠山金太、下澤達雄、浅田祐士郎、北村和雄:

Adrenomedullin does not contribute toward the development of abdominal aortic aneurysm in mice.

第17回日本心血管内分泌代謝学会学術総会

2013年11月22日～23日 大阪府豊中市

郝異琳、鶴田敏博、関田陽子、坂元紀陽、畠山金太、浅田祐士郎、北村和雄:

Glucose metabolism in macrophages contributes to the development of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice.

第17回日本心血管内分泌代謝学会学術総会

2013年11月22日～23日 大阪府豊中市

Tsuruda T, Hao Y, Sekita Y, Hatakeyama K, Asada Y, Kitamura K: Angiotensin II stimulates osteoprotegerin production through angiotensin II type 1 receptor in rats. 第77回日本循環器学会学術集会
2013年3月15日～17日 神奈川県横浜市

Tsuruda T, Yamaguchi M, Furukawa K, Ideguchi T, Kawagoe J, Onitsuka H, Ishikawa T, Kitamura K: Reduced fractional shortening of right ventricular outflow tract is associated with adverse outcome in patients with left ventricular dysfunction. American Heart Association. Scientific Sessions 2012.
2012年11月3日～7日 Los Angeles, USA

Tsuruda T, Imamura T, Masuyama H, Sekita Y, Koyama S, Ideguchi T, Kawagoe J, Onitsuka H, Ishikawa T, Date H, Hatakeyama K, Asada Y, Kitamura K: Angiotensin II-dependent osteoprotegerin production in murine and human heart.
European Society of Cardiology Congress 2012
2012年8月25日～29日 Munch, Germany

Sakamoto S, Tsuruda T, Kitamura K: Dysregulation of RANTES to Interleukin-10 is Associated with the Enlargement of Abdominal Aorta in

Aged-Apolipoprotein E Knockout Mice.
第76回日本循環器学会学術集会
2012年3月16日 福岡県福岡市

坂元紀陽、鶴田敏博、北村和雄: 動脈硬化進展における血管外膜の炎症: アポリポ蛋白質E欠損マウスでの検討
第7回西日本血管・機能研究会
2011年8月6日 福岡県福岡市

Sakamoto S, Tsuruda T, Kitamura K.:
Age dependent and regional difference of Inflammatory responses in the development of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice.
The 60th American College of Cardiology (Annual Scientific Session 2011)
2011年4月4日 New Orleans, USA

Kuwasako K, Kitamura K, Nagata S, Hikosaka T, Kato J: Interaction between receptor activity-modifying proteins (RAMPs) and G-protein-coupled receptors and the function of the C-terminal tail of calcitonin receptor-like receptor in complex with RAMP2.
7th International Symposia on the CGRP Family; CGRP, Adrenomedullin, Amylin, Intermedin and Calcitonin.
2010年8月31日 Queenstown, New Zealand

〔図書〕(計 6 件)

北村和雄、鶴田敏博
ストローマからみた心血管病。「序章」; 循環器内科 2013; 74(2): 123-124

鶴田敏博、北村和雄
ストローマからみた心血管病。「ストローマをターゲットとした心血管病の治療」; 循環器内科 2013; 74(2): 125-131

Sakamoto S, Tsuruda T, Hatakeyama K, Sekita Y, Imamura T, Asada Y and Kitamura K
Mast cell density and distribution in human abdominal aortic aneurysm, Etiology, Pathogenesis and Pathophysiology of Aortic Aneurysms and Aneurysm Rupture; Reinhart Grundmann (Ed.); 2011: 55-66
ISBN: 978-953-307-523-5, InTech, Available from:
<http://www.intechopen.com/articles/sh>

ow/title/mast-cell-density-and-distribution-in-human-abdominal-aortic-aneurysm.

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 2011; 69(1): 45-49

鶴田敏博、坂元紀陽、北村和雄
炎症・免疫からみた心血管病. 腹部大動脈瘤形成と炎症; 循環器内科 2011; 69(6): 571-577

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 I. 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 2010; 99(2): 245-250

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称: 動脈硬化の検査方法

発明者: 北村和雄 他 3 名

権利者: 宮崎大学

種類: 特願

番号: 2012-084684

出願年月日: 2012 年 4 月 3 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: 特願

番号: 2010-187078

出願年月日: 2010 年 8 月 24 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北村 和雄 (KITAMURA KAZUO)

宮崎大学・医学系研究科・教授

研究者番号: 5 0 2 0 4 9 1 2

(2) 研究分担者

鶴田 敏博 (TSURUDA TOSHIHIRO)

宮崎大学・医学系研究科・講師

研究者番号: 1 0 3 8 9 5 7 0

(3) 研究分担者

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: 2 0 2 7 4 7 8 0