

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 24 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791264

研究課題名（和文） IL-6系によるマクロファージ分化制御機構の解明と大動脈瘤治療法への応用

研究課題名（英文） Macrophage differentiation in abdominal aortic aneurysm via IL-6 signals

研究代表者

大野 聡子 (OHNO SATOKO)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：80569418

研究成果の概要（和文）：ヒト瘤では IL-6 下流の JAK/STAT 経路が病態に寄与することが示唆され、マウス瘤でも JAK/STAT 活性化と瘤径拡大に相関が見られた。マクロファージ IL-6 シグナル亢進マウス(mSOCS3-KO)を用いた実験では瘤形成に影響せず、瘤病態にマクロファージ IL-6 シグナルの作用は重要ではないと考えられた。しかし、アンジオテンシン II 負荷により mSOCS3-KO でのみ大動脈解離を発症することを発見し、分子メカニズム解明のため研究を継続している。

研究成果の概要（英文）：In this project, we investigated the hypothesis that IL-6/JAK/STAT pathway is activated and involved in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm (AAA), using human AAA tissue culture and mouse model of AAA. We found that human AAA tissue secretes large amount of IL-6 in culture media, and JAK/STAT pathway is involved in the secretion of a subset of inflammatory cytokines. We also found that JAK/STAT pathway is activated in mouse model of AAA during the rapid expansion of the diameter. However, macrophage-specific deletion of SOCS3 gene (mSOCS3-KO), which should enhance the IL-6 signal, did not affect the formation of AAA in mice. Unexpectedly, mSOCS3-KO showed greater susceptibility to acute aortic dissection (AAD) upon the angiotensin II infusion compared to wild type mice. Thus, macrophage IL-6 signal appears to be dispensable for AAA development, but essential to AAD development in mouse models.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：血管外科学、大動脈瘤、サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

【背景】

大動脈瘤は無症状のまま慢性に進行し、破裂に

より突然死を来す原因不明の疾患である。本邦において年間 10 万人以上の新規発症があるとされ、大血管手術症例の 50%以上を占める。大

動脈瘤治療の最大の目標は破裂予防であるが、現在は大径瘤に対する手術しか選択肢が無い。手術適応でない 5 cm 以下の小径瘤であっても年間 0.5 - 5%が破裂を来すとされ、有効な治療法の確立が急務である。

大動脈瘤では、IL-6 を始めとする様々な炎症性サイトカインを介してタンパク分解酵素が産生され、エラスチンやコラーゲンなどの細胞外マトリクスが破綻することが病態の本質と考えられ、その制御は治療に直結する(青木ら, *Nature Medicine* 2005)。炎症細胞の中でもマクロファージは、炎症性サイトカインやタンパク分解酵素の産生細胞として、病態に中心的な位置を占めている。

マクロファージには少なくとも2つの機能的分化状態(M1, M2)があることが知られており、M1 は炎症・組織破壊作用を、M2 は抗炎症・組織修復作用を発揮する。M1 マクロファージは大動脈瘤促進的と推定され、M2 マクロファージは大動脈瘤に対して治療的に働くことが期待される。しかし、大動脈瘤における M1, M2 マクロファージの分化制御機構とその意義は未解明である(図1)。

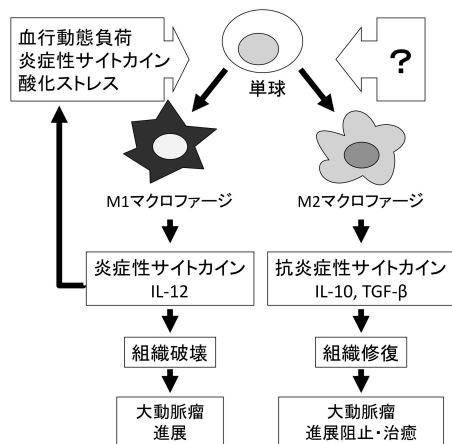


図 1. 大動脈瘤病態と M1/M2 マクロファージに関する本研究の仮説を示す。

マクロファージの分化制御メカニズム解明によりコントロールが可能になれば、慢性炎症の制御と治療促進により、画期的な大動脈瘤治療法の開発に直結すると期待される。

【本研究の仮説】

腫瘍細胞に浸潤したマクロファージは IL-6 依存的に M2 に分化することが報告されている(*Blood* 2007)。さらに、本研究所の安川らは IL-6 シグナ

ルの抑制因子である SOCS3 をノックアウトしたマクロファージでは IL-6 が強力な抗炎症作用を起こすことを発見した(安川ら, *Nature Immunology* 2003)。これらのことから、申請者はマクロファージにおいて SOCS3 の機能を阻害することで分化状態を M1 から M2 に移行させることができ、大動脈瘤の炎症を消退させ組織修復を促進できるとの仮説を着想した(図2)。

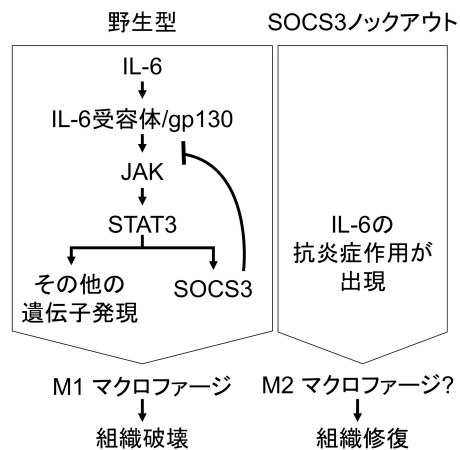


図2. マクロファージの M1/M2 分化における IL-6/SOCS3 の機能に関する仮説を示す. SOCS3 ノックアウトにおける抗炎症作用の機序は不明である (*Nat Immunol* 2003)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、大動脈瘤において IL-6/SOCS3 によるマクロファージ分化制御機構を解明し、治療的応用を検討することとした。

目的(1) ヒト大動脈瘤組織におけるマクロファージの分化制御の解析

目的(2) マウス大動脈瘤病態モデルにおいて IL-6/SOCS3 系がマクロファージ分化制御に果たす役割の解明

3. 研究の方法

【実験系】

目的1, 2に対応した実験系を用いる(表1)。

	ヒト大動脈瘤組織	マウスCaモデル
観察項目	組織学的変化 M1/M2分化、局在	瘤の進行 組織学的変化 M1/M2分化
介入項目	JAK阻害薬	SOCS3 KO

表 1. 本研究の観察項目と介入項目

計画1. ヒト大動脈瘤組織: 書面にて同意を得られた腹部大動脈瘤患者の人工血管置換術中

に組織を採取した。組織破壊の程度から4つに分類し、それぞれの部位からRNAを抽出して網羅的な解析を行った。病理組織標本では内因性のIL-6とマクロファージ分化状態を解析した。ヒト大動脈瘤は組織構築を保ったまま培養が可能である。JAK 阻害薬の存在下/非存在下でIL-6 を添加して、マクロファージ分化と炎症、組織破壊に与える影響を調べた。

計画2. マウス大動脈瘤モデル: マウス腎動脈下大動脈にCaCl₂を塗布して大動脈瘤を発症するCaモデルを用いて、IL-6系によるマクロファージ制御の、*in vivo*での意義を検証した。野生型マウス、マクロファージ特異的SOCS3ノックアウトマウスでCaモデルを作成し、6週間まで経時的に解析した。

IL-6系亢進モデルとしてネガティブフィードバック因子であるSOCS3のマクロファージ特異的ノックアウトマウスを用いた(安川, *Nat Immunol* 2003)。マクロファージ特異的ノックアウトは、Socs3のfloxedマウスとLysozyme M遺伝子座にCre recombinase遺伝子を組み込んだマウス(LysM-creマウス)を交配して作成した。組織特異的ノックアウトにすることで多臓器の影響を避け、全身ノックアウトが胎生致死となる問題も回避できた。

【検討項目】

各々の実験系では、IL-6系の活性(STAT3リン酸化)、細胞外マトリックス分解酵素の発現および活性を測定した。マクロファージ分化(M1, M2)を表面マーカーで判定した。マウス大動脈瘤モデルにおいて超音波、血管造影、灌流固定標本で瘤径を測定した。

4. 研究成果

成果(1) ヒト大動脈瘤

まずヒト大動脈瘤でIL-6下流シグナルのSTAT3が活性化されており、これがJAK阻害薬で抑制されることを確認した。培養液中のサイトカインを測定し、50種類中CCL-4(MIP-1b), CCL-7(MCP-3), CXCL-9(MIG), CXCL-10(IP-10)を含む11種類のサイトカインがJAK依存性であった(表2)。また、組織のmRNA発現を解析し、これらJAK依存性のサイトカインは正常組織から瘤

に移行する炎症の強い部位で多く発現していることが分かった。

ケモカイン			接着因子		
IP-10	MIG	SDF-1a	ICAM-1	VCAM-1	
GROa	MCP-1*	MCP-3	増殖因子		
MIP-1a	MIP-1b	RANTES	PDGF-b	FGF basic	HGF
IL-8*	CTACK	Eotaxin	b-NGF	VEGF*	SCF
JAKを活性化するリガンド			M-CSF		
IL-2	IL-2Ra	IL-3	抗炎症性サイトカイン		
IL-4	IL-5	IL-6*	IL-1ra	IL-10	IL-13
IL-7	IL-9	IL-12(p40)	その他		
IL-12(p70)	IL-15	LIF	IL-16	MIF	SCGF-b
IFN-a2	IFN-g	G-CSF			
GM-CSF					
TNFおよびTIR					
IL-1a	IL-1b	IL-17			
IL-18	TNF-a	TNF-b			
TRAIL					

表2. ヒト瘤に含まれるサイトカイン。網掛けはJAK依存性が認められたもの。

成果(2) マウス大動脈瘤モデル

CaモデルではCa処置後7日後、42日後で瘤径が拡大し、それに一致して炎症細胞の浸潤、STAT3の発現と活性化が見られた(図3)。しかしながらmSOCS3-KOでマクロファージIL-6シグナルを亢進させても、Caモデルの大動脈瘤は野生型と同等であった。

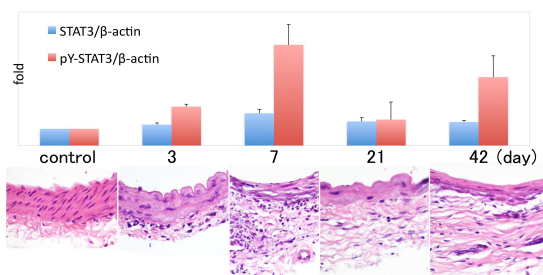


図3. 大動脈径が拡大する時期に一致して、二峰性のSTAT3活性化が見られた。

そこで血管負荷のためCaモデルにアンジオテンシンIIの持続投与を行った(Ca+AngIIモデル)。腎動脈下大動脈には野生型とmSOCS3-KOで同等の大動脈瘤が形成された。しかし予想外なことに、mSOCS3-KOでのみ、腎動脈上大動脈で解離を発症した(図4)。中膜が突然断裂し血栓、偽腔を形成する組織像はヒト大動脈解離をよく再現している。解離部位では、マクロファージの浸潤、STAT3の発現・活性化が見られた。

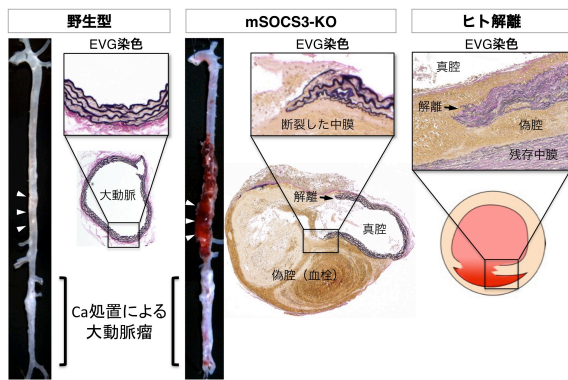


図4. mSOCS3-KO では、アンジオテンシン負荷でヒトと類似した大動脈解離を発症した。

まとめ

ヒト、野生型マウスの実験から大動脈瘤病態の活動性と JAK/STAT シグナルが深く関連していることがわかり、JAK や JAK 依存性サイトカインを治療ターゲットとしたり、瘤病態のバイオマーカーとして利用できる可能性が示唆された。しかし mSOCS3-KO を用いた実験では、マクロファージ IL-6 シグナルの亢進は実験的大動脈瘤モデルに影響しないことが明らかとなった。一方、大動脈解離においてはマクロファージ IL-6 シグナルが重要な役割を果たすことが示唆された。大動脈解離は突然に大動脈が破綻して死に至る重篤な疾患であるが、瘤と同じく分子メカニズムが不明であり、予防法や内科的治療法が確立されていない。本研究では大動脈瘤の治療法開発には至らなかったが、研究過程で発見した大動脈解離モデルを用いて IL-6 とマクロファージの役割について研究を継続する。

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 1 件)

- ① Shintani, Y., Nishihara, M., Ohno, S., Furusho, A., Aoki, H., Hiromatsu, S-i., Akashi, H., Imaizumi, T., Aoyagi, S. Hepatocyte growth factor promotes an anti-inflammatory cytokine profile in human abdominal aortic aneurysm tissue, *Atherosclerosis*, 査読有, Vol.216, 2011, 307-12,

[学会発表] (計 3 件)

- ① Macrophage IL-6 signaling is critically involved in the pathogenesis of acute aortic dissection, Satoko Ohno, Hiroki Aoki, Michihide Nishihara, Aya Furusho, Saki Hirakata, Norifumi Nishida, Hideo Yasukawa, and Tsutomu Imaizumi, 第 76 回日本循環器学会学術集会:2012.03.18 福岡
- ② JAK/STAT pathway is highly active and regulates a subset of cytokines in abdominal aortic aneurysm, Satoko Ohno, Hiroki Aoki, Michihide Nishihara, Aya Furusho, Tsutomu Imaizumi, 第 75 回日本循環器学会学術集会:2011.08.03 横浜
- ③ JAK/STAT 系による大動脈瘤のサイトカインネットワーク制御, 大野聡子, 青木浩樹、西原通秀、今泉 勉, 第 33 回日本高血圧学会総会:2010.10.15 福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大野 聡子 (OHNO SATOKO)
久留米大学・医学部・助教
研究者番号: 80569418

(2) 研究分担者 なし ()

研究者番号:

(3) 連携研究者 なし ()

研究者番号: