

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861237

研究課題名(和文)大動脈瘤におけるB細胞機能の解明と次世代の診断治療法開発

研究課題名(英文)The role of B cells in pathogenesis of abdominal aortic aneurysm

研究代表者

古荘 文(FURUSHO, AYA)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：80597427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：大動脈瘤壁に存在するB細胞と免疫グロブリンの意義を検討した。マウス大動脈瘤モデルではヒト瘤と同様に瘤壁にB細胞浸潤と免疫グロブリン沈着を認めた。B細胞欠損マウス( $\mu$ MTマウス)では野生型と比べて大動脈瘤形成が抑制され、JNK活性、Syk活性、MMP-9発現が低下していた。 $\mu$ MTマウスに免疫グロブリンを投与すると野生型と同程度の瘤が形成された。ヒト瘤組織培養に免疫グロブリン投与するとMMP-9とIL-6の分泌が上昇した。以上よりB細胞は免疫グロブリンの炎症促進作用を介して瘤病態を促進することを明らかにした。今後、瘤の病勢評価や治療法開発に向けた研究を進める。

研究成果の概要(英文)：In this project, we examined the role of B cells in pathogenesis of abdominal aortic aneurysm (AAA) using human AAA tissue culture and mouse model of AAA. We found that B cell-deficient mice ( $\mu$ -MT) developed smaller AAA than wild type (WT) mice, which was associated with reduced activities of JNK and MMP-9. Administration of mouse immunoglobulins to  $\mu$ -MT resulted in larger AAA with higher expression of MMP-9, indicating that the presence of immunoglobulins was required for the full formation of AAA. Furthermore, treatment of human AAA tissue in culture with human immunoglobulins significantly increased secretions of MMP-9 and IL-6, consistent with the findings in mouse AAA model. These findings indicate that B cells promote AAA through the proinflammatory effect of immunoglobulins. Elucidation of the role of B cells and immunoglobulins will provide a new insight into the AAA pathogenesis that is essential for the development of novel diagnostic and therapeutic strategies.

研究分野：循環器一般

キーワード：大動脈瘤 慢性炎症 B細胞 免疫グロブリン

## 1. 研究開始当初の背景

### 【臨床的背景】

大動脈瘤は無症状のまま大動脈壁の局所的な脆弱化と拡張が進行し、破裂による突然死をきたす原因不明の疾患である。本邦では年間数万人が発症すると推定され、人口高齢化による急増が懸念される。現在の治療法は大動脈瘤に対する破裂予防手術に限られており、大血管手術症例の50%以上を占める。症例の大多数を占める小動脈瘤は年間0.5-5%が破裂をきたすが治療法は確立されていない。現時点では瘤破裂の危険性は専ら瘤径で評価されており、病態活動性の指標がない。病態活動指標が得られれば、破裂危険度の高い患者の層別化による個別最適化医療の実現に大きく前進する。

### 【学術的背景】

大動脈瘤では慢性炎症に伴い活性化するタンパク分解酵素が血管壁の脆弱化を引き起こすが、慢性炎症の形成・維持機構には不明な点が多い。動脈硬化と比較して大動脈瘤にはB細胞浸潤と免疫グロブリン沈着が特徴的であり(Ramshaw, Histopathology, 1990)、瘤壁に存在するリンパ球、マクロファージが大動脈瘤の病態を促進すると報告されている(Koch, Am J Pathol, 1990)。しかし大動脈瘤におけるB細胞の役割は解明されていない。

我々は、大動脈瘤壁に浸潤するB細胞は、サイトカインおよび免疫グロブリンを介して大動脈瘤病態を制御するという仮説(図1)のもと予備的検討を開始した。

マウス大動脈瘤モデルとして、大動脈周囲にCaCl<sub>2</sub>を塗布して慢性炎症を惹起し約6週間で瘤が完成するCaモデルを用いた(Caモデル)。マウス大動脈瘤壁にB細胞と免疫グロブリン沈着を認めた。ヒト瘤組織培養では、リツキシマブによるB細胞除去でIL-6が低下し、ヒトポリクローナルIgG投与でIL-6が増加した。これらの結果は、瘤組織でB細胞

が他の炎症細胞と相互作用し、免疫グロブリン(IgG)を介して瘤病態に炎症促進的に関わることを強く示唆し、我々の仮説を支持する。

瘤におけるB細胞の役割が明らかになることで、B細胞の活性化を指標とした病態評価が可能になると期待される。さらに、B細胞および免疫グロブリンが瘤病態を悪化させる機序が明らかになることで、瘤病態の急性増悪を新たな病態活動指標で捉え、B細胞機能を一時的に抑制するなど、病態診断と一体化した新たな治療戦略の開発が期待される。

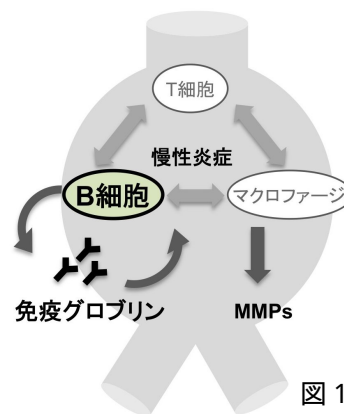


図1. 本研究の仮説

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、大動脈瘤におけるB細胞の役割について、ヒト大動脈瘤組織とマウス大動脈瘤モデルを用いて解明することである。

## 3. 研究の方法

### 【実験系】

#### (1) マウス大動脈瘤モデル

大動脈周囲にCaCl<sub>2</sub>を塗布して慢性炎症を惹起し約6週間で瘤が完成するCaモデルを用いて、大動脈瘤におけるB細胞の役割を検証した。野生型マウス、 $\mu$ MTマウスでCaモデルを作成し解析した(図2)。

#### (2) ヒト大動脈瘤組織

書面にて同意を得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。ヒト大動脈瘤は組織構築を保持したまま培養が可能である。B細胞除去(抗CD20抗体;リツキシマブ投与)/非除去、免疫グロブリン投与/非投

与を行い炎症、組織破壊に与える影響を調べた。また、病理組織標本の観察も行った(図2)。

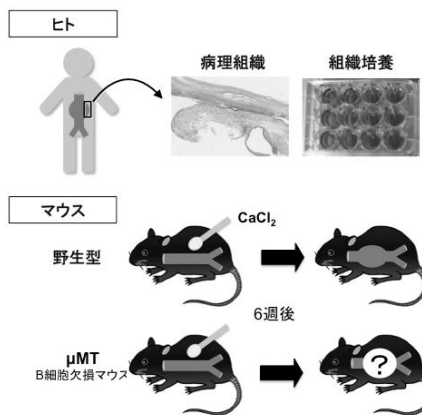


図2. 本研究の実験系

#### 4. 研究成果

##### (1) マウス大動脈瘤モデル

マウス大動脈瘤組織を用いた検討  
免疫組織染色で、野生型マウス大動脈瘤壁にB細胞・T細胞・マクロファージから成る細胞集塊と免疫グロブリンが存在することを確認した(図3、図4)。B細胞を欠損するμMTマウスでは、野生型と比較して瘤形成が抑制されており(図5)、免疫制御チロシンキナーゼ Syk 活性および JNK 活性の抑制(図6)、細胞外マトリックス(ECM)分解酵素 MMP-9 の低下と ECM 合成酵素 LOX の増加(図7)がみられた。さらに、μMTマウスの瘤モデルに免疫グロブリンを投与すると MMP-9 が増加し瘤形成が促進された(図5)。

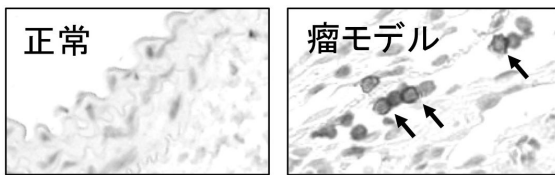


図3. マウス大動脈瘤にはB細胞が存在した。

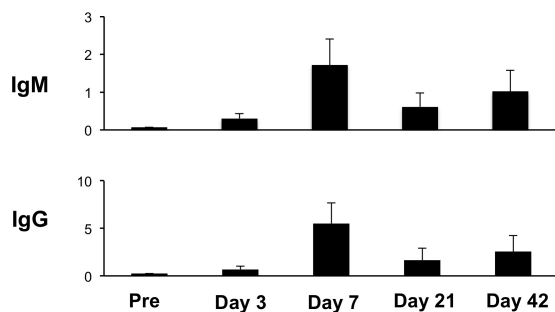


図4. マウス大動脈瘤には免疫グロブリンが存在した。

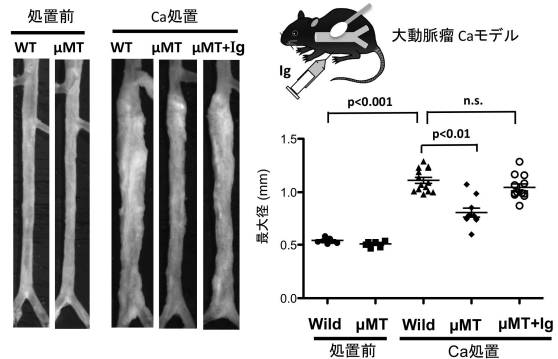


図5. 免疫グロブリンはマウス大動脈瘤を促進させた。

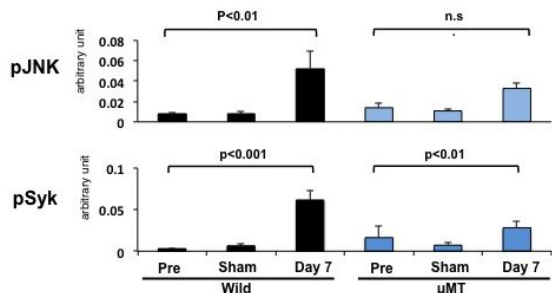


図6. B細胞除去下では炎症性シグナル(JNK, Syk)の活性化が抑制された。

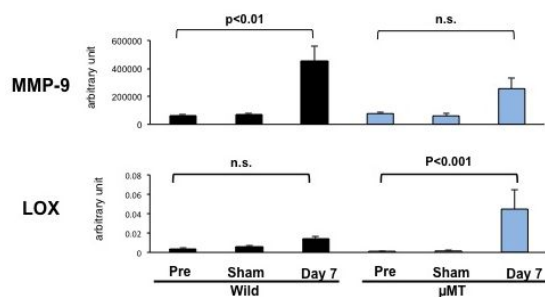


図7. B細胞除去下ではECM分解酵素MMP-9の低下とECM合成酵素LOXの増加がみられた。

##### ヒト大動脈瘤組織

ヒト大動脈瘤培養において、免疫グロブリン投与により IL-6 分泌と MMP-9 発現が上昇したことから、ヒト病態でも免疫グロブリンが重要であることが示された(図8)。

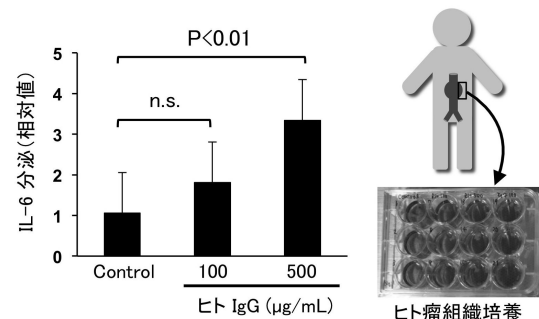


図8. ヒト瘤組織にIgGを投与すると用量依存性にIL-6分泌が上昇した。

## まとめ

以上の知見から、研究代表者はB細胞から分泌される免疫グロブリンが炎症および細胞外マトリックス分解を促進し、瘤形成を促進するとの結論に達した。原理的にはB細胞または免疫グロブリンは大動脈瘤の治療標的になり得るが、実臨床では現実的ではないと考える。我々はB細胞活性化と免疫グロブリンの炎症促進作用の双方に関わる免疫制御チロシンキナーゼ Syk に着目し、その機能解明により現時点では困難な瘤病態の制御や病態診断が可能になると着想し研究を継続している。

## 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. Kimura T, Shiraishi K, Furusuo A, Ito S, Hirakata S, Nishida N, Yoshimura K, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Ikeda Y, Miyamoto T, Ueno T, Hamano K, Hiroe M, Aonuma K, Matsuzaki M, Imaizumi T, Aoki H  
Tenascin C protects aorta from acute dissection in mice

*Scientific Reports*, 査読あり, 4, 2014, Article number:4051, DOI 10.1038/srep04051

[学会発表](計 16 件)

1. Aya Furusho, Hiroki Aoki, Michihide Nishihara, Satoko Ohno, Saki Hirakata, Norifumi Nishida, Sohei Ito, Makiko Hayashi, Yoshihiro Fukumoto

B Cells and Immunoglobulin Promotes Development of Abdominal Aortic Aneurysm  
第79回日本循環器学会学術集会/2015年4月25日(4月24日-26日) 大阪 ORAL English

2. Saki Hirakata, Satoko Ohno, Hiroki Aoki, Michihide Nishihara, Aya Furusho, Norifumi Nishida, Sohei Ito, Makiko Hayashi, Yoshihiro Fukumoto

Protective Role of STAT3 in Vascular Smooth Muscle Cells During the Development of Aortic Dissection

第79回日本循環器学会学術集会/2015年4月25日(4月24日-26日) 大阪

3. Satoko Ohno, Hiroki Aoki, Michihide Nishihara, Aya Furusho, Saki Hirakata, Norifumi Nishida, Sohei Ito, Makiko Hayashi, Yoshihiro Fukumoto

Molecular Pathogenesis of Aortic Dissection: Macrophage-mediated Changes in Vascular Smooth Muscle-specific Gene Expression

第79回日本循環器学会学術集会/2015年4月25日(4月24日-26日) 大阪

6. Norifumi

4. Nishida, Satoko Ohno, Hiroki Aoki, Michihide Nishihara, Aya Furusho, Saki Hirakata, Sohei Ito, Makiko Hayashi, Yoshihiro Fukumoto

Excessive Sodium Intake Exacerbates Aortic Dissection through IL-17 Pathway

第79回日本循環器学会学術集会/2015年4月25日(4月24日-26日) 大阪

5. Aya Furusho, Hiroki Aoki, Michihide Nishihara, Satoko Ohno, Saki Hirakata, Norifumi Nishida, Sohei Ito, Makiko Hayashi, Yoshihiro Fukumoto

B cells Promote the Development of Abdominal Aortic Aneurysm through a proinflammatory response

第31回国際心臓研究学会/2014年11月28日(11月28日-29日) 名古屋

6. Saki Hirakata, Satoko Ohno, Hiroki Aoki, Michihide Nishihara, Aya Furusho, Norifumi Nishida, Sohei Ito, Yoshihiro Fukumoto

Protective role of STAT3 in vascular smooth muscle cells during the development of acute aortic dissection

第 31 回国際心臓研究学会/2014 年 11 月 28 日  
(11 月 28 日-29 日) 名古屋  
7.Satoko Ohno, Hiroki Aoki, Aya Furusho,  
Saki Hirakata, Norifumi Nishida, Sohei Ito,  
Makiko Hayashi, Yoshihiro Fukumoto  
Involvement of Macrophage IL-6 Signaling  
in Aortic Dissection  
第 3 1 回国際心臓研究学会/ 2014 年 11 月 28  
日(11 月 28 日-29 日).名古屋  
8.Nishida, Hiroki Aoki, Michihide  
Nishihara, Satoko Ohno, Aya Furusho, Saki  
Hirakata, Sohei Ito, Makiko Hayashi, Hideo  
Yasukawa, Yoshihiro Fukumoto  
Excessive Sodium Intake Exacerbates Acute  
Aortic Dissection through Proinflammatory  
IL-17 Pathway"  
第 3 1 回国際心臓研究学会/ 2014 年 11 月 29  
日(11 月 28 日-29 日).名古屋  
9.Satoko Ohno, Hiroki Aoki, Michihide  
Nishihara, Aya Furusho, Saki Hirakata,  
Norifumi Nishida, Sohei Ito, Yoshihiro  
Fukumoto  
A Common Gene Network Governs the Cellular  
Phenotypes in Acute Aortic Dissection  
American Heart Association Scientific  
sessions 2014, Chicago, November15-19,  
2014  
10.Saki Hirakata, Satoko Ohno, Hiroki Aoki,  
Michihide Nishihara, Aya Furusho,  
Norifumi Nishida, Sohei Ito, Yoshihiro  
Fukumoto  
Protective role of STAT3 in vascular  
smooth muscle cells during the development  
of acute aortic dissection  
American Heart Association Scientific  
sessions 2014, Chicago, November15-19,  
2014  
11.Aya Furusho, Hiroki Aoki, Michihide  
Nishihara, Satoko Ohno, Saki Hirakata,  
Norifumi Nishida, Sohei Ito, Yoshihiro

Fukumoto  
The Role of B Cells in Pathogenesis of  
Abdominal Aortic Aneurysm  
ESC Congress 2014/2014 年 8 月 30 日(8 月 30  
日-9 月 3 日) Barcelona  
12.Satoko Ohno, Hiroki Aoki , Michihide  
Nishihara , Aya Furusho , Saki Hirakata ,  
Norifumi Nishida , Sohei Ito , Yoshihiro  
Fukumoto  
Molecular determinant of the development  
of acute aortic dissection  
European Society Of Cardiology 2014/2014  
年 8 月 30 日(8 月 30 日-9 月 3 日) Barcelona  
13.Aya Furusho, Hiroki Aoki, Michihide  
Nishihara, Satoko Ohno, Saki Hirakata,  
Norifumi Nishida, Sohei Ito, Yoshihiro  
Fukumoto  
Involvement of B cells in Pathogenesis of  
Abdominal Aortic Aneurysm  
The 18th International Vascular Biology  
Meeting/2014 年 4 月 14 日(4 月 14-17 日)  
Kyoto  
14.Satoko Ohno, Hiroki Aoki , Michihide  
Nishihara , Aya Furusho , Saki Hirakata ,  
Norifumi Nishida , Sohei Ito , Yoshihiro  
Fukumoto  
Involvement of Macrophage Cytokine  
Signaling in Acute Aortic Dissection  
International Vascular Biology Meeting/  
2014 年 4 月 14 日(4 月 14-17 日) Kyoto  
15.Aya Furusho, Hiroki Aoki, Michihide  
Nishihara, Satoko Ohno, Saki Hirakata,  
Norifumi Nishida, Sohei Ito, Yoshihiro  
Fukumoto  
Involvement of B cells in Pathogenesis of  
Abdominal Aortic Aneurysm  
第 78 回日本循環器学会学術集会/2014 年 03  
月 23 日(3 月 21 日-23 日). 東京  
16.Satoko Ohno, Hiroki Aoki, Michihide

Nishihara, Aya Furusho, Saki Hirakata,  
Norifumi Nishida, Sohei Ito, Hideo  
Yasukawa, Tsutomu Imaizumi, Yoshihiro  
Fukumoto

Macrophage Cytokine Signaling Dtermines  
the Development of Acute Aortic Dissection  
第 78 回日本循環器学会学術集会/2014 年 03  
月 23 日(3 月 21 日-23 日). 東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

古 莊 文 ( FURUSHO AYA )

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：80597427

(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：