

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 19 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：25861238

研究課題名(和文)大動脈瘤の分子病態におけるIL-6の意義解明と大動脈瘤安定化・治療法の開発

研究課題名(英文)The role of IL-6 in molecular pathogenesis of abdominal aortic aneurysm and its therapeutic implication

研究代表者

西原 通秀(NISHIHARA, Michihide)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：70569417

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)：腹部大動脈瘤(AAA)には現在有効な薬物療法がなく、慢性炎症による動脈壁の破壊が本態とされている。我々は予備実験でヒトAAAにおけるIL-6の分泌とJAK/STAT経路に関わる遺伝子発現の亢進を認め、CaCl<sub>2</sub>を大動脈に塗布するAAAモデルマウスを作製し、IL-6受容体阻害抗体(MR16-1)の投与によるAAA形成と分子病態の解析を行った。MR16-1の全身投与群ではAAA形成が抑制され、炎症や組織破壊に関わる分子の発現が軽度抑制され、また組織修復に関わる分子の発現が亢進した。以上からIL-6の阻害は主に修復を亢進する事でAAA形成を抑制しており、有望な治療標的となる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Abdominal aortic aneurysm (AAA) is characterized by chronic inflammation and destruction of aortic walls with no established pharmacotherapy. In this study, we investigated into the role of IL-6 in AAA pathogenesis using mouse model of AAA that was induced by periaortic application of CaCl<sub>2</sub>. Systemic administration of the IL-6 receptor blocking antibody (MR16-1) suppressed formation of AAA in mice. Histological findings indicated less destruction of AAA wall with MR16-1 treatment. Immunofluorescence staining and imaging cytometric analysis revealed the activation of Smad2, an effector of TGF-beta signal. Consistently, biochemical studies showed suppression of MMP-2 and enhancement of lysyl oxidase expression. Therefore, IL-6 promotes AAA formation in the mouse model and its suppression has a therapeutic potential.

研究分野：大動脈疾患、循環器一般

キーワード：大動脈瘤 慢性炎症 炎症性サイトカイン IL-6 STAT3 細胞外マトリクス

1. 研究開始当初の背景

(1)大動脈瘤は大動脈壁の脆弱化と拡張が進行する原因不明の疾患で、成人の突然死の大きな原因の一つとなっている。本邦において年間数万人の新規発症があり、超高齢化社会で更に増加すると見られる。治療選択肢は破裂危険率が高い大径瘤に対する開胸・開腹による人工血管置換術およびステントグラフトによる血管内治療術に限られ、内科的な治療法は確立していない。

(2)大動脈瘤壁では、慢性炎症により組織破壊が亢進すると同時に組織修復が抑制されている。従来の研究から、瘤病態を消退させ壁を安定化させるためには、組織破壊を抑制するのみならず、慢性炎症自体を抑制し組織修復能を回復させることが重要とされている。しかし、瘤壁における慢性炎症の維持機構には不明な点が多く、現時点では炎症を消退させる効果的な内科療法は存在せず、瘤組織では、代表的な炎症性サイトカイン IL-6 が高発現しているが、その病的意義は明らかでない。

(3)申請者は関節リウマチ、炎症性腸疾患において IL-6 が主要な慢性炎症メディエータであることから、大動脈瘤でも IL-6 が重要な役割を担うと着想した。申請者は予備的検討により以下の結果を得た。マウス腹部大動脈周囲に CaCl<sub>2</sub> を塗布して惹起される慢性炎症による大動脈瘤モデルを用いた。急性期(1週後)と慢性期(4週後)の二峰性に炎症細胞浸潤と STAT3 の活性化を認め、その時期に一致して瘤径が拡大した。Ca 処置による瘤形成は、IL-6 受容体阻害抗体の投与により抑制された。ヒト大動脈瘤では IL-6 が高発現し STAT3 の活性が高かった。これらの知見は IL-6 が大動脈瘤病態の中心的なサイトカインであることを示している。これらの知見を臨床応用につなげるためには、瘤病態のどのような局面が IL-6、JAK/STAT 系により制御されているか、特に瘤病態で重要な慢性炎症と組織修復能との関わりを明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、大動脈瘤における炎症病態において IL-6、JAK/STAT 系が中心的な役割を果たすとの仮説を検証する。申請者の予備実験の結果から、IL-6、JAK/STAT 系は大動脈瘤病態において慢性炎症の維持・増幅に関わると考えている。具体的には研究期間内に IL-6 受容体阻害抗体による瘤病態の安定化、すなわちマウス大動脈瘤の形成抑制を検討する。マウスモデルにおける大動脈瘤への治療的效果を明らかにし、新たな治療戦略の開発を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、マウス大動脈瘤モデルにおいて IL-6、JAK/STAT 系の機能解析を行なう。以下のモデルを使用する。

マウス大動脈瘤モデル：腎動脈下大動脈に 0.5 M CaCl<sub>2</sub> を塗布すると 6 週間後に慢性炎症による大動脈瘤が形成される。病理学的にヒト大動脈瘤と良く対応しており、再現性の高いモデルである。処置前日にマウス IL-6 受容体阻害抗体 (MR16-1; 入手済) を投与する。予備検討から、初回 2 mg/個体を CaCl<sub>2</sub> 処置前日に尾静注、処置後 0.5 mg/個体/週を腹腔内投与し 6 週間後に手術死させる。コントロール群を含め 4 群設定した。

1) Sham 群：

CaCl<sub>2</sub> の代わりに NaCl を塗布した群。尾静脈注射や腹腔内投与は行わない。

2) CaCl<sub>2</sub> 処置 + NaCl 投与群(以下 Na 群)：

CaCl<sub>2</sub> 処置を行い、尾静注 + 腹腔内投与に NaCl を使用した群。

3) CaCl<sub>2</sub> 処置 + rat IgG 群(以下 IgG 群)：

CaCl<sub>2</sub> 処置を行い、尾静注 + 腹腔内投与に rat IgG を使用した群。

4) CaCl<sub>2</sub> 処置 + MR16-1 群(以下 MR 群)：

CaCl<sub>2</sub> 処置を行い、尾静注 + 腹腔内投与に MR16-1 を使用した群。

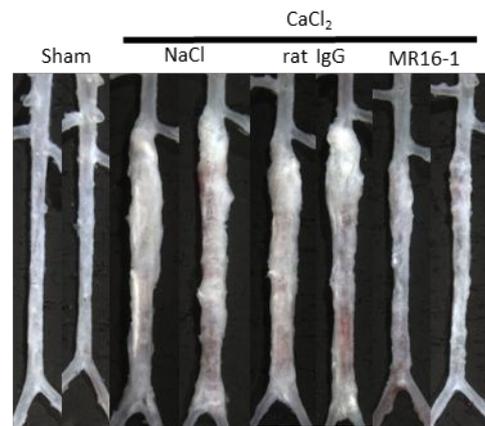
以上の 4 群について処置 6 週間後に手術死させ、瘤径の測定を行い、また急性期の病理学的、分子的变化を検討するために、処置 1 週間後に手術死させて、以下(表 1)のような病理組織像、STAT3 を含むシグナル活性化、組織破壊活性、DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析を比較する。組織破壊および修復制御の観点からそれぞれの有効性と差異を明らかにする。

アッセイ項目		アッセイ方法	
		染色	定量評価
組織学的解析	細胞、核 弾性繊維 膠原繊維	HE 染色 EVG 染色 Azan 染色	-
サイトカイン	IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, INF- $\gamma$	免疫化学染色	抗体ビーズアレイ
シグナル分子	STAT3, JNK, p38, ERK, Akt	発現およびリン酸化 免疫化学染色	Western Blot法
	NF $\kappa$ B	蛍光免疫染色 核移行定量	
ECM破壊	MMP-2,-9	-	ザイモグラム
網羅的評価	大動脈瘤組織	-	DNA マイクロアレイ

表 1. 本研究の検討項目

4. 研究成果

(1)処置 6 週間後に手術死させたモデル。



#### <腹部大動脈の肉眼的所見>

最大瘤径、拡大率(右腎動脈下～左腎動脈上の正常部分の最小径と最大瘤径の比)のいずれも、Sham 群と比較し Na 群で有意に拡大しており、IgG 群も同様に拡大。MR 群は Na 群、IgG 群と比較し、最大瘤径、拡大率ともに有意に抑制された。

#### <腹部大動脈の組織所見>

左腎動脈下と総腸骨動脈分岐部間の 1/2 の部分から総腸骨動脈分岐部までの部位を使用、短軸切片。

・ HE 染色)

Sham 群に比し Na 群で大動脈径の拡大と大動脈周囲に好中球やマクロファージ等の炎症細胞浸潤を認め、IgG 群でも同様の所見を認めたが、MR 群では大動脈径の拡大と炎症細胞浸潤のいずれも抑えられていた。

・ EVG 染色) Sham 群に比し Na 群で大動脈径の拡大、エラスチン層の菲薄化、部分的な断裂を認めた。IgG 群でも同様の所見を認めたが、MR 群では大動脈径の拡大とエラスチン層の破壊のいずれも抑えられていた。

(2) 処置 1 週間後に手術死させたモデル。

#### <腹部大動脈の組織所見>

・ STAT3 の免疫染色)

Sham 群では大動脈壁内の平滑筋細胞、周囲の細胞(各種～細胞)においても STAT3 による核の染まりは僅かであったが、Na 群では大動脈壁の破壊が進んでいる部位に浸潤した細胞でも、それ以外の比較的大動脈壁の破壊や周囲の細胞浸潤の少ない部位においても核が染まっていた。IgG 群でも同様の所見を認めたが、MR 群では周囲の細胞において核の染まりは抑えられていた。

・ PSTAT3 の免疫染色)

Sham 群では大動脈壁内の平滑筋細胞、周囲の細胞(各種～細胞)においても P-STAT3 による核の染まりは僅かで、Na 群では大動脈壁の破壊が進んでいる部位に浸潤した細胞でも、それ以外の比較的大動脈壁の破壊や周囲の細胞浸潤の少ない部位においても核が染まっている。IgG 群でも同様の所見を認めたが、MR 群では周囲の細胞において核の染まりは抑えられていた。

・ NF B の免疫染色)

#### <Bio-Plex>

マウス血清中の IL-1、IL-17、IFN-、TNF- の濃度はいずれの群でも特に著変なし。マウス血清中の IL-6 は Sham 群に比し Na 群、IgG 群で増加しており、MR 群で有意に増加している。

IL-10 に関しては有意差ではないが、IL-6 と同様の傾向を認めた。

#### <Western Blot( actin 補正後)>

・ PSTAT3 : Sham に比し Na 群で著明に発現が亢進しており、IgG 群では Na 群に比し有意に

発現が抑制されており、MR 群でも同様に発現が抑制されていた。

・ STAT3 : Sham に比し Na 群で発現が亢進しており、IgG 群、MR 群でも同等に発現が亢進していた。

・ P-JNK : Sham に比し Na 群で発現が亢進しており、IgG 群、MR 群では Na 群に比し僅かに発現が抑制されていた。

・ JNK-band 1 : Sham に比し Na 群で発現が亢進しており、IgG 群では発現が抑制されており、MR 群では Na 群と同等に発現が亢進していた。

・ JNK-band 2 : Sham に比し Na 群では発現が亢進しており、IgG 群では僅かに発現が抑制、MR 群も IgG 群と同等に発現が抑制されていた。

・ LOX-band 1 : Sham に比し Na 群で発現が亢進しており、IgG 群、MR 群でも Na 群と同等に発現亢進していた。

・ LOX-band 2 : Sham に比し Na 群で発現が亢進しており、IgG 群では発現抑制され、MR 群では Na 群と同等に発現が亢進していた。

#### <Zymography( actin 補正後)>

・ MMP-9 : Sham に比し、Na 群にて発現亢進しており、IgG 群では発現が抑制されており、MR 群では Na 群と同等に発現が亢進していた。

・ MMP-2 : Sham に比し Na 群で発現が亢進しており、IgG 群では発現が抑制されており、MR 群では Na 群と同等に発現が亢進していた。

#### <免疫蛍光染色(アレイスキャン)>

・ P-STAT3+ SMA :

Sham 群に比し Na 群で SMA 陽性細胞が減少しており、SMA 陰性で P-STAT3 陽性の細胞が増加している。IgG 群では僅かに P-STAT3 陽性細胞が減少、P-STAT3 陰性の SMA 陽性細胞が増加している。MR 群では P-STAT3 陽性で SMA 陽性の細胞は IgG 群より更に増加している。

・ NF B+ SMA

Sham 群に比し Na 群では SMA 陽性細胞が減少、NF B 陽性で SMA 陰性の細胞が増加している。IgG 群では Na 群に比し僅かに SMA 陽性細胞が増加しており、更に NF B 陽性で SMA 陰性の細胞は増加している。MR 群では IgG 群に比し NF B によらず SMA 陽性細胞が増加している。

・ pSmad2+ SMA :

Sham 群に比し Na 群では SMA 陽性細胞が減少しており、pSmad2 陽性細胞が増加している。IgG 群では Na 群に比し更に pSmad2 陽性細胞が増加しており、MR 群では IgG 群に比し pSmad2 陽性で SMA 陽性の細胞が増加している。

#### <RNA マイクロアレイ>

マウス大動脈組織では CaCl<sub>2</sub> 処置群で炎症、増殖に関わる遺伝子の発現亢進がみられた。

結論としてマウス IL-6 受容体阻害抗体の投

与群でマウス AAA モデルにおける AAA の形成は抑制され、分子病態において IL-6 受容体阻害抗体投与群で STAT3 や JNK、NF B、MMP 等の炎症やマトリクスの破壊に関わる分子はあまり変化がなく、LOX や pSmad2 といった修復に関わる分子の発現亢進がみられ、それにより大動脈瘤の形成が抑制されたと考えられた。

#### 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 14 件)

- 1 第 31 回国際心臓研究学会 (ISHR) 日本部会 (2014 年 11 月 28~29 日:名古屋)  
A Furusho, H Aoki, M Nishihara, S Ohno, S Hirakata, N Nishida, S Itou, Y Fukumoto ; B cells Promote the Development of Abdominal Aortic Aneurysm through a proinflammatory response.
- 2 第 31 回国際心臓研究学会 (ISHR) 日本部会 (2014 年 11 月 28~29 日:名古屋)  
S Ohno, H Aoki, M Nishihara, A Furusho, S Hirakata, N Nishida, S Itou, M Hayashi, Y Fukumoto ; Involvement of Macrophage IL-6 Signaling in Aortic Dissection.
- 3 第 31 回国際心臓研究学会 (ISHR) 日本部会 (2014 年 11 月 28~29 日:名古屋)  
N Nishida, H Aoki, S Ohno, M Nishihara, A Furusho, S Hirakata, M Hayashi, S Itou, H Yasukawa, Y Fukumoto ; Excessive Sodium Intake Exacerbates Acute Aortic Dissection through Proinflammatory IL-17 Pathway.
- 4 American Heart Association Scientific Sessions 2014, Chicago, IL, USA, November 15 - 19, 2014  
S Hirakata, H Aoki, M Nishihara, S Ohno, A Furusho, N Nishida, S Itou, Y Fukumoto ; Protective Role of Stat3 in Vascular Smooth Muscle Cells During the Development of Acute Aortic Dissection.
- 5 American Heart Association Scientific Sessions 2014, Chicago, IL, USA, November 15 - 19, 2014  
S Ohno, H Aoki, M Nishihara, A Furusho, S Hirakata, N Nishida, S Itou, H Yasukawa, Y Fukumoto ; A Common Gene Network Governs The Cellular Phenotypes in Aortic Dissection.
- 6 ESC Congress 2014, Barcelona, Spain, August 30 - September 3, 2014  
A Furusho, H Aoki, M Nishihara, S Ohno, S Hirakata, N Nishida, S Itou, Y Fukumoto ; The role of B cells in pathogenesis of abdominal aortic aneurysm.
- 7 ESC Congress 2014, Barcelona, Spain, August 30 - September 3, 2014  
S Ohno, H Aoki, M Nishihara, A Furusho, S Hirakata, N Nishida, S Ito, H Yasukawa, Y Fukumoto ; Molecular determinant of the development of acute aortic dissection.
- 8 The 18th International Vascular Biology Meeting, Kyoto, Japan, April 14-17, 2014  
S Ohno, H Aoki, M Nishihara, A Furusho, S Hirakata, N Nishida, S Itou, H Yasukawa, Y Fukumoto ; Involvement of Macrophage Cytokine Signaling in Acute Aortic Dissection.
- 9 The 18th International Vascular Biology Meeting, Kyoto, Japan, April 14-17, 2014  
A Furusho, H Aoki, M Nishihara, S Ohno, S Hirakata, N Nishida, S Itou, Y Fukumoto ; Involvement of B cells in Pathogenesis of Abdominal Aortic Aneurysm.
- 10 第 78 回日本循環器学会学術集会 (2014 年 3 月 21~23 日:東京)  
S Ohno, H Aoki, M Nishihara, A Furusho, S Hirakata, N Nishida, S Itou, H Yasukawa, Y Fukumoto ; Macrophage Cytokine Signaling Determines the Development of Acute Aortic Dissection.
- 11 第 78 回日本循環器学会学術集会 (2014 年 3 月 21~23 日:東京)  
A Furusho, H Aoki, M Nishihara, S Ohno, S Hirakata, N Nishida, S Itou, Y Fukumoto ; B cell Promotes the Development of Abdominal Aortic Aneurysm.
- 12 American Heart Association Scientific Sessions 2013. November 16 - 20, 2013. Dallas, TX, USA.  
Satoko Ohno, Hiroki Aoki, Michihide Nishihara, Aya Furusho, Saki Hirakata, Norifumi Nishida, Souhei Itou, Tsutomu Imaizumi: Deciphering the Sequential Molecular Events during Onset of Acute Aortic Dissection.
- 13 American Heart Association Scientific Sessions 2013. November 16 - 20, 2013. Dallas, TX, USA.  
Michihide Nishihara, Hiroki Aoki, Satoko Ohno, Aya Furusho, Saki Hirakata, Norifumi Nishida, Shohei Ito, Hideo Yasukawa, and Tsutomu Imaizumi: Involvement of IL-6 in Pathogenesis of Abdominal Aortic Aneurysm.
- 14 第 77 回日本循環器学会学術集会 (2013 年 3 月 15 日~17 日;横浜)  
Satoko Ohno, Hiroki Aoki, Michihide Nishihara, Aya Furusho, Saki Hirakata, Norifumi Nishida, Souhei Itou, Tsutomu Imaizumi: Macrophage IL-6 Signaling is Critically Involved in the Progression of Acute Aortic Dissection

〔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

西原 通秀 (NISHIHARA, Michihide)  
久留米大学 心臓・血管内科 助教  
研究者番号：70569417

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：