

令和元年6月2日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10651

研究課題名(和文) 腹部大動脈瘤の病態形成における好中球細胞外トラップの役割解明と治療への応用

研究課題名(英文) The role of neutrophil extracellular traps in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm

研究代表者

佐藤 明 (Sato, Akira)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：30528469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では腹部大動脈瘤(AAA)において、好中球が好中球細胞外トラップ(Neutrophil extracellular traps: NETs)を形成しAAAの病態形成に重要な役割を果たしており、AAAにおけるNETsの役割を検討した。AAA病変の好中球浸潤部位にNETsを認め、AAAの病変部に集積する好中球がNETsを介して炎症反応を増悪させ、NETsの構成成分であるDNAやエラスターゼ、ヒストンがToll様受容体(TLR)を介して自然免疫を活性化することを明らかにした。DNA分解酵素によるNETs阻害によりAAAの炎症反応は抑制され、瘤径の拡大進行の抑制が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化社会を迎えたわが国において、AAAの疾病率は益々増加しており、AAAの発症、進展機序のさらなる解明と瘤径の拡大進行の抑制を目指した新規治療法の開発が望まれている。AAAの病態形成には炎症が関わっているが、その過程に好中球によるNETsが関与するという報告は見られていない。本研究において、AAAにおけるNETs形成阻害による抗炎症効果、ならびにその後の瘤の拡大抑制効果が示され、AAAの病態形成にNETsの関与が明らかとなり、NETsを標的とする新規治療法開発への基礎的研究となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, neutrophils form neutrophil extracellular traps (NETs) and may play an important role in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm (AAA), and the role of NETs in AAA was examined. NETs are found at neutrophil infiltration sites in AAA lesions, and neutrophils accumulated in AAA lesions exacerbate the inflammatory response via NETs, and DNA, elastase and histone, which are components of NETs, are toll-like receptors. It has been shown to activate innate immunity via (TLR). The inhibition of NETs by DNA degrading enzyme suppressed the inflammatory response of AAA, and suppressed the progression of aneurysm diameter.

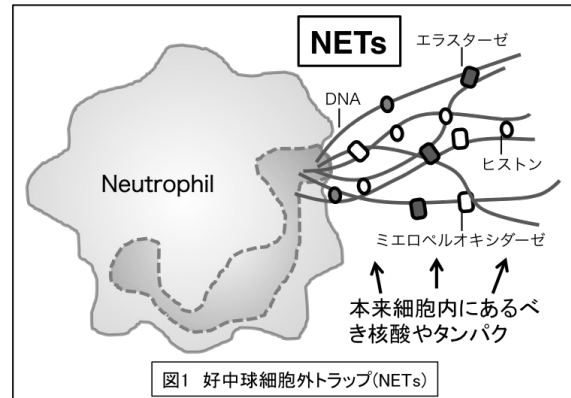
研究分野：循環器内科学

キーワード：腹部大動脈瘤 好中球細胞外トラップ 好中球エラスターゼ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

好中球は、生体が細菌などに感染した際、感染局所にいち早く集積して感染源を除去する、感染防御の最前線で機能する免疫細胞である。これまで好中球は、貪食と活性酸素の放出により細菌を不活化すると考えられてきた。しかし最近これらの他に、好中球は、自ら細胞死を引き起こし自身の核酸と抗菌タンパクを構成内容とする好中球細胞外トラップ (Neutrophil extracellular traps: NETs、図) とよばれる網目状の捕捉構造を形成し、細菌を効率よく捕捉・除去するということが明らかにされてきている。NETs では本来細胞内にあるべき成分(好中球細胞内の核酸、タンパク、プロテアーゼ等)を細胞外に放出するため、それ自体が自然免疫系に対する内因性リガンドおよび組織破壊酵素として作用し、炎症反応を増強させる可能性が考えられている。それに関連して、全身性エリテマトーデスや ANCA 関連腎炎などの自己免疫性疾患の他、動脈硬化、急性心筋梗塞の責任病変、深部静脈血栓症への関与も指摘されている。腹部大動脈瘤 (AAA) では、マクロファージ、T リンパ球等の血球系細胞を特徴とする慢性炎症と、主にマクロファージが産生するマトリクスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase: MMP) による中膜エラスチン、コラーゲン線維の破壊、平滑筋細胞による正常血管構造維持に必要な細胞外マトリクス産生の抑制、アポトーシス亢進による平滑筋細胞の減少である。これらの事象により血管壁が脆弱化し、血圧負荷に対する耐性が低下するため徐々に瘤径は拡大、最終的に致死性の高い破裂に至る。また、好中球を除去することによってマウス AAA の進展を抑制した報告がみられているが、AAA で炎症を惹起する一次的な原因は現時点でも不明であり、好中球が AAA の病態形成に重要な役割を果たしている可能性が推測される。



自己免疫性疾患の他、動脈硬化、急性心筋梗塞の責任病変、深部静脈血栓症への関与も指摘されている。腹部大動脈瘤 (AAA) では、マクロファージ、T リンパ球等の血球系細胞を特徴とする慢性炎症と、主にマクロファージが産生するマトリクスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase: MMP) による中膜エラスチン、コラーゲン線維の破壊、平滑筋細胞による正常血管構造維持に必要な細胞外マトリクス産生の抑制、アポトーシス亢進による平滑筋細胞の減少である。これらの事象により血管壁が脆弱化し、血圧負荷に対する耐性が低下するため徐々に瘤径は拡大、最終的に致死性の高い破裂に至る。また、好中球を除去することによってマウス AAA の進展を抑制した報告がみられているが、AAA で炎症を惹起する一次的な原因は現時点でも不明であり、好中球が AAA の病態形成に重要な役割を果たしている可能性が推測される。

### 2. 研究の目的

本研究では AAA の病変部に集積する好中球が NETs を介して炎症反応を増悪させること、NETs 形成を阻害すると炎症による AAA の瘤径拡大が抑制されることを明らかにする。

### 3. 研究の方法

1) マウス AAA モデルを作製し、組織学的評価により NETs の存在、どの炎症細胞がどの時点で浸潤しているのかを明らかにする。ApoE KO マウスに Angiotensin-II を 4 週間持続投与する浸透圧ポンプを背部皮下に埋植した AAA モデルを用いた。施術 4 週後に採材し、AAA の組織標本を作製し、細胞外に放出された DNA 網は SYTO13 により染色し、その他、抗ヒストン蛋白抗体・抗好中球エラスターゼ・DAPI 染色を組合せ、蛍光顕微鏡による観察した。

2) 作製した大動脈瘤をホモジェネートし、その上清中の各種サイトカイン・ケモカイン量を ELISA 法により定量測定した。

3) 好中球エラスターゼは好中球内でヒストンを分解し、クロマチン凝集を促進することで NETs 産生に重要な働きを示し、好中球エラスターゼ欠損マウス (Elane 遺伝子欠損マウス) は NETs を産生しないことが報告されている (*J Cell Biol* 2010)。そこで Elane 遺伝子欠損マウスと野生型マウスに Angiotensin-II を 4 週間持続投与し AAA を作製し、Elane KO マウスは炎症

が抑制されることを明らかにする。また、エラスターゼ阻害薬を用い、薬理学的にエラスターゼを阻害した場合の大動脈瘤の瘤径や炎症に及ぼす影響を検討した。

#### 4. 研究成果

1) 作製した AAA 組織標本を細胞外に放出された DNA を SYTO13 により染色し、抗ヒストン蛋白抗体・抗好中球エラスターゼ・DAPI 染色を組合せ、蛍光顕微鏡により観察したところ、AAA 組織に好中球の浸潤部位に一致して NETs の産生を認めた。

2) 作製した大動脈瘤をホモジェネートした上清中の IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインが上昇していた。

3) Elane 遺伝子欠損マウスと野生型マウスに Angiotensin-II を 4 週間持続投与し AAA を作製し、Elane KO マウスは炎症が抑制されることを証明した。Elane 遺伝子欠損マウスは野生型マウスと比較して、小動物専用エコー診断装置によって計測した大動脈瘤径は低値であった。IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインが有意に低値であった。またエラスターゼ阻害剤による効果も検討したが、エラスターゼ阻害剤投与群は生食投与群と比較して大動脈瘤径が小さく、一方抗炎症性サイトカインであるインターロイキン 10 の産生が増加していることがわかった。

#### 5. 主な発表論文等

##### 〔雑誌論文〕(計 6 件)

Hiraya D, Sato A, Aonuma K. Circulating microRNAs as an emerging biomarker for acute aortic dissection diagnosis-comparing with prior biomarkers. J Thorac Dis. 10:1186-1189, 2018. 査読有

Adachi T, Sato A, Hanaoka D, Aonuma K. Acute aortic dissection with sporadic aortic calcifications during chemotherapy with sunitinib. J Vasc Surg Cases Innov Tech. 4:147, 2018. 査読有

Kuroki K, Sato A, Yamagami F, Nogami A, Aonuma K. Life-threatening aortic dissection with cardiac tamponade during catheter ablation for ventricular tachycardia originating from left coronary cusp. J Cardiovasc Electrophysiol. 28:1224-1225, 2017. 査読有

佐藤明 急性大動脈解離のバイオマーカー 心臓と血管の慢性炎症(生活習慣病)別冊 B10 Clinica 7(1):118-122, 2018. 査読無

Sato A. Coronary plaque evaluated by coronary CT (Including aortic valve calcification). Clin Calcium. 29:207-213, 2019. 査読無

廣高史、小松誠、藤井洋之、高山忠輝、上田恭敬、樋口義治、阿部七郎、木村茂樹、角田恒和、佐藤明、松岡宏、川上秀生、池田善彦、朝倉正紀、林宏光、由谷親夫、齋藤穎、平山篤志、児玉和久 血流維持型大動脈内視鏡診断標準化指針 心臓血管内視鏡 (Angioscopy) 2017. 査読有

##### 〔学会発表〕(計 3 件)

小菅寿徳、中村真紀、大矢根綾子、田尻和子、村越伸行、酒井俊、佐藤明、青沼和隆 Noninvasive Imaging of Experimental Aortic Aneurysms Using Gold Nanoparticles. 第 83 回日本循環器学会学術集会 2019 年 3 月 29 日 パシフィコ横浜(横浜)

小菅寿徳、中村真紀、大矢根綾子、田尻和子、村越伸行、酒井俊、佐藤明、青沼和隆 Gold nanoparticles for imaging vascular inflammation. 第 82 回日本循環器学会学術集会 2018 年 3 月 24 日 大阪国際会議場(大阪)

Ogura Y, Tajiri K, Yonebayashi S, Feng D, Aonuma k. The role of neutrophil elastase in acute myocardial infarction. Tsukuba Global Science Week 2017-09-25 つくば国際会議場(つくば)

##### 〔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：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：酒井 俊  
ローマ字氏名：(SAKAI satoshi)  
所属研究機関名：筑波大学  
部局名：医学医療系  
職名：講師  
研究者番号(8桁)：30282362

研究分担者氏名：木村 泰三  
ローマ字氏名：(KIMURA taizo)  
所属研究機関名：筑波大学  
部局名：附属病院  
職名：病院講師  
研究者番号(8桁)：00636508

研究分担者氏名：田尻 和子  
ローマ字氏名：(TAJIRI kazoko)  
所属研究機関名：筑波大学  
部局名：医学医療系  
職名：助教  
研究者番号(8桁)：60633914

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。