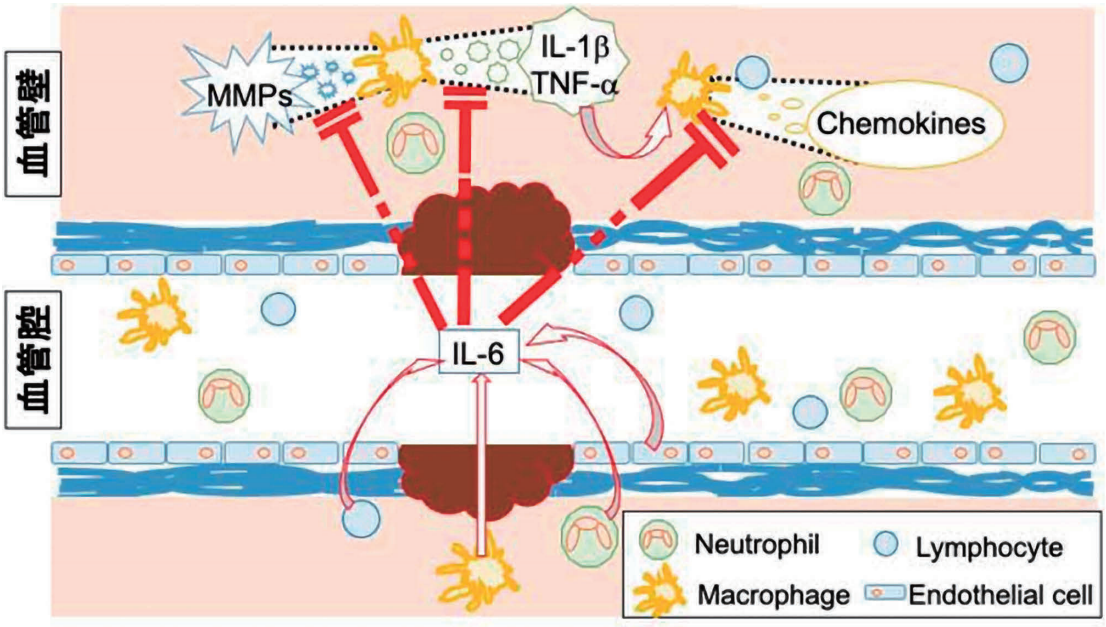
8　大動脈瘤発症・進展における分子法医病理学的研究	近藤　稔和

【目的】突然死例の約半数の死因は、急性心筋梗塞、大動脈瘤破裂、肺動脈血栓塞などの心臓・大血管疾患である。特に大動脈瘤は通常無症状のまま進行し、破裂による致死率は 80～90%である。本邦では年間 5 万人を超える突然死の 10%以上が大動脈瘤破裂によると推定されている。大動脈瘤に対する人工血管置換術やステント留置等の外科治療技術は進歩したが、効果的な予防法・治療薬は未だ確立されていないため、大動脈瘤の発症過程の細胞・分子機構の解明に基づいた予防法あるいは薬物治療法などの開発が望まれている。大動脈瘤の発生・進展は皮膚損傷治癒や肺線維症の病態生理と同様に炎症反応に伴う組織の再構築異常としてとらえることで、サイトカイン等の炎症性メディエーターを介した炎症細胞と線維芽細胞・平滑筋細胞のクロストークの大動脈瘤成立過程への関与を想定するに至った。そこで、炎症性サイトカインの一つ、インターロイキン―6（Interleukin-6：IL-6）が大動脈瘤の発生・進展にどのように関与しているのかの分子メカニズムを解析する。

【方法】8 週齢の Balb/c バックグラウンドの *IL-6* 遺伝子欠損マウス（*IL-6*KO）マウスと野生型マウス（WT）マウスを用いて、麻酔下で背部に切開を加えて、ミニポンプを植え込みアンジオテンシンⅡ（1.4 mg/kg/day）の持続的投与により大動脈解離を誘発した。また、HE 染色や免疫染色などの病理学的所見の観察や Real-Time RT PCR による mRNA 発現量の比較はアンギオテンシンⅡ投与後 5 日目に採取した大動脈を用いて行った。

【結果】アンギオテンシンⅡ投与により IL-6 の発現量は増大しており、大動脈瘤形成・進展において IL-6 が重要な役割を担っていることが考えられた。大動脈瘤の発症率を検討したところ、*IL-6* KO マウスでは WT マウスと比較して発症率が有意に高値であった。さらに、大動脈瘤破裂による生存率解析においては、WT マウスの死亡率は約 20%程度であったが、*IL-6* KO マウスの死亡率は約 90%であった。大動脈瘤病変部における炎症細胞の浸潤は、*IL-6 KO* マウスで WT マウスと比較して、種々の炎症性サイトカイン・ケモカインの発現亢進を伴って増強していた。また *IL-6* KO マウスでは、病変部におけるマトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）-9 および MMP-12 の発現が顕著に亢進していた。IL-6 は、炎症性サイトカインやケモカイン、MMPs の発現を抑制し、血管の炎症反応や血管壁の脆弱化に対して防御的に働くことが示唆された。

大動脈瘤形成における IL-6 の役割



8. 大動脈瘤発症・進展における分子法医病理学的研究

近藤　稔和

和歌山県立医科大学 医学部 法医学講座

Key words：突然死，大動脈瘤，サイトカイン，IL-6，マトリックスメタロプロテアーゼ

緒　言

突然死とは、発症後 24 時間以内の自然死（内因死）と定義され、我が国における突然死の発生頻度は、全自然死の 14～17%である。突然死は、いつでもどこででも発生し、その殆どが法医解剖により死因が究明される。突然死の死因を医学的に究明することは、死亡者の個人の尊厳を擁護するとともに、その後に発生してくる種々の社会的問題を解決するための手段であり、法医学の使命である。

当講座においても平成 15 年 4 月から平成 28 年 12 月までに 2,572 体の法医剖検例のうち 579 例が突然死に分類され、その約半数の事例は心臓・大血管系の疾患であった。特に大動脈瘤・大動脈解離は、通常無症状のまま進行し、破裂による致死率は 80～90%である。本邦では年間 5 万人を超える突然死の 10%以上が大動脈瘤破裂によると推定されている。大動脈瘤に対する人工血管置換術やステント留置等の外科治療技術は進歩したが、効果的な予防法・治療薬は未だ確立されていないため、大動脈瘤の発症過程の細胞・分子機構の解明に基づいた予防法あるいは薬物治療法などの開発が望まれている。大動脈瘤の発生・進展は 皮膚損傷治癒や肺線維症の病態生理と同様に炎症反応に伴う組織の再構築異常としてとらえることで、サイトカイン等の炎症性メディエーターを介した炎症細胞と線維芽細胞・平滑筋細胞のクロストークの大動脈瘤成立過程への関与を想定するに至った。そこで、炎症性サイトカインの一つ、インターロイキン一6（Interleukin-6：IL-6）が大動脈瘤の発生・進展にどのように関与しているのかの分子メカニズムを解析する。

方　法

1. マウス大動脈瘤モデル作製法の確立

8～12 週齢の Balb/c バックグラウンド *IL-6* KO マウスおよび野生型マウス（WT）マウスを麻酔下で背部皮膚を切開し、ミニポンプを植え込みアンジオテンシンⅡ（1.4 mg／kg／day）の持続的投与により大動脈瘤を誘発した［1］。各マウスにおける大動脈瘤の発生率及び死亡率を比較検討した。

2. 病理組織学的及び免疫組織化学的検討

経時的に大動脈瘤病変部を採取して、ヘマトキシリン-エオジン染色及びマッソン・トリクローム染色を施し、形態学的変化を観察した。また、好中球、マクロファージ並びに CD3 陽性 T リンパ球に対する抗体を用いて免疫染色を行い、病変部への白血球浸潤の程度を観察した。さらに、IL-6 に対する抗体を用いて免疫染色を施し、各物質の局在を免疫組織化学的に検討した。各種免疫担当細胞、ケモカイン、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）-9、M1 型または M2 型マクロファージの免疫組織化学的解析結果を野生型と遺伝子欠損マウスとで比較・検討した。

3. 遺伝子発現解析

大動脈試料から総 RNA を抽出し、炎症性メディエーターである炎症性サイトカイン（IL-1、IL-6、TNFα）およびケモカイン（CCL2、CCL3、CXCL2、CX3CL1）、並びに MMP-2、MMP-9 および MMP-12 の遺伝子発現を検索した。

4. 統計的解析

結果については、平均±標準誤差を算出し、2 元配置分散分析または Student t test で解析し、$p<0.05$ を統計学的に有意とした。

結　果

1. アンギオテンシンⅡ投与により大動脈における IL-6 発現への影響について

アンギオテンシンⅡを投与しない WT マウスの大動脈組織において、*IL-6* 遺伝子の発現はほとんど観察できなかった。しかしながら、アンギオテンシンⅡの持続投与 5 日目大動脈を採取して、大動脈における *IL-6* 遺伝子発現を検討したところ、その発現が有意に増強した（図 1A）。次にヒト大動脈瘤組織における IL-6 の発現を免疫組織化学的に解析したところ、血管平滑筋細胞において IL-6 のシグナルガ認められた（図 1B、C）。これらの所見は、大動脈瘤形成・進展において IL-6 が重要な役割を有している可能性が示唆された。

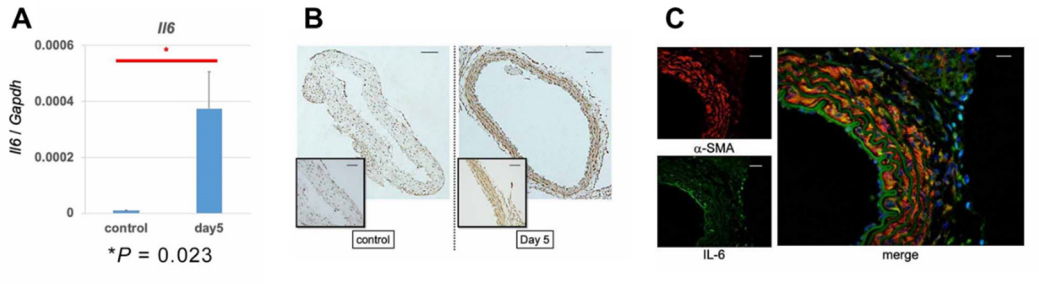


図 1. 大動脈における IL-6 の発現

A）大動脈における *IL-6* 遺伝子発現。

B、C）大動脈における IL-6 の免疫染色。

Scale bars：200 μm（low-magnification in B）、200 μm（high-magnification in B）、100 μm（low-magnification in C）、20 μm（high-magnification in C）。

2. *IL-6* 遺伝子欠損の大動脈瘤発症率への影響について

アンギオテンシンⅡの持続投与による大動脈瘤の発症率及び死亡率を検討したところ、*IL-6*KO マウスでは、大動脈瘤の発症率が WT マウスに比較して高かった（図 2A、B）。さらに、大動脈瘤破裂による死亡率も *IL-6* KO マウスで有意に高かった（図 2C）。すなわち、*IL-6*KO マウスでは、WT マウスと比較して明らかに大動脈瘤の形成が促進されており、その破裂による死亡率の増大が認められたことから、IL-6 が大動脈瘤の発症・進展に保護的に作用することが示唆された。

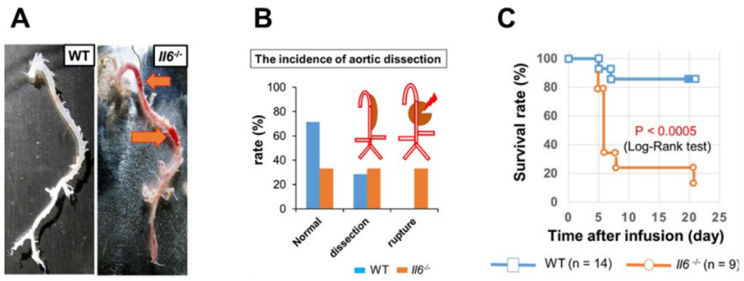


図 2. 大動脈瘤発症率および死亡率

A) 大動脈肉眼像。

B) 大動脈発症率。

C) 死亡率。

3. *IL-6*遺伝子欠損の病変部への白血球浸潤への影響について

採取したマウス大動脈瘤の病変部を用いて、免疫組織化学的に MPO 陽性好中球、F4/80 陽性マクロファージおよび CD3 陽性リンパ球の浸潤の程度を検討したところ、*IL-6* KO マウスでは WT マウスと比較して、好中球、マクロファージおよびリンパ球浸潤が増強していた（図 3）。すなわち、*IL-6* KO マウスにおいて、アンギオテンシンⅡ投与後の局所の炎症反応が増強していたと考えられた。

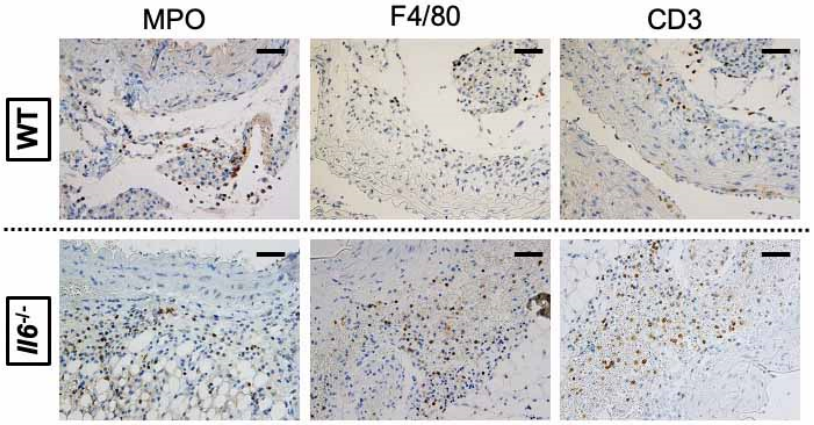


図 3. アンギオテンシⅡ投与後の白血球浸

上段） WT、下段） *IL-6*KO マウス。

MPO：好中球。F4/80：マクロファージ。CD3：リンパ球。Scale bars：50 μm。

4. *IL-6*遺伝子欠損の炎症性メディエーターの遺伝子発現への影響について

アンギオテンシンⅡ投与後の大動脈における炎症性メディエーターの遺伝子発現を検討したところ、炎症性サイトカインである IL-1β、IL-6、TNF-αおよびケモカインである CCL2、CCL3、CXCL2、CX3CL1 の遺伝子発現は、WT マウスと比較して *IL-6*KO マウスにおいて、有意に発現が亢進していた（図 4）。すなわち、*IL-6*遺伝子欠損では、炎症性メディエーターの遺伝子発現が亢進した結果、大動脈周囲の炎症が増強し、その結果として大動脈瘤の発症・進展が増悪するものと考えられた。

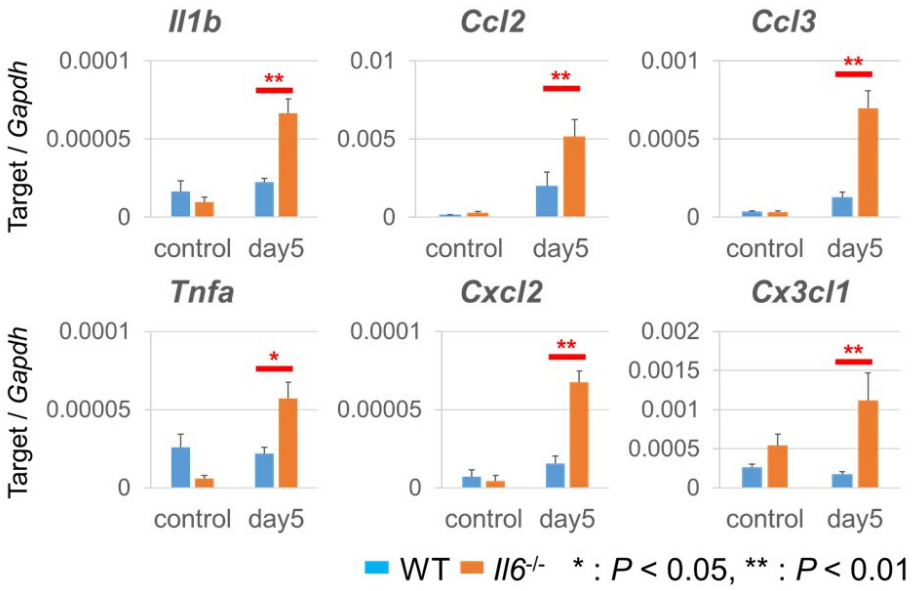


図 4. アンギオテンシⅡ投与後の炎症性メディエーターの遺伝子発現

5. *IL-6*遺伝子欠損の *MMP*遺伝子発現への影響について

大動脈の発症・進展に MMP が関与していることから、アンギオテンシンⅡ投与後の大動脈における MMP2、MMP9、MMP12 の遺伝子発現を検討したところ、MMP9 と MMP12 については、それらの遺伝子発現が亢進していた（図 5）。すなわち、*IL-6* 遺伝子欠損では、炎症反応の亢進とそれに付随するタンパク分解酵素の発現亢進により、大動脈瘤の発症・進展が増悪するものと考えられた。

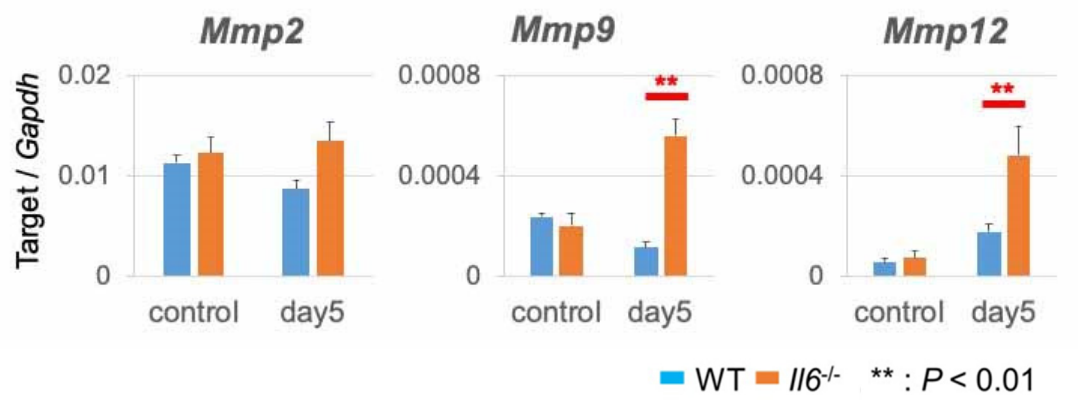


図 5. アンギオテンシⅡ投与後の MMPs の遺伝子発現

Mmp9 : P=0.0051、Mmp12 : P= 0.0082（スチューデントの t 検定）。

考　察

大動脈における炎症は、コラーゲンやエラスチンのような大動脈壁に存在するマトリックス高分子の分解を誘発し、最終的には大動脈壁を拡張させ、動脈瘤形成をもたらすと考えられている［2，3］。コラーゲンとエラスチンは主にマトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）によって分解される。さらに、コラーゲンを分解する能力の高い MMP が動

脈瘤病変の浸潤マクロファージや血管平滑筋細胞に発現していることを示す証拠がいくつかある［4］。これらの報告に基づき、MMP 阻害剤の有効性が動物モデル［5］および動脈瘤患者を対象とした初期の臨床試験で検討された［6］。しかし、MMP 阻害剤は動脈瘤の形成を遅らせるだけで、その進行を阻止することはできなかった。したがって、動脈瘤形成の根底にある分子および細胞メカニズムの理解に基づいた動脈瘤に対する効果的な治療戦略を確立することが必要である。本研究では、大動脈拡張と動脈瘤形成を誘導するために、アンギオテンシンⅡ注入モデルを用いたが、このモデルでは多数の炎症細胞浸潤と MMP 発現が観察された。野生型マウスと比較して、*IL-6*KO マウスでは、種々の炎症性サイトカイン・ケモカインの発現増強を伴って、炎症細胞浸潤が増加することを見出した。

実験的な大動脈瘤発症には、TNF-α［7］や IL-1β［8］を含むいくつかの炎症性メディエーターが深く関与しているという報告がある。これらのメディエーターの発現はヒトの大動脈壁でも増大していた［9］。我々の解析では、大動脈内の TNF-α と IL-1β の発現はアンギオテンシンⅡ投与後に、*IL-6*KO マウスで顕著に増強していた。

ヒトの大動脈瘤病変の研究では、過剰な MMP の発現が証明されており［10］、大動脈瘤発症における MMP の重要な役割を示している。本研究では、*IL-6*KO マウスで MMP-9 および MMP-12 の発現が亢進していた。これらの結果は、IL-6 の欠損が MMPs の発現を亢進させる可能性を示唆している。

MMPs がどのように大動脈瘤形成に関与するかは、未だ十分には解明されていない。Pyo らはエラスターゼを用いた大動脈瘤モデルにおいて、MMP-9、特にマクロファージ由来の MMP-9 が局所のマトリックスタンパク質を破壊し、最終的に動脈瘤の発生を誘導することを明らかにした［4］。さらに、*Mmp9* KO マウスは WT マウスと比較して、塩化カルシウム誘導性動脈瘤発生に対して抵抗性であり、大動脈壁の形態が保たれていた。我々は、アンギオテンシンⅡ注入により、*IL-6*KO マウスで大動脈内の MMP 発現が増強することを見出した。従って、MMP の発現亢進はアンギオテンシンⅡ注入により大動脈瘤形成を促進する可能性がある。

以上より、炎症細胞あるいは血管内皮細胞では IL-6 が産生されており、IL-6 が血管壁の炎症反応や脆弱化の抑制に寄与していることが示唆された。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、和歌山県立医科大学法医学講座の石田裕子、野坂みずほ、國中由美、木村章彦、向田直史、同循環器内科学講座の樽谷玲、同臨沂検査医学講座の古田眞智である。

文　献

1) Lixin Fang, Koji Ohashi, Naoya Otaka, Hayato Ogawa, Mizuho Hiramatsu-Ito, Hiroshi Kawanishi, et al. Omentin attenuates angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation in apolipoprotein E-knockout mice. Cardiovasc Res. 2022 May 6;118(6):1597-1610. doi: 10.1093/cvr/cvab179.

2) Alan Daugherty, Lisa A Cassis. Mouse models of abdominal aortic aneurysms. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004 Mar;24(3):429-34. doi: 10.1161/01.ATV.0000118013.72016.ea.

3) Yuko Ishida, Yumi Kuninaka, Mizuho Nosaka, Akihiko Kimura, Akira Taruya, Machi Furuta, et al. Prevention of CaCl2-induced aortic inflammation and subsequent aneurysm formation by the CCL3-CCR5 axis. Nat Commun. 2020 Nov 25;11(1):5994. doi: 10.1038/s41467-020-19763-0.

4) R Pyo, J K Lee, J M Shipley, J A Curci, D Mao, S J Ziporin, et al. Targeted gene disruption of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) suppresses development of experimental abdominal aortic aneurysms. J Clin Invest. 2000 Jun;105(11):1641-9. doi: 10.1172/JCI8931.

5) M D Huffman, J A Curci, G Moore, D B Kerns, B C Starcher, R W Thompson. Functional importance of connective tissue repair during the development of experimental abdominal aortic aneurysms. Surgery. 2000 Sep;128(3):429-38. doi: 10.1067/msy.2000.107379.

6) B Timothy Baxter, William H Pearce, Eugene A Waltke, Fred N Littooy, John W Hallett Jr, K Craig Kent, et al. Prolonged administration of doxycycline in patients with small asymptomatic abdominal aortic aneurysms: report of a prospective (Phase II) multicenter study. J Vasc Surg. 2002 Jul;36(1):1-12. doi: 10.1067/mva.2002.125018.

7) Wanfen Xiong, Jason MacTaggart, Rebecca Knispel, Jennifer Worth, Yuri Persidsky, B Timothy Baxter. Blocking TNF-α attenuates aneurysm formation in a murine model. J Immunol. 2009 Aug 15;183(4):2741-6. doi: 10.4049/jimmunol.0803164.

8) William F Johnston, Morgan Salmon, Gang Su, Guanyi Lu, Matthew L Stone, Yunge Zhao, et al. Genetic and pharmacologic disruption of interleukin-1β signaling inhibits experimental aortic aneurysm formation. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2013 Feb;33(2):294-304. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.300432.

9) Rachel K Middleton, Geraint M Lloyd, Matthew J Bown, Nicola J Cooper, Nicholas J London, Robert D Sayers. The pro-inflammatory and chemotactic cytokine microenvironment of the abdominal aortic aneurysm wall: a protein array study. J Vasc Surg. 2007 Mar;45(3):574-80. doi: 10.1016/j.jvs.2006.11.020.

10) Eithne M Maguire, Stuart W A Pearce, Rui Xiao, Aung Y Oo, Qingzhong Xiao. Matrix Metalloproteinase in Abdominal Aortic Aneurysm and Aortic Dissection. Pharmaceuticals (Basel). 2019 Aug 6;12(3):118. doi: 10.3390/ph12030118.