

腹部大動脈瘤におけるデコリンの二重の役割の可能性

Possible Dual Role of Decorin in Abdominal Aortic Aneurysm

山口大学大学院医学系研究科 応用医工学系専攻

器官制御医科学講座 博士後期課程

器官病態外科学（外科学第一）

上田 晃志郎

平成 27 年 10 月

目次

第 1 章 緒言-----	3
1.1 背景-----	3
1.2 目的-----	3
第 2 章 方法-----	4
2.1 動物大動脈瘤モデル実験-----	4
2.2 病理組織学的及び免疫組織化学的分析-----	4
2.3 細胞培養実験 -----	5
2.4 ゼラチンザイモグラフィーによる MMP の定量-----	5
2.5 ヒト大動脈壁の採取-----	6
2.6 蛋白抽出とウエスタンブロットによる蛋白定量-----	6
2.7 ELISA による蛋白定量-----	6
2.8 統計学的分析-----	7
第 3 章 結果-----	8
3.1 マウス大動脈瘤形成過程におけるデコリン蛋白発現レベルの 経時的パターン-----	8
3.2 マウスの大動脈瘤形成におけるデコリン投与の効果-----	10
3.3 血管平滑筋細胞の MMP-9 分泌に対するデコリンの役割---	13
3.4 ヒト AAA におけるデコリンの発現-----	15
3.5 マクロファージの MMP-9 分泌に対するデコリンの役割-----	17
第 4 章 考察-----	19
第 5 章 結語-----	21
第 6 章 謝辞-----	21
第 7 章 参考文献-----	22

第 1 章 緒言

1.1 背景

腹部大動脈瘤(AAA)は腹部大動脈の区域的な拡張である。AAA は一般的な疾患であるが、破局的な大動脈瘤破裂により致命的となる疾患である⁽¹⁾。高齢男性において AAA の罹患率は 4.0-8.9%と推定される⁽²⁾。2009 年、米国において大動脈瘤は 10,597 人の死亡の主因であり、17,215 人の死亡に寄与していた^(3,4)。

AAA 患者の大部分は無症候のため、主な治療目的は瘤破裂を防止することにより予後を改善することである。現在 AAA に対する治療選択は、破裂を防止するための開腹手術もしくは血管内治療に限られている⁽⁵⁾。AAA の治療において非外科的治療、特に薬物治療は未だ実現されていない重要なニーズである⁽⁶⁻⁸⁾。AAA は慢性炎症とマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)-9 のようなタンパク質分解酵素によって引き起こされる細胞外マトリックスの分解を特徴とする^(6,9)。AAA の根本的な原因は特定されていないが、AAA 壁において種々の炎症誘発性メディエーターが活性化され、炎症反応を引き起こし、細胞外マトリックスの代謝バランスが組織破壊へと傾いている⁽⁸⁾。細胞外マトリックス蛋白は血管壁の主要な構成成分であり、潜在的に種々の血管細胞と相互に作用している。ペリオスチンやテネイシン C といった細胞外マトリックス蛋白は AAA の成因において重要な役割を担っているとされている⁽¹⁰⁻¹²⁾。しかし AAA において細胞外マトリックス蛋白の重要性を十分に解明した研究はない。

デコリンは血管生物学において重要な役割を果たすと考えられている small leucine-rich proteoglycans (SLRP)に属している^(13,14)。特にデコリンはコラーゲン原線維形成、免疫応答、炎症反応を調節することができる^(14,15)。正常大動脈組織と大動脈瘤壁においてデコリンはある程度発現している。過去の研究では大動脈瘤マウスモデルにおいて、デコリン発現の減少が大動脈破裂の危険性と関与していることが示唆された⁽¹⁶⁾。以上の知見により大動脈瘤の成因においてデコリンが重要な役割を果たしているのではないかという仮説が導かれた。

1.2 目的

本研究の目的は、デコリンが大動脈瘤の病態において、組織保護あるいは炎症促進の役割を果たしていることを示すことである。

第 2 章 方法

2.1 動物大動脈瘤モデル実験

6 週齢の C57BL/6 雄マウスを Chiyoda Kaihatsu Co.Ltd. (Tokyo, Japan)より購入した。昼夜 12 時間サイクルとし温度・湿度がコントロールされた部屋で、マウスをプラスチックケージ(1 ケージあたり 5 匹)で飼育した。実験中マウスは標準的な餌と水を自由に摂取させた。既報の方法に従って、マウスの大動脈周囲を 0.5 M CaCl_2 で処理して AAA を作成した^(12,17,18)。詳細には左腎静脈と大動脈分岐部間の腎動脈下腹部大動脈に CaCl_2 の処理を行った。抑制実験では、20 μg のウシデコリン (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) を 100 μg のリン酸緩衝食塩水 (PBS) に溶解して浸漬させたゼルフォームパッチ (3.5×2×2 mm;Pfizer, New York, NY, USA) (CaCl_2 +decorin,n=10)と 100 μg の PBS (CaCl_2 +PBS,n=9)を浸漬させたゼルフォームパッチを CaCl_2 処置後すぐに左腎静脈と大動脈分岐部間の大動脈周囲腔に静置した。コントロール群として無処置のマウスを用意した (対照群,n=6)。この実験では開腹前に、麻酔のためにペントバルビタールナトリウム (40 mg/kg) を腹腔内注射した。抑制実験では CaCl_2 処置後 42 日目に、経時的な観察研究では CaCl_2 処置後 0,3,7,14,28,42 日目に過剰なペントバルビタールナトリウム (100 mg/kg、腹腔内注射) を投与して実験マウスを安楽死させた。生理的血压の条件下で 4%パラホルムアルデヒド-PBS を全身灌流させ、固定後すぐに腹部大動脈を採取し、大動脈形態計測のために写真撮影を行い、組織片の組織学的分析を行った。大動脈の写真は大動脈の最大外径を測定するのに使用した。すべての実験は米国国立衛生研究所発行の実験動物の管理と使用に関する指針に準拠して実施した。すべてのプロトコールは山口大学医学部動物使用委員会による承認を受けた (#31-091)。

2.2 病理組織学的及び免疫組織化学的分析

組織学的分析のために、パラフィン包埋切片を用いて、ヘマトキシリン/エオジン (HE) 染色、マッソントリクロム (MT) 染料、およびエラスチカ・ワンギーソン (EVG) 染色を行った。また、免疫組織化学的検査のために、既報の方法に従って、各抗原に対する抗体を用いて切片をプローブした^(17,19,20)。抗マウス decorin 抗体(Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA, #sc-22753) 、抗ヒト decorin 抗体(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA, #MAB143) 、抗マウス MMP-9 抗体 (R&D Systems, #AF909) 、および抗ヒト MMP-9 抗体 (Daiichi Fine Chemical, Toyama, Japan, # F-69) を用いて、切片をプローブする方法でデコリンと MMP-9 を検出した。また抗ヒト CD-68 抗体(Dako, Glostrup, Denmark, #M0876) と抗ヒト平滑筋 α -アクチン抗体(Dako, #M0851)を使用した。プローブされたタンパク質は VECTASATAIN ABC-AP kit(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)を使用し、アビジ

ンービオチン複合体法もしくは、Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse IgG antibody (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)と Alexa Fluor 594-conjugated anti-rabbit IgG antibody (Molecular Probes)を使用して間接蛍光免疫染色で可視化した。核の染色に DAPI (Molecular Probes)を使用した。HE 染色片を用いて、マウスあたり 5 つの強視野で炎症細胞浸潤数を測定した。EVG 染色片を用いて、Hamblin が報告した方法で中膜のエラスチン破壊度の評価を行った⁽²¹⁾。エラスチン破壊度は、grade I :エラスチンの 1 層のみの軽度な破壊、grade II :エラスチンの 2 層が破壊、切断された中等度の破壊、grade III :エラスチンの 3 層が切断、もしくは分解された高度な破壊、grade IV : 4 層全てのエラスチンの切断、もしくは分解された重篤な破壊と分類した。

2.3 細胞培養実験

ラット大動脈由来の血管平滑筋細胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) は、Cell Applications, Inc (San Diego, CA, USA) から購入した。10%ウシ胎児血清入りダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)で VSMC を培養した。実験前に、VSMC をラミニンで被覆したプレートに播種し、48 時間血清飢餓状態で培養した。血清飢餓状態にした細胞にリポポリサッカライド(LPS) (Alexis Biochemicals, San Diego, CA, USA)を 100 ng/ml 投与し 48 時間静置した。LPS 投与 24 時間前に VSMC にウシデコリン(Sigma-Aldrich)を 0.4、4、または 40 μ g/ml を投与した。既報の方法に従って 6 週齢の C57BL/6 雄マウス (Chiyoda Kaihatsu)からチオグリコール酸誘導腹腔内マクロファージを採取した^(22,23)。マウスの腹腔内にチオグリコール酸培養液(Sigma-Aldrich)を 2ml 投与した。3 日後、10ml の PBS で腹腔内洗浄を行い、マクロファージを採取した。低温の PBS で 2 回細胞を洗浄し、10%ウシ胎児血清を含有した RPMI-1640 培養液(DS Pharma Biomedical, Osaka, Japan)で再懸濁を行い、ゼラチンで被覆したプレートに播種した。24 時間後に培養液で洗浄し、非接着細胞を除去した。マクロファージを検出するために腹腔内細胞を抗マウス Mac3 抗体(BD Biosciences, San Jose, CA, USA, #550292)を用いて免疫染色を行った。マクロファージは常に 90%以上存在した。実験前にマクロファージは 24 時間血清飢餓状態とし、続いて 100 ng/ml の LPS を投与し 48 時間静置した。LPS 投与前にマクロファージにデコリンを 0.4、4、または 40 μ g/ml を投与した。

2.4 ゼラチンザイモグラフィによる MMP の定量

既報の方法に従って、ゼラチンザイモグラフィを行った^(17,19)。非還元状態の下で等量のサンプルを 0.2%SDS 存在下にゼラチン(1mg/ml)含有 10%ポリアクリルアミドゲルを用い

て電気泳動を行った。電気泳動後のゲルを、2.5% Triron X-100 で洗浄し、37°Cのデベロッキングバッファー(50 mM Tris (pH 7.5), 200mM NaCl, 5 mM CaCl₂, and 0.02% Brij35)中でインキュベートした。ゲルを 40%メタノールと 10%酢酸を含有した 0.5%クマシーブリリアントブルーR-250 で染色し、ゲル上の妥当な位置のバンドを定量化することにより MMP-9 と MMP-2 の発現量を測定した。

2.5 ヒト大動脈壁の採取

開腹手術を受けたAAA患者47名から腹部大動脈壁標本を採取した。対照として非腹部大動脈瘤壁の標本を、大動脈瘤と無関係の原因で亡くなられた検体から採取した。大動脈組織標本でウェスタンブロット法、免疫組織化学法を行った。ヘルシンキ宣言の原則に従って、すべての患者から文書による同意を取得した。剖検標本については、研究における標本の使用にあたり、近親者からインフォームドコンセントの書面を得た。ヒト標本を用いた実験手順はすべて、山口大学医学部付属病院医薬品等治験・臨床研究等審査委員会から承認を受けた (#H24-26)

2.6 蛋白抽出とウェスタンブロットによる蛋白定量

ヒト大動脈壁検体は 25 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM ピロリン酸ナトリウム, 10 mM b-グリセロリン酸塩, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM フェニルメタンスルホニルフルオリド, および 10 mg/ml アプロチニンを含有した溶液中で粉碎した。最終濃度が 1% となるように Triton X-100 を加え、蛋白質を抽出した。ピシンコニン酸蛋白質定量キット (BCA kit, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)を用いて蛋白質濃度を測定した。これまでに報告した方法で、蛋白質抽出およびウェスタンブロット法を実施した^(17,20)。SDS-PAGE ゲルの個々のレーンに等量のタンパク質サンプルを乗せた。電気泳動後に、二フッ化ポリビニルデン膜 (Millipore, Bedford, MA, USA)に転写した。ヒトデコリン (R&D Systems, #MAB143)、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、ヒト MMP-9 (Daiichi Fine Chemical, # F-69)、ヒトトランスフォーミング増殖因子(TGF)-β1 (Santa Cruz Biotechnology, #sc-52893) に対する抗体を用いて膜をプローブした。

2.7 ELISA による蛋白定量

マウス/ラット/ブタ TGF-β1 ELISA キット(R&D Systems, #SMB100)を用いてサンドイッチ酵素免疫測定法により TGF-β1 を定量した。

2.8 統計学的分析

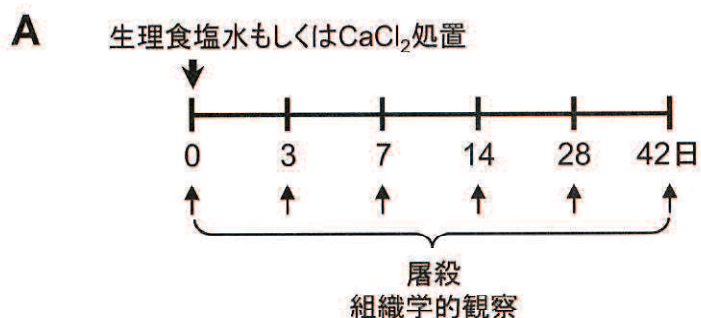
データは平均値±標準偏差 (SD) で表した。統計解析には Prism 5.0d software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)を使用した。Unpaired *t*-test、分散分析 (ANOVA) を用いて統計解析を行い、検定後比較にはボンフェローニ法を用いた。連続変数間の関連は、ピアソン相関係数を用いて評価した。 $p < 0.05$ を有意とした。

第3章 結果

3.1 マウス大動脈瘤形成過程におけるデコリン蛋白発現レベルの経時的パターン

まず、マウス大動脈瘤モデルを用いて、大動脈瘤形成過程におけるデコリン蛋白発現レベルについて分析した。マウス大動脈モデルは腎動脈下腹部大動脈周囲に CaCl_2 を添加して作成した(Figure 1A)。処置後3日目に CaCl_2 添加により炎症細胞浸潤が惹起された。処置3-14日後、弾性線維層は直線化・断片化し始めた。その後、炎症細胞浸潤と弾性線維の破壊は続き、処置42日後まで増加した(Figure 1B)。結果的に、 CaCl_2 処置28日後と42日後に、AAAマウスの腎動脈下腹部大動脈は以前の我々の結果と同様に对照群の大動脈径より有意に拡大していた⁽¹²⁾。

对照群のマウスでは、デコリンの沈着は外膜と大動脈周囲組織に見られ、蛋白発現レベルは生理食塩水処置の前後で同程度であった。AAAマウスでは、 CaCl_2 処置3日後、7日後で著明に減少したが、処置14日後までにデコリン蛋白レベルは元のレベルまでほぼ戻り、大動脈周囲組織に広がり始めた。42日目には炎症細胞浸潤と弾性線維の破壊が増加した薄い大動脈壁中膜を含めて、大動脈壁全層にデコリンの沈着を認めた(Figure 1B)。これらの結果はデコリン蛋白発現がAAA形成開始時に抑制的に制御されていることを示した。しかし、AAA形成中では、活動性炎症により弾性線維の破壊が起こっている大動脈壁においてデコリン蛋白発現が逆に促進的に制御されていた。



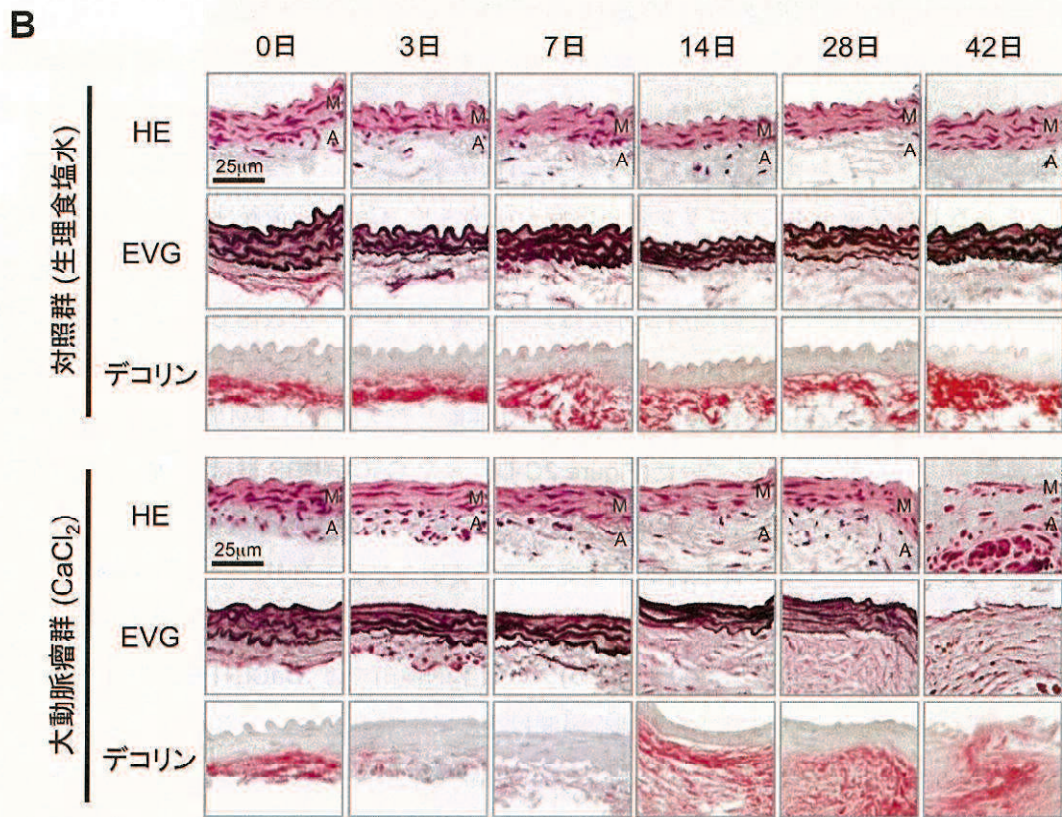


図1. マウス大動脈瘤形成過程におけるデコリン蛋白発現レベルの経時的パターン

A. マウス AAA モデルは大動脈周囲に CaCl₂ を添加することによって作成した。生理食塩水を添加したものを対照群とした。CaCl₂ 添加後 0、3、7、14、28、42 日目に屠殺した。

B. 対照群では、デコリンの沈着は外膜と大動脈周囲組織に見られ、蛋白発現レベルは生理食塩水処置の前後で同程度であった。大動脈瘤群では、CaCl₂ 処置 3 日後、7 日後で著明に減少、処置 14 日後にデコリン蛋白レベルは処理前まで戻った。42 日後には大動脈壁全層にデコリンの沈着を認めた。

M: 中膜 A: 外膜

3.2 マウスの大動脈瘤形成におけるデコリン投与の効果

デコリンの初期の減少と AAA 形成開始時の関係を明らかにするために、外因性デコリンの局所投与が AAA マウスの大動脈壁の病的リモデリングを抑制するかの検討を行った (Figure 2A)。デコリン蛋白を目的の領域に局所投与するために生物分解性細胞外マトリックスであるゼルフォームにデコリン蛋白溶液を浸透させ、CaCl₂ 処置後すぐにマウスの大動脈周囲にゼルフォームパッチ (CaCl₂+デコリンもしくは、CaCl₂+PBS) を静置した (Figure 2B)。Kuhn B らにより、この局所投与法は実験期間中デコリンを放出し続け、マウス大動脈の中膜へデコリンを送達可能であることが示された⁽²⁴⁾。以前の我々の報告と同様に、CaCl₂ 処置 42 日後の CaCl₂+PBS 群のマウスから採取した大動脈は無処置のマウス (対照群) の大動脈径より有意に拡大していた (Figure 2C-D)。また CaCl₂+PBS 群は大動脈全層において著明な炎症細胞浸潤を示し、大動脈壁中膜の弾性線維の形態は直線化・断片化していた。CaCl₂+PBS 群において炎症細胞浸潤と組織破壊が著明な中膜・外膜で大量の MMP-9 の発現を認めた (Figure 2E-F)。興味深いことに、CaCl₂+デコリン群では CaCl₂+PBS 群と比べて大動脈径は有意に小さかった (Figure 2C-D)。組織学的検討では CaCl₂+PBS 群と比較して CaCl₂+デコリン群の大動脈では炎症細胞浸潤は少なく、弾性線維の形態は保たれており、MMP-9 蛋白レベルは少なかった (Figure 2E-F)。MMP-9 による弾性線維の分解は大動脈瘤形成における重要な段階であるため、CaCl₂+PBS 群と CaCl₂+デコリン群の中膜弾性線維の破壊程度を定量した (Figure 2G)。CaCl₂+PBS 群の多くの大動脈 (78%) は重篤な弾性線維破壊 (grade IV) であった。対照的に CaCl₂+デコリン群では grade IV の破壊を認めたのは 10% であった。CaCl₂+デコリン群の大部分の大動脈は中等度~高度 (grade II :30%、grade III :50%) の破壊であった (Figure 2H)。この結果より、大動脈瘤形成開始時における外膜のデコリンの減少は、CaCl₂ 誘発性の AAA 形成に寄与する可能性が示された。外因性デコリンの投与によりデコリンの減少を防ぐことで、MMP-9 による弾性線維の破壊が抑制され大動脈の拡張が抑制された。

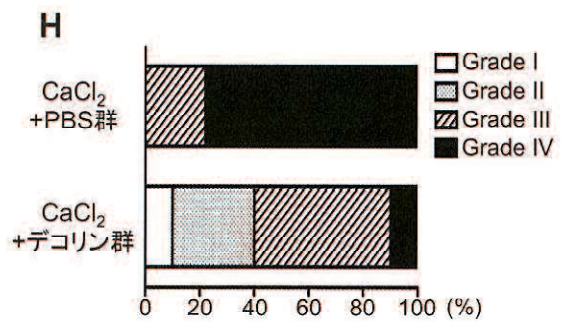
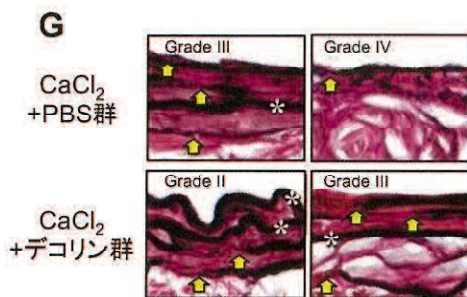
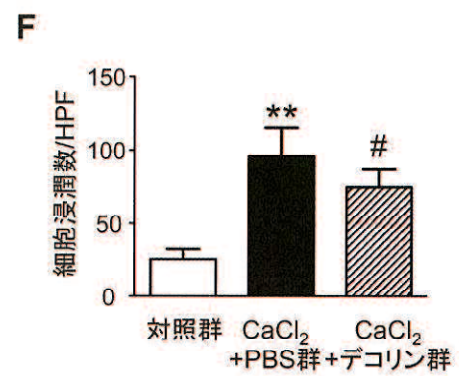
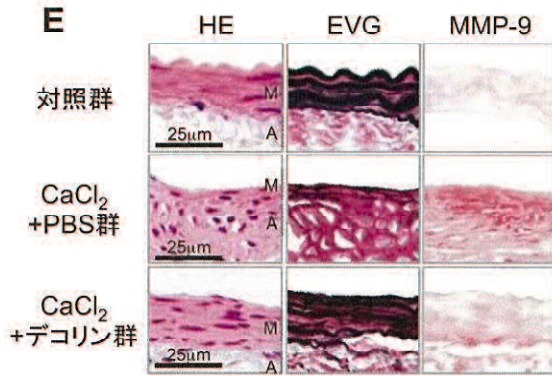
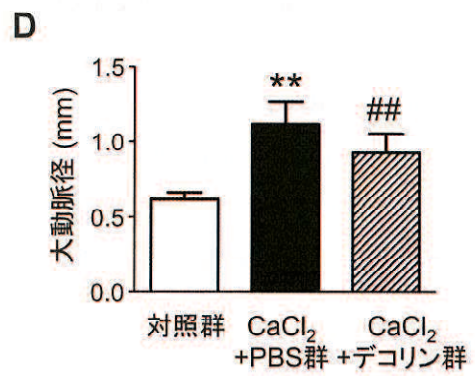
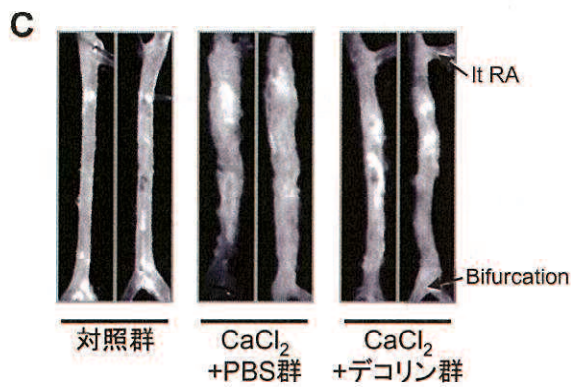
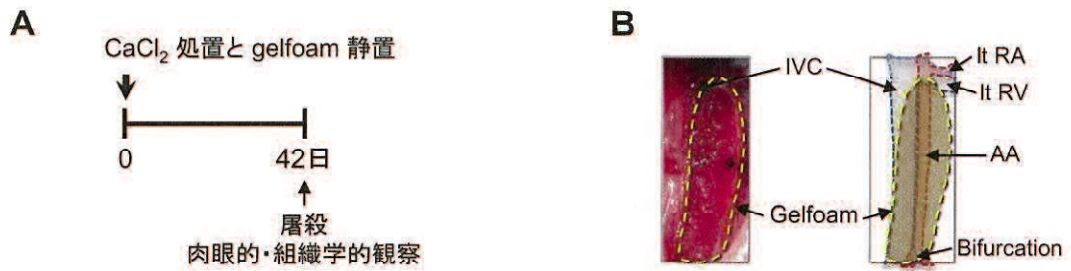


図 2. マウスの大動脈瘤発育中におけるデコリン投与の効果

A,B. CaCl_2 処置後すぐに、PBS(CaCl_2 +PBS 群, n=9)もしくは $20\mu\text{g}$ のデコリン(CaCl_2 +デコリン群, n=10)を浸漬させたゼルフォームパッチをマウスの左腎静脈と大動脈分岐部の間の大動脈周囲に静置した。無処置のマウスを対照群(n=6)とした。 CaCl_2 処置後 42 日目に屠殺した。

AA:腹部大動脈、IVC:下大静脈、It RA:左腎動脈

C,D. CaCl_2 +デコリン群では CaCl_2 +PBS 群と比べて大動脈径は有意に小さかった。

** : $p < 0.01$ vs 対照群、## : $p < 0.01$ vs CaCl_2 +PBS 群

M:中膜 A:外膜

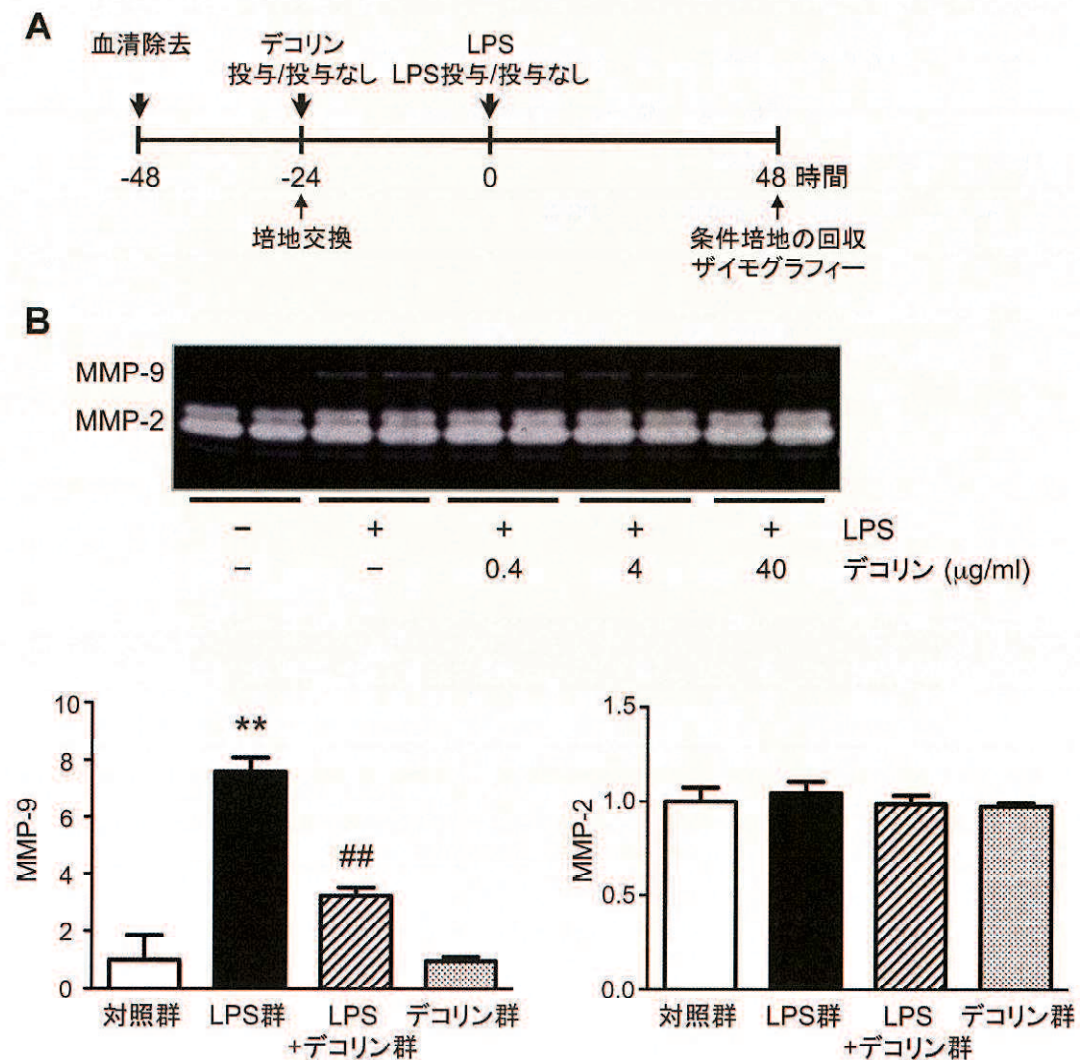
E,F. CaCl_2 +PBS 群と比較して CaCl_2 +デコリン群の大動脈では炎症細胞浸潤数は少なく、弾性線維の形態は保たれており、MMP-9 蛋白レベルは少なかった。

** : $p < 0.01$ vs 対照群、# : $p < 0.05$ vs CaCl_2 +PBS 群

G,H. 中膜弾性線維の破壊程度は CaCl_2 +デコリン群で軽度であった。

3.3 血管平滑筋細胞の MMP-9 分泌に対するデコリンの役割

in vivo でデコリンが大動脈壁の MMP-9 の発現を抑制したことを示したため、大動脈壁の主要な細胞の一つである VSMC において、デコリンが MMP-9 蛋白分泌を抑制的に制御するかを検討した(Figure 3A)。定常状態において、VSMC の培養上清サンプル中で MMP-2 は容易に検出可能であったが、MMP-9 はほとんど検出できなかった。しかし LPS 投与後には、VSMC からの MMP-9 分泌が検出された。興味深いことに、LPS 投与による MMP-9 分泌の増加は、LPS 投与前の外因性デコリン投与により量依存的に減少した(Figure 3B-C)。LPS あるいはデコリンの投与は共に MMP-2 の分泌に影響がなく、このことは本実験中に細胞生存が保たれていたことを示している(Figure 3D)。これらの結果から、デコリンは MMP-9 の増加を防ぐことにより、炎症応答から VSMC を保護する役割を担っていたと考えられる。



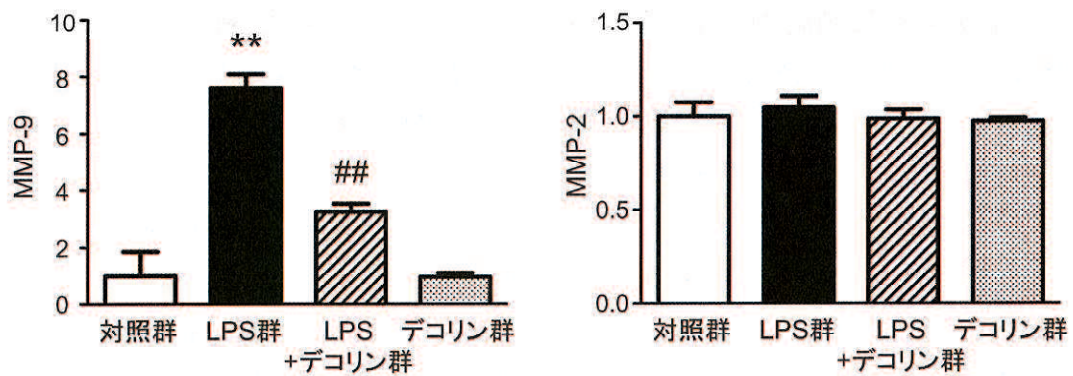


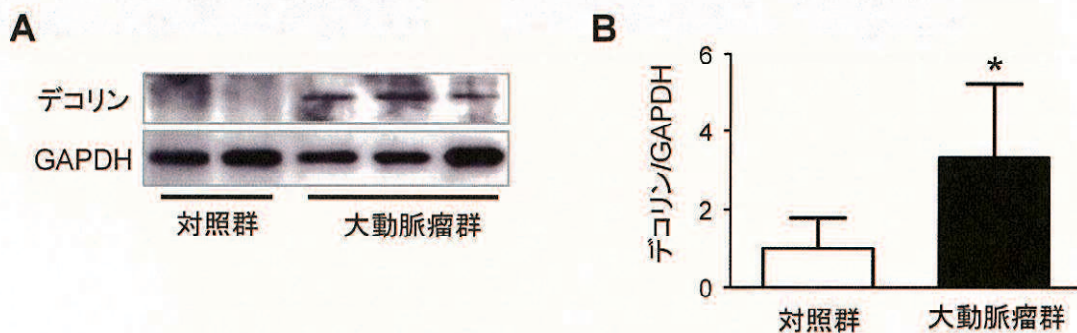
図 3. 血管平滑筋細胞の MMP-9 分泌に対するデコリンの役割

- A. 0、0.4、4、40 μ g/ml デコリン投与の前処置を VSMC に行い、LPS(100 μ g/ml)処置を 48 時間行った。処置後の培養上清をサンプルとして回収し、ザイモグラフィーを行い MMP-9、MMP-2 の分泌について検討した。
- B. LPS 誘発性の MMP-9 分泌増加はデコリンの投与量に依存して減少した。
- C,D. デコリンの投与により、LPS による MMP-9 の分泌増加が減少した。LPS ならびにデコリンの投与は MMP-2 の分泌に影響を与えなかった。

**: p <0.01 vs 対照群、##: p <0.01 vs LPS 群

3.4 ヒト AAA におけるデコリンの発現

これらの結果がヒトに適用できるかを調べるため、ヒト AAA 検体でデコリン蛋白レベルを検討した。開腹手術が行われた患者から AAA の標本を手に入れたため、検体は AAA 形成初期段階というよりむしろ、AAA 進行段階に相当した。このためこれらの標本は CaCl_2 処置後 42 日目のマウス AAA の標本と対応していた。予想通り、デコリン発現はヒト非大動脈瘤壁(対照群)に比べて、ヒト AAA 瘤壁において著明に発現していた(Figure 4A-B)。MMP-9 発現も過去の報告と同様に^(26,27)、ヒト大動脈瘤壁において高度に増加していた。興味深いことに、ヒト検体においてデコリン蛋白レベルは MMP-9 蛋白発現と明らかに相関していた(Figure 4C)。AAA において細胞外マトリックスを安定化させると言われている TGF- β 蛋白もまた、ヒト大動脈検体において明らかにデコリン蛋白レベルと相関していた(Figure 4D)。次にヒト大動脈瘤壁において、デコリンと MMP-9 の組織内の局在と、病理組織学的構造との関連を分析した。大動脈瘤壁では炎症細胞の浸潤と弾性線維の断片化・消失が典型的に見られる。デコリンと MMP-9 は厳密には共在していなかったが、デコリンと MMP-9 は主に細胞浸潤と組織破壊が著明な中膜と外膜に見られた(Figure 4E)。蛍光免疫染色では、中膜、外膜において α -SMA 陽性の平滑筋細胞ではなく CD68 陽性のマクロファージと主に共在していた(Figure 4F-G)。大動脈瘤壁とは対照的に、非大動脈瘤壁では対照群のマウスと同様に MMP-9 の発現が見られない中膜ではなく、外膜にデコリンが発現していた。ヒトとマウスの実験結果より AAA 形成においてデコリンは保護的な役割を担っていることが示唆された。しかしデコリン発現と MMP-9 発現が相関している進行段階の AAA 壁においては、デコリンが AAA の進行に促進的な役割を担っていることが示唆された。



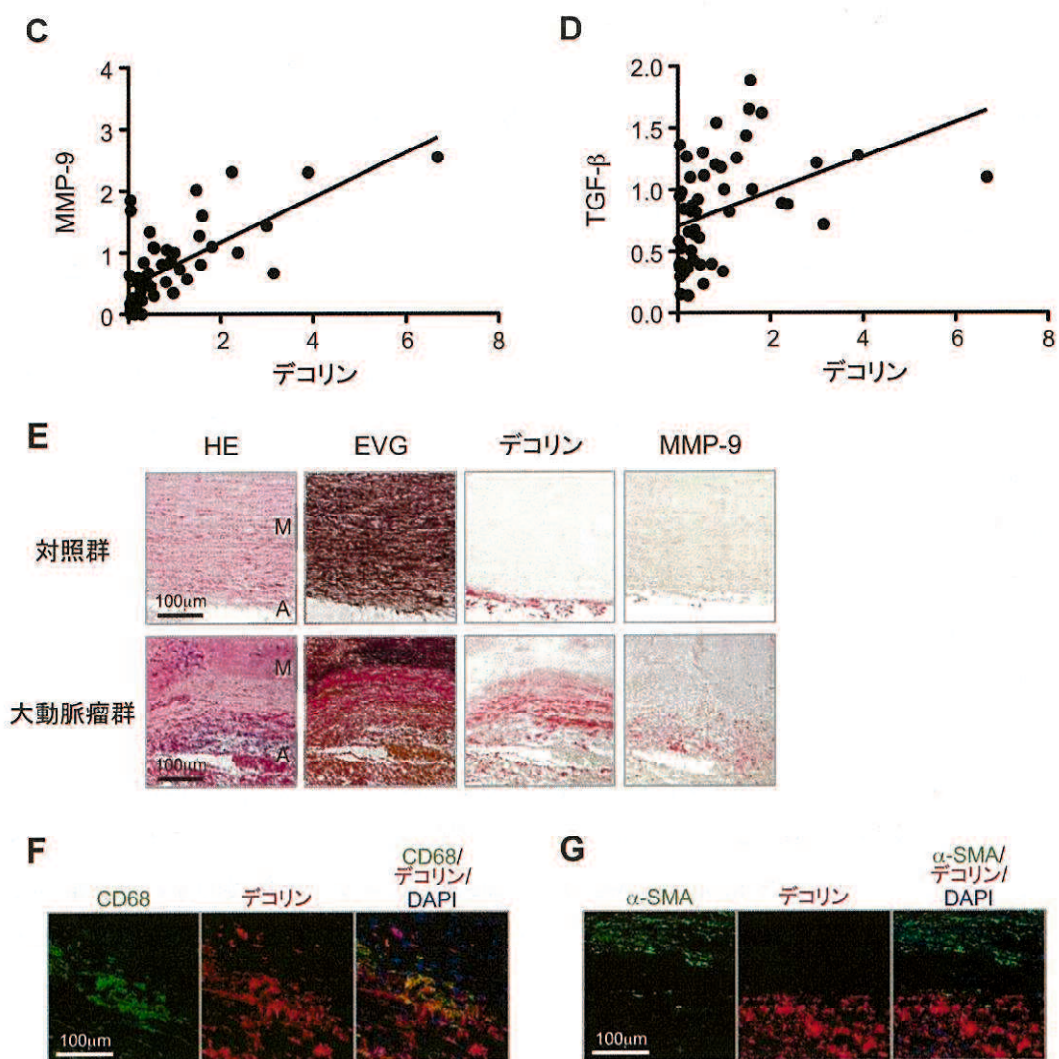


図4. ヒト AAA におけるデコリンの発現

A,B. デコリン発現はヒト非大動脈瘤壁(対照群)に比べて、ヒト AAA 瘤壁(大動脈瘤群)において著明に増加していた。

*: $p < 0.05$ vs 対照群

C,D. MMP-9 ならびに TGF-β の発現は、それぞれデコリンの発現と相関していた。

E. 大動脈瘤群のデコリンと MMP-9 は主に細胞浸潤と組織破壊が著明な中膜と外膜に局在していた。

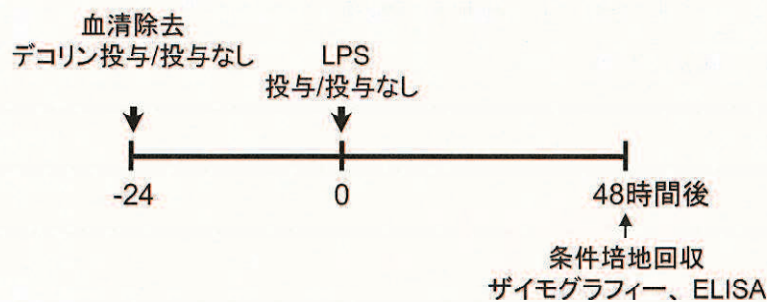
M:中膜 A:外膜

F,G: デコリンは中膜、外膜において α-SMA 陽性の平滑筋細胞ではなく CD68 陽性のマクロファージと共存していた。

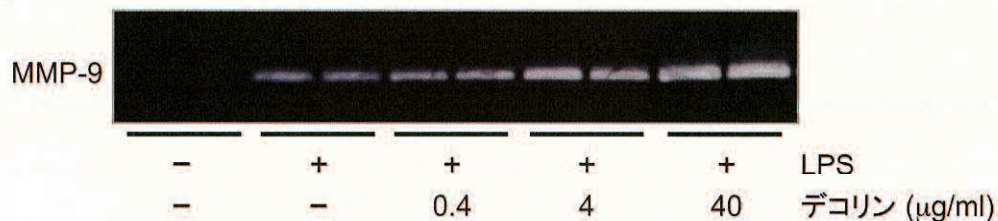
3.5 マクロファージの MMP-9 分泌に対するデコリンの役割

大動脈壁におけるデコリンの役割に関する矛盾を解明するために、AAA 壁において MMP-9 を分泌する主要な炎症細胞であるマクロファージの MMP-9 分泌を、デコリンが促進するかを検討した^(9,17)。定常状態において MMP-9 はマウスのマクロファージの培養上清サンプルからはほとんど検出されなかった。LPS 投与に反応して、マクロファージは MMP-9 を検出可能なレベルまで分泌した。興味深いことに LPS 投与前に外因性デコリンを投与することにより、LPS 誘発性の MMP-9 分泌増加が、デコリン量に依存して促進された(Figure 5B-C)。さらに LPS 投与によりマクロファージからの TGF- β の分泌が増加し、外因性デコリンを投与することにより TGF- β の分泌増加がさらに促進した(Figure 5D)。これらの結果から、デコリンがマクロファージの MMP-9 分泌を促進し、VSMC の MMP-9 の分泌を抑制することが示された。このように、デコリンが MMP-9 の分泌において細胞の種類により相反する効果をもつことを明らかにした。

A



B



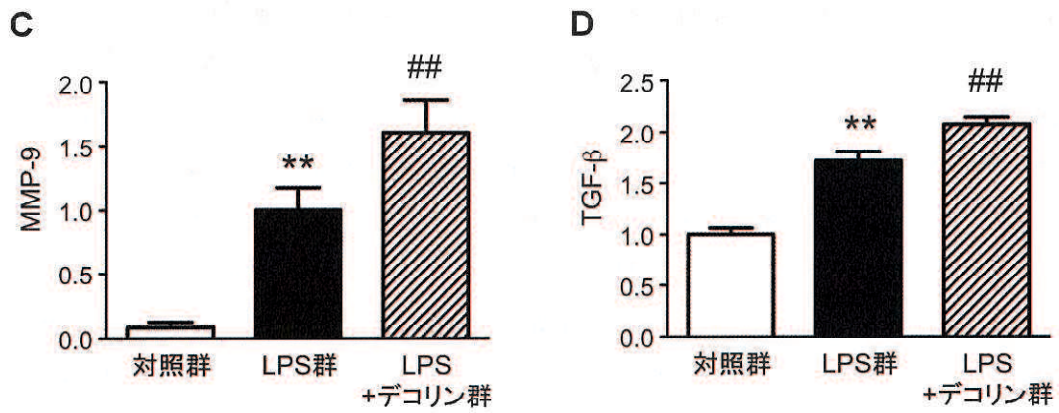


図5. マクロファージの MMP-9 分泌に対するデコリンの役割

- A. 0、0.4、4、40 μ g/ml デコリン投与前処置をマウスのマクロファージに行い、LPS(100 μ g/ml)処置を48時間行った。
- B. 処置後の培養上清をサンプルとして回収し、ザイモグラフィを行い MMP-9 の発現について検討した。LPS 誘発性の MMP-9 分泌増加は、デコリンの投与量依存性に促進された。
- C,D. デコリンを投与することにより、LPS による MMP-9、TGF- β の分泌増加が促進した。

**: $p < 0.01$ vs 対照群、##: $p < 0.01$ vs LPS 群

第4章 考察

本研究では、CaCl₂誘発性のマウス AAA の形成初期に外膜のデコリンが減少し、デコリンの投与により AAA の形成が抑制されることを示した。これらの事実は外膜のデコリンの減少の結果が AAA の形成開始となることを示している。外膜細胞中のデコリン発現は、未知のメカニズムにより、大動脈中膜を炎症性侵襲に対して間接的に保護している可能性が考えられる。しかし我々は、正常もしくは非大動脈瘤の大動脈壁の外膜から放出されるデコリンが中膜に達し、中膜の VSMC に直接作用し蛋白分解から中膜を保護している可能性を示した。我々の結果と同様に、アンジオテンシン II により惹起される他の AAA モデルマウスにおいて、外膜のデコリン発現の減少が大動脈瘤破裂と関係していた⁽¹⁶⁾。ヒト大動脈疾患においても、デコリン発現の欠損はマルファン症候群の致死的な型⁽²⁹⁾や大動脈解離^(30,31)と関連していた。

デコリンは細胞外マトリックス、特にコラーゲンとエラスチン線維などの構造構成要素との相互作用に寄与する特徴があり、またデコリンはコラーゲン原線維形成の調節にとっても重要である。デコリンはエラスチン線維形成と関係がある可能性もある^(14,32)。他の SLRPs と同様に、デコリンはコラゲナーゼによるコラーゲンの分解を保護している⁽³³⁾。これらのデータはデコリンによるコラーゲンとエラスチン線維の安定化が我々の AAA モデルにおいて組織破壊を抑制することに寄与していることを示している。他の可能性として、デコリンが炎症誘発性分子の発現や細胞浸潤を抑制することにより、AAA の形成を抑制していることが考えられる。本研究では、デコリンの局所投与が炎症細胞浸潤と MMP-9 蛋白レベルを著明に減少させたことを証明した。またデコリンが血管平滑筋細胞において、MMP-9 の分泌に抑制的に影響することを示した。過去にマウス粥状硬化症モデルにおいて、全身におけるデコリンの過剰発現によりマクロファージの浸潤と MMP 活性を低下させたことが報告されている⁽³⁴⁾。腫瘍の血管新生においては、デコリン投与により複数のチロシンキナーゼ受容体 (Met など) が拮抗され MMP-9 の発現が抑制された⁽³⁵⁾。さらに胎生期 18 日目のマウス胎膜においては、デコリン欠損により MMP-9 の発現が増加した⁽³⁶⁾。対照的に、デコリンは最近、自然免疫や炎症、腫瘍形成と関連する炎症誘発性シグナルを促進することが証明された^(15,37,38)。デコリンは toll-like receptor (TLR) 2、4 に作用し、マクロファージ中の NF- κ B を活性化することにより主に TNF- α や IL-1 β といったサイトカインの発現を刺激する。報告によるとデコリンは癌細胞株の MMP-9 の発現を増強する⁽³⁹⁾。またデコリンは TLR2 シグナリングへの作用を介して、TLR4 の主要なリガンドである LPS の効果を増強することが示唆されている⁽³⁸⁾。同様に本研究ではマクロファージにおいてデコリンが LPS 誘発性の MMP-9 分泌を増強した。さらにデコリンは TGF- β の受容体への結合を阻害し、抗炎症性サ

イトカインであるIL-10の産生を減少させた^(15,38)。これらの結果は、デコリンがある条件下で炎症反応を促進することを示している。マウスの接触性皮膚炎モデルにおいて、デコリンを欠損させた結果、KC/CXCL-1やMCP-1/CCL2といったケモカインの発現が減少し、白血球の動員が減少した⁽⁴⁰⁾。他の報告によると、マウスのアレルギー誘発性喘息モデルにおいて、デコリンの欠損により炎症性反応が抑制された⁽⁴¹⁾。それ故に、デコリンは炎症促進作用と抗炎症作用をもつ両刃の剣のように思われる。我々は、デコリン蛋白レベルがAAAの癌組織において増加したことを示した。他の報告では胸部大動脈瘤や脳動脈瘤でデコリンが増加したことが示されている⁽⁴²⁻⁴⁴⁾。我々はヒトとマウス両方において、進行したAAAで大量のデコリン発現を認め、その発現はマクロファージの浸潤、組織破壊、MMP-9発現の上昇を伴っていた。破壊的なAAA病変部においてデコリンはマクロファージ中に発現し、マクロファージ中でMMP-9産生を増強することにより炎症誘発性媒体として作用することを強く示した。さらに、デコリンは細胞外マトリックスを安定化するTGF- β を補足し、その活性化を抑制しAAAの形成を促進する⁽¹⁴⁾。TGF- β はアンジオテンシンIIIによるマウス大動脈瘤モデルにおいて、コラーゲンと弾性線維の産生を促進し、既存のAAAを安定化することが示されている^(28,45)。これらの見解は炎症環境においてデコリンが組織破壊を加速することを強く示唆している。一方で、AAAにおいて炎症を改善するために、デコリンが増加している可能性を除外することはできなかった。実際に、破壊的なAAA病変部においてさえ、デコリンはマクロファージ内でTGF- β の蛋白レベルを調整することが示された。しかしこれらの結果からは、デコリンのこの相反する作用のバランスを調節するメカニズムはほとんど分かっていない。デコリンは相反する作用を持っているため、ヒトAAAの治療法として使用するの難しいと思われる。AAAの進行段階においては、デコリンによる治療はマクロファージからのMMP-9の分泌を増加させることにより、さらにAAAの進行を加速させて破裂に至ることになるかもしれない。一方で、外膜のデコリン発現を保存もしくは増強するという戦略は、AAA発症リスクの高い患者にとって有望な予防的治療となる可能性があり、おそらくAAAの初期段階の患者にとって有望な予防的治療となるであろう。これに関連して、高脂血症の患者に治療薬として一般的に使われるスタチン(3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル-コエンザイム還元酵素阻害剤)が、大動脈組織内におけるデコリン発現を増加することが報告された⁽⁴⁶⁾。さらにデコリンは炎症部位や組織破壊領域に貯留し循環内に放出されるため、バイオマーカーとして有用な特性がある。脳梗塞急性期や食道扁平上皮癌の患者において、血清中のデコリンは有望なバイオマーカーとして認識されている^(47,48)。このようにデコリンはAAA進行の活動期を検出する有用なマーカーとして用いられる可能性がある。

第 5 章 結語

本研究では、正常大動脈において外膜のデコリンは血管保護的な役割をするが、一方で AAA 進行段階において大動脈瘤内のデコリン発現は AAA の進行を加速する可能性を示した。このように今回の研究は、AAA の分子病態におけるデコリンの相反する 2 つの役割という新しい見解を示した。デコリンは AAA の予防における治療ターゲットとなる可能性があり、また AAA 進行を検出するバイオマーカーとして用いられる可能性がある。

第 6 章 謝辞

稿を終えるにあたり、ご指導を賜った山口大学大学院器官病態外科学講座（第一外科）、濱野公一教授に感謝致します。また、実験のご指導を頂きました山口大学大学院器官病態外科学講座（第一外科）の吉村耕一先生に感謝申し上げます。

第 7 章 参考文献

1. Sakalihan N, Limet R, Defawe OD (2005) Abdominal aortic aneurysm. *The Lancet* 365: 1577- 1589.
2. Moll FL, Powell JT, Fraedrich G, Verzini F, Haulon S, et al. (2011) Management of Abdominal Aortic Aneurysms Clinical Practice Guidelines of the European Society for Vascular Surgery. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* 41, Supplement 1: S1-S58.
3. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, et al. (2013) Heart Disease and Stroke Statistics—2013 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 127: e6-e245.
4. Kochanek KD, Xu J, Murphy SL, Miniño AM, Kung H-C (2011) Deaths: Final Data for 2009. *Natl Vital Stat Rep* 60: 1-116.
5. Rooke TW, Hirsch AT, Misra S, Sidawy AN, Beckman JA, et al. (2011) 2011 ACCF/AHA Focused Update of the Guideline for the Management of Patients With Peripheral Artery Disease (Updating the 2005 Guideline): A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* 124: 2020- 2045.
6. Golledge J, Muller J, Daugherty A, Norman P (2006) Abdominal Aortic Aneurysm: Pathogenesis and Implications for Management. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 26: 2605- 2613.
7. Golledge J, Norman PE (2011) Current status of medical management for abdominal aortic aneurysm. *Atherosclerosis* 217: 57-63.
8. Yoshimura K, Aoki H (2012) Recent advances in pharmacotherapy development for abdominal aortic aneurysm. *Int J Vasc Med* 2012: 648167.
9. Tedesco MM, Dalman RL (2010) Arterial Aneurysms. In: Cronenwett JL, Johnston KW, editors. *Vascular Surgery*. Philadelphia: Saunders. pp. 117-130.
10. Golledge J, Clancy P, Maguire J, Lincz L, Koblar S (2011) The role of tenascin C in cardiovascular disease. *Cardiovascular Research* 92: 19-28.

11. Kimura T, Yoshimura K, Aoki H, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, et al. (2011) Tenascin-C is expressed in abdominal aortic aneurysm tissue with an active degradation process. *Pathol Int* 61: 559-564.
12. Yamashita O, Yoshimura K, Nagasawa A, Ueda K, Morikage N, et al. (2013) Periostin links mechanical strain to inflammation in abdominal aortic aneurysm. *PLoS One* 8: e79753.
13. Singla S, Hu C, Mizeracki A, Mehta JL (2011) Decorin in atherosclerosis. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 5: 305-314.
14. Neill T, Schaefer L, Iozzo RV (2012) Decorin: a guardian from the matrix. *Am J Pathol* 181:380-387.
15. Frey H, Schroeder N, Manon-Jensen T, Iozzo RV, Schaefer L (2013) Biological interplay between proteoglycans and their innate immune receptors in inflammation. *FEBS J* 280: 2165-2179.
16. Ang LS, Boivin WA, Williams SJ, Zhao H, Abraham T, et al. (2011) Serpina3n attenuates granzyme B-mediated decorin cleavage and rupture in a murine model of aortic aneurysm. *Cell Death Dis* 2: e209.
17. Yoshimura K, Aoki H, Ikeda Y, Fujii K, Akiyama N, et al. (2005) Regression of abdominal aortic aneurysm by inhibition of c-Jun N-terminal kinase. *Nat Med* 11: 1330-1338.
18. Onoda M, Yoshimura K, Aoki H, Ikeda Y, Morikage N, et al. (2010) Lysyl oxidase resolves inflammation by reducing monocyte chemoattractant protein-1 in abdominal aortic aneurysm. *Atherosclerosis* 208: 366-369.
19. Nomura S, Yoshimura K, Akiyama N, Mikamo A, Furutani A, et al. (2005) HMG-CoA reductase inhibitors reduce matrix metalloproteinase-9 activity in human varicose veins. *Eur Surg Res* 37: 370- 378.
20. Nagasawa A, Yoshimura K, Suzuki R, Mikamo A, Yamashita O, et al. (2013) Important role of the angiotensin II pathway in producing matrix metalloproteinase-9 in human thoracic aortic aneurysms. *J Surg Res*.
21. Hamblin M, Chang L, Zhang H, Yang K, Zhang J, et al. (2010) Vascular smooth muscle cell peroxisome proliferator-activated receptor-gamma deletion promotes abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 52: 984-993.

22. Nordstrom T, Grinstein S, Brisseau GF, Manolson MF, Rotstein OD (1994) Protein kinase C activation accelerates proton extrusion by vacuolar-type H(+)-ATPases in murine peritoneal macrophages. *FEBS Lett* 350: 82-86.
23. Ricci R, Sumara G, Sumara I, Rozenberg I, Kurrer M, et al. (2004) Requirement of JNK2 for scavenger receptor A-mediated foam cell formation in atherogenesis. *Science* 306: 1558-1561.
24. Kuhn B, del Monte F, Hajjar RJ, Chang YS, Lebeche D, et al. (2007) Periostin induces proliferation of differentiated cardiomyocytes and promotes cardiac repair. *Nat Med* 13: 962-969.
25. Yoshimura K, Aoki H, Ikeda Y, Furutani A, Hamano K, et al. (2006) Regression of abdominal aortic aneurysm by inhibition of c-Jun N-terminal kinase in mice. *Ann N Y Acad Sci* 1085: 74-81.
26. Yoshimura K, Aoki H, Ikeda Y, Furutani A, Hamano K, et al. (2006) Identification of c-Jun N-terminal kinase as a therapeutic target for abdominal aortic aneurysm. *Ann N Y Acad Sci* 1085: 403-406.
27. Hellenthal FA, Buurman WA, Wodzig WK, Schurink GW (2009) Biomarkers of AAA progression. Part 1: extracellular matrix degeneration. *Nat Rev Cardiol* 6: 464-474.
28. Wang Y, Krishna S, Walker PJ, Norman P, Golledge J (2013) Transforming growth factor-beta and abdominal aortic aneurysms. *Cardiovasc Pathol* 22: 126-132.
29. Pulkkinen L, Kainulainen K, Krusius T, Makinen P, Schollin J, et al. (1990) Deficient expression of the gene coding for decorin in a lethal form of Marfan syndrome. *J Biol Chem* 265: 17780-17785.
30. Mohamed SA, Sievers HH, Hanke T, Richardt D, Schmidtke C, et al. (2009) Pathway analysis of differentially expressed genes in patients with acute aortic dissection. *Biomark Insights* 4: 81-90.
31. Zhang K, Pan X, Zheng J, Xu D, Zhang J, et al. (2014) Comparative tissue proteomics analysis of thoracic aortic dissection with hypertension using the iTRAQ technique. *Eur J Cardiothorac Surg*.

32. Reinboth B, Hanssen E, Cleary EG, Gibson MA (2002) Molecular interactions of biglycan and decorin with elastic fiber components: biglycan forms a ternary complex with tropoelastin and microfibril-associated glycoprotein 1. *J Biol Chem* 277: 3950-3957.
33. Geng Y, McQuillan D, Roughley PJ (2006) SLRP interaction can protect collagen fibrils from cleavage by collagenases. *Matrix Biol* 25: 484-491.
34. Al Haj Zen A, Caligiuri G, Sainz J, Lemitre M, Demerens C, et al. (2006) Decorin overexpression reduces atherosclerosis development in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 187: 31-39.
35. Neill T, Painter H, Buraschi S, Owens RT, Lisanti MP, et al. (2012) Decorin antagonizes the angiogenic network: concurrent inhibition of Met, hypoxia inducible factor 1alpha, vascular endothelial growth factor A, and induction of thrombospondin-1 and TIMP3. *J Biol Chem* 287: 5492-5506.
36. Wu Z, Horgan CE, Carr O, Owens RT, Iozzo RV, et al. (2014) Biglycan and decorin differentially regulate signaling in the fetal membranes. *Matrix Biology* 35: 266-275.
37. Merline R, Moreth K, Beckmann J, Nastase MV, Zeng-Brouwers J, et al. (2011) Signaling by the matrix proteoglycan decorin controls inflammation and cancer through PDCD4 and MicroRNA-21. *Sci Signal* 4: ra75.
38. Moreth K, Iozzo RV, Schaefer L (2012) Small leucine-rich proteoglycans orchestrate receptor crosstalk during inflammation. *Cell Cycle* 11: 2084-2091.
39. Dil N, Banerjee AG (2012) Knockdown of aberrantly expressed nuclear localized decorin attenuates tumour angiogenesis related mediators in oral cancer progression model in vitro. *Head Neck Oncol* 4: 11.
40. Seidler DG, Mohamed NA, Bocian C, Stadtmann A, Hermann S, et al. (2011) The role for decorin in delayed-type hypersensitivity. *J Immunol* 187: 6108-6119.
41. Marchica CL, Pinelli V, Borges M, Zimmer J, Narayanan V, et al. (2011) A role for decorin in a murine model of allergen-induced asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 300: L863-873.
42. Theocharis AD, Karamanos NK (2002) Decreased biglycan expression and differential decorin localization in human abdominal aortic aneurysms. *Atherosclerosis* 165: 221-230.

43. Gomez D, Al Haj Zen A, Borges LF, Philippe M, Gutierrez PS, et al. (2009) Syndromic and non- syndromic aneurysms of the human ascending aorta share activation of the Smad2 pathway. *J Pathol* 218:131-142.
44. Kadirvel R, Ding YH, Dai D, Lewis DA, Kallmes DF (2010) Differential expression of genes in elastase-induced saccular aneurysms with high and low aspect ratios. *Neurosurgery* 66: 578-584; discussion 584.
45. Humphrey JD (2013) Possible mechanical roles of glycosaminoglycans in thoracic aortic dissection and associations with dysregulated transforming growth factor-beta. *J Vasc Res* 50: 1-10.
46. Marzoll A, Melchior-Becker A, Cipollone F, Fischer JW (2011) Small leucine-rich proteoglycans in atherosclerotic lesions: novel targets of chronic statin treatment? *J Cell Mol Med* 15: 232-243.
47. Wu IC, Wu D-C, Huang C-C, Lin H-S, Chen Y-K, et al. (2010) Plasma decorin predicts the presence of esophageal squamous cell carcinoma. *International Journal of Cancer* 127: 2138-2146.
48. Xu Y-Z, Yang Z-G, Zhang Y-H, Zhang Y-W, Hong B, et al. (2012) Dynamic Reduction of Plasma Decorin Following Ischemic Stroke: A Pilot Study. *Neurochemical Research* 37: 1843-1848.