

主論文の要旨

**The Oral Administration of Clarithromycin Prevents
the Progression and Rupture of Aortic Aneurysm**

〔経口クラリスロマイシンの大動脈瘤発症・抑制効果〕

名古屋大学大学院医学研究科 総合医学専攻
病態外科学講座 心臓外科学分野

(指導：碓氷 章彦 教授)

内田 亘

【緒言】

大動脈瘤は死に至る疾患であり、その罹患率は増加傾向にある。その一般的な治療法は、人工血管による外科手術もしくはステントグラフトによる血管内手術となる。しかし手術困難例には他の治療戦略がないのが現状である。そのため、低侵襲で非手術的な治療が大動脈瘤治療に必要と考えられる。大動脈瘤は一般的に慢性炎症による炎症細胞の浸潤、炎症性サイトカインの増殖により、エラスチンなどの細胞外マトリックス (ECM) の変性により起きる。M1 マクロファージ (MΦ) は、サイトカイン放出などの炎症性変化をもたらす一方で、M2MΦは組織修復を制御する抗炎症性効果をもたらす。M1MΦはECMを変性するMMP-2やMMP-9を放出・活性化し、M2MΦは線維化の前駆因子を放出することで動脈壁の修復を担う。クラリスロマイシンは、抗生物質として知られる一方、抗炎症作用やMMP抑制作用などの効果が知られる。本研究は、アンジオテンシンII誘発アポリポプロテインE欠損マウスへの経口クラリスロマイシン投与の大動脈瘤形成および破裂の予防効果について調べた。

【方法】

28~30週齢のアポリポプロテイン欠損マウス(C57BL/6)に、2000ng/kg/分のアンジオテンシンIIを28日間投与した。その間、100mg/kg/日のクラリスロマイシンを経口投与された群をCAM群、生理食塩水を投与された群をCONT群としてそれぞれ13例に任意にわけた。毎週超音波で大動脈の性状を評価した。

実験開始後28日で、全マウスを犠牲死し、開腹後遠位弓部から腹部大動脈終末まで剥離し、大動脈径を測定後、腎動脈上部で切片を作成し、残りを蛋白抽出した。蛋白は、ザイモグラフィでMMP-2と-9の活性を測定、またELISA法でTNF- α 、IL-1 β 、IL-6、TIMP-1、TIMP-2、MCP-1を測定し、ウェスタンブロット法でNF- κ Bのリン酸化を測定した。大動脈壁のエラスチンとMΦを測定するために、エラスチカヴァンギーソン(EVG)染色と蛍光免疫染色を行った。免疫染色では、M1MΦを染色するためにiNOSで染色し、M2MΦを染色するためにArginase-1で染色した。

【結果】

超音波検査での大動脈最大径は、CAM群とCONT群それぞれ、投与前が 1.42 ± 0.20 mmと 1.36 ± 0.16 mm、開始後1週目が 1.56 ± 0.29 mmと 2.05 ± 0.41 mm ($P < .01$)、2週目が 1.67 ± 0.36 mmと 2.09 ± 0.45 mm ($P = .03$)、3週目が 1.65 ± 0.37 mmと 2.50 ± 0.19 mm ($P < .01$)、4週目が 1.74 ± 0.4 と 2.61 ± 0.37 ($P < .01$)であった。(Fig.1) 大動脈瘤発現率は、CONT群で100%であったのに対し、CAM群では23.1%と有意に低かった。またCONT群では5例の大動脈破裂死を認めたのに対し、CAM群では認めなかった。(Fig.2)

EVG染色で大動脈中膜に占めるエラスチンの面積を測定したところ、CAM群で $56.3 \pm 17.4\%$ に対し、CONT群で $16.5 \pm 9.3\%$ とCAM群で有意にエラスチンが維持された。(Fig.3) 蛍光免疫染色では、大動脈壁におけるiNOS陽性MΦ (M1MΦ) はCAM群と

CONT 群それぞれ、 $3.6 \pm 0.6\%$ と $22.5 \pm 6.0\%$ ($P < .01$) であり、Arginase-1 陽性 MΦ (M2MΦ) はそれぞれ、 $12.0 \pm 1.3\%$ と $3.4 \pm 0.6\%$ ($P = .04$) であり、クラリスロマイシンは M1MΦ を有意に抑制し、M2MΦ を誘発した。(Fig.4)

ザイモグラフィでは、大動脈組織中の MMP-2 と -9 の活性を評価したところ、CAM 群と CONT 群はそれぞれ、活性化 MMP-2 が 0.15 ± 0.10 と 0.56 ± 0.25 ($P < .01$)、活性化 MMP-9 が 0.12 ± 0.12 と 0.60 ± 0.16 ($P < .01$) と CAM 群で有意に抑制された。(Fig.5) 大動脈組織蛋白を ELISA 法で測定したところ、CAM 群と CONT 群でそれぞれ、IL-1β は 346.6 ± 105.8 と 1066.0 ± 281.1 ($P = .04$)、IL-6 は 128.4 ± 22.8 と 346.2 ± 88.9 ($P = .04$) と CAM 群が有意に抑制されたが、TNF-α は 19.0 ± 4.7 と 19.8 ± 2.2 ($P = .89$)、MCP-1 は 758.9 ± 253.5 と 899.3 ± 227.1 ($P = .69$)、TIMP-1 は 154.1 ± 33.2 と 178.4 ± 20.8 ($P = .56$)、TIMP-2 は 12.7 ± 1.2 と 12.4 ± 1.0 ($P = .84$) と変わりなかった。ウエスタンブロット法で、NF-κB のリン酸化を測定したところ、 0.28 と 2.03 と CAM 群で有意に抑制された。 ($P < .01$) (Fig.6)

【考察】

大動脈瘤は、動脈硬化と一般的に関連する。アポリポプロテイン E 欠損マウスにアンジオテンシン II を投与する動脈瘤モデルは、その他の動脈瘤モデルと比較し、ヒトの大動脈瘤の発症と強く類似すると考えられている。アンジオテンシン II は MΦ の血管透過性を促進し、MΦ はエラスチンなどの ECM を変性する MMP-2 や MMP-9 を産生し、血管壁の構造破壊を来す。このように、血管の炎症は ECM の変性と合成の不均衡を引き起こす。

抗炎症作用、MMP などプロテアーゼの発現の抑制、平滑筋のアポトーシスの抑制、細胞の酸化ストレスの抑制が、大動脈瘤発現の抑制に重要であると考えられてきた。その中でドキシサイクリンが動脈瘤を抑制するという報告がある。ドキシサイクリンは MMP を抑制することで知られ、動脈瘤予防の臨床研究の報告があるが、濃度依存性の副作用があり、長期投与に適さないため、現在臨床応用に至っていない。

クラリスロマイシンは抗生物質作用だけでなく、抗炎症用などの効果を有する。また抗炎症作用を目的に、呼吸器系疾患に対して頻りに長期投与されている。本研究では、クラリスロマイシンが、MMP-2 と MMP-9 の活性を抑制し、大動脈壁の構造を維持した。加えてクラリスロマイシンは、M1MΦ の浸潤を抑制し、M2MΦ の浸潤を促した。M1MΦ は、MMP-2 と -9 を産生するため、M1mΦ の浸潤の抑制は、MMP-2 と -9 の減少につながる。

NF-κB は、炎症前駆シグナルと考えられ、また多数の免疫・炎症反応を担う遺伝子翻訳を制御することが知られている。NF-κB は、ILs や TNF-α、MMP-2、-9 の制御、そしてその活性化が炎症細胞の遊走につながる。NF-κB の活性化の抑制が動脈瘤発現の制御につながるという実験報告もある。本研究では、クラリスロマイシンが NF-κB のリン酸化を抑制することも示した。NF-κB のリン酸化を抑制することが結果として、MΦ の浸潤や MMP-2、-9 やサイトカイン産生を抑制し、結果として動脈瘤発現

を抑制したと考える。TIMP-1 や TIMP-2 が抑制されなかったことから、クラリスロマイシンが TIMPs を介さずに MMP-2、-9 を阻害したと考えられる。これはドキシサイクリンと作用機序が異なる点である。IL-1 β や IL-6 の抑制は、NF- κ B リン酸化の抑制によるものだが、TNF- α は JNK 系などの他のシグナル経路により制御されているのかもしれない。

【結語】

クラリスロマイシンは、NF- κ B の活性化を抑制することで動脈瘤発現および破裂を予防した。