ヒト動脈硬化病変における炎症性ケモカインの持続的発現：cDNAマクロアレー法およびReal Time RT-PCRによる定量的解析による検討

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 山岸, 正和 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9768

金沢大学十全医学会雑誌　第115巻　第2号　104－105（2006）

【研究紹介】

ヒト動脈硬化病変における炎症性ケモカインの持続的発現：cDNAマクロアレー法およびReal Time RT-PCRによる定量的解析による検討

Sustained Upregulation of Inflammatory Chemokine and Its Receptor in Aneurysmal and Occlusive Atherosclerotic Disease: Results From Tissue Analysis With cDNA Macroarray and Real-Time Reverse Transcriptional Polymerase Chain Reaction Methods

金沢大学大学院医学系研究科循環医科学専攻
臓器機能制御学・循環器内科
山　岸　正　和

動脈硬化病変が進展すると，終末像として狭窄性または拡張性病変として認識される．このような病変進展においては，局所のおける組織リモデリングが深く関わることが，主として動物実験ないし[1]，臨床成績として示されてきた[2,3]．

動脈硬化進展の極初期においては，monocyte chemotactic protein (MCP)-1，interleukin (IL)-6などの炎症性サイトカインが注目されてきた[4-6]．しかし，一旦進展した動脈硬化病変におけるかかるサイトカインの挙動については不明な点が多いの現状である[7,8]．今回は，cDNAマクロアレー法および生体微量試料での定量可能なreal-time reversed-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR法)を用いて，ヒト狭窄病変，拡張病変における炎症性サイトカイン・ケモカイン発現の解析を試みた．

方　　法

対象と生体試料採取：31例の腹部大動脈瘤手術症例(男性29例and女性2例；平均年齢71±2才)および24例の頚動脈狭窄内膜剥離術症例 (全て男性，平均年齢68±2才) から局所試料を採取した．各術中において得た試料は直ちに-80℃で凍結し，mRNAの抽出，免疫染色に供した．

cDNAマクロアレー法.：RNAの抽出とcDNA合成は 既報の方法にて行った[2]．要約すれば，1.0ml ISOGEN™ (Nippon Gene, Tokyo, Japan) で均一化した後，0.2mlのクロロホルムとともに15,000×gで15分遠心した．上清をに0.6mlのイソプロパノールを加え，さらに15分遠心した．抽出したRNAを70%ethanolで洗浄した後，DNase Free™で60分攪拌し，Superscript Ⅱ™存在下にRandom Primer™と反応した．

Atlas Human Array kit (Clontech Laboratories, Palo Alto, California, USA)を用いた．2.5μgのRNAをHuman Cytokine-Specific Primers (R&D Systems, USA)とインキュベートした後，[α-^{32}P] dATPを添加した．375の炎症性サイトカイン・ケモカインを解析可能システムを用いた (Human Cytokine Expression Array; R&D Systems)．Real-time RT-PCRはABI PRISM™ 7700を用いて行った．

結　　果

マクロアレー法により，サイトカイン・ケモカイン関連375遺伝子のうち23遺伝子が明らかに過剰発現していた．これらのうち特に発現が顕著に亢進していた10遺伝子を列挙すれば，Activin R1A (TGF b superfamily, 13: 1), Activin R1B (TGF b superfamily, 12: 1), BMP RIIA (TGF b superfamily, 12: 1), CXCR-5 (chemokine receptor, 12:1), CXCR-2 (chemokine receptor, 11: 1), IL-8 (chemokine, 9: 1), CCR-6 (chemokine receptor, 9: 1), BMP RIA (TGF b superfamily, 8: 1), CXCR-1 (chemokine receptor, 7: 1), CXCR-6 (chemokine receptor, 7: 1)，との結果であった．この中で，IL-8とその受容体であるCXCR-2が共に動脈硬化部位で発現亢進していたのは大変興味深い．

動脈瘤部位においてはIL-8及びCXCR-2は各々0.53±0.16，2.04±0.75であり，隣接する比較的健常部位（0.11±0.04及び0.29±0.10）に比し，有意に発現が亢進していた($p<0.01$)．かかる状況の下で，MCP-1及びCCR-2は病変部位で各々1.51±0.38，1.24±0.10であったが，比較的健常部位との間には有意差を認めなかった(0.32±0.08及び0.28±0.09)．

頚動脈狭窄病変でのIL-8及びCXCR-2は各々1.35±0.25，2.00±0.51であり，両者とも隣接する比較的健常部位に比し，有意に高値をしめした（0.60±0.16，0.58±0.21 ($p<0.05$)）(図2)．かかる条件下でのMCP-1，CCR-2は，病変部位 (0.44±0.15，2.72±1.76) と健常部位 (0.38±0.11，0.99±0.18,) で有意差を認めなかった．

腹部大動脈瘤，頚動脈狭窄両部位において，比較的健常部においてもCD-68陽性のマクロファージの浸潤を伴う，軽度動脈硬化病変が存在した．この際，IL-8，CXCR-2はCD-68陽性マクロファージに一致して発現していた(図3)．

考　　察

微量生体試料におけるmRNA発現解析：マイクロチップや膜型のcDNAマクロアレー法を用いれば，多数の遺伝子発現を一挙に解析可能である[9]．本研究においても，まず375のサイトカイン・ケモカイン関連遺伝子を検索し得る手法をもちいた．その結果，IL-8 (x9) 及びその受容体であるCXCR-2 (x11) が同時に発現亢進していることが示唆された．しかしながら，cDNAマクロアレー法による結果は，あくまでも相対的な発現変化をみているに過ぎず，それを正しく評価するには更に定量性に富んだ方法，例えばreal-time RT-PCRによる検討が必

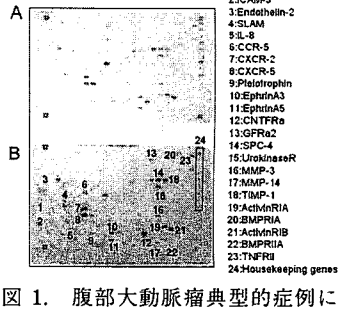

図 1.　腹部大動脈瘤典型的症例におけるcDNAマクロアレー結果．(A) 比較的健常部位 (B) 病変部位

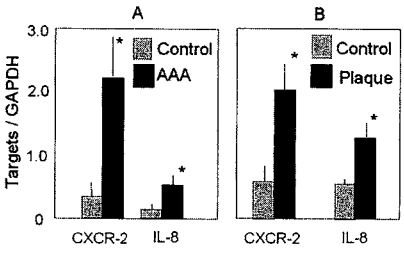

図 2. CXCR-2及びIL-8の発現 (A) 腹部大動脈瘤，(B) 頚動脈狭窄.

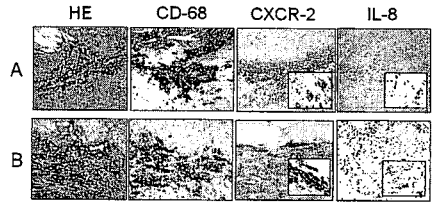

図 3. 免疫組織学的検討 (A) 腹部大動脈瘤，(B) 頚動脈狭窄. 拡大率は各々x100，x400である.

表 1. プライマーとプローブ

IL8 sense:	TCTAGGACAAGAGCCAGGAAGAA
IL8 antisense:	GGCCAGCTTGGAAGTCATGT
IL8 Taqman:	CACCGGAAGGAACCATCTCACTGTGTGTA
CXCR2 sense:	TACATGGCTTGATCAGCAAGGA
CXCR2 antisense:	GCCCTGAAGAAGAGCCAACA
CXCR2 Taqman:	TGCCCAAAGACAGCAGGCCTTCCT
CCR2 sense:	GCCGCTGCTCATCATGGT
CCR2 antisense:	TGCCTCTTCTTCTCGTTTCGA
CCR2 Taqman:	ACTCGGGAATCCTGAAAACCCTGCTTC

MCP-1 についてはオンライン検索による(Assay ID Hs00234140_m1)

要である[2]．そこで今回はcDNAマクロアレー法による候補遺伝子の確認と，real-time RT-PCR法による定量の両法を併用した．

狭窄性，拡張性動脈硬化病変における炎症性サイトカイン・ケモカインの意義：腹部動脈瘤部位，頚動脈狭窄部位両方で認められたIL-8はC-X-Cケモカインに属し，様々な炎症性刺激により産生されることがしられている[10-13]．例えば，IL-8発現を欠くマクロファージを有する場合，機械的障害に伴うマクロファージの集積が抑制されるという[14]．さらに，IL-8には血管新生を介しての動脈硬化促進作用があることも示されつつある[15]．実際，白血球などの細胞成分や[16]，MMP-9の発現誘導を介しての幹細胞の動員などの効果も示された[17]．後者の効果は，これまでの著者らの成績からも大変興味深いものがある．すなわち，動脈瘤部位におけるMMP-1や-3の発現亢進，および狭窄部位におけるMMP-1, -3 and -9の発現亢進などである[2,3]．MMP-9はまた，心筋梗塞発症に関連する冠動脈局所での発現亢進も最近示された[18]．従って動脈硬化関連部位におけるIL-8の持続的発現亢進がこれらのMMPs発現亢進と関連があることが窺われる．

興味あることに，IL-8はMMPの作用に拮抗するtissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMPs) の発現抑制作用を有する[19]．実際，著者らの成績においても拡張性，狭窄性いずれの病変においてもMMPs/TIMPsの亢進が示された[2,3]．かかる状況下でのIL-8の発現亢進はTIMPs産生の抑制を伴っての拡張性，狭窄性病変の進展に関わることが推定されよう．IL-8の受容体であるCXCR-2は動脈硬化病変における単球の動員を介しての病勢の増悪に関連する可能性が示されてきた[20]．実際，骨髄においてCXCR-2の発現を抑制したモデルでは動脈硬化進展が約50%抑制し得るとの成績もある[21]．

動脈瘤，狭窄病変いずれにおいても，MCP-1，CCR-2の発現には有意差を認めなかった．これにはいくつかの理由が考えられるが，一つには比較的健常部位における軽度動脈硬化病変の存在が挙げられる．動脈硬化発生早期には発現が亢進し，経過とともに不変ないし発現減少する可能性が十分推定されよう[1,4]．

臨床的関連性：動脈硬化病変進展における炎症の関与の詳細な仕組みについては未だに不明な点も多い．実際，今回の検討でも炎症性サイトカイン・ケモカインであるIL-8とその受容体であるCXCR-2の発現亢進を示したが，臨床における重症度などとの関連は明らかではない．より軽症病変から重症病変の広い範囲での検索により，動脈硬化の病勢と炎症性サイトカイン・ケモカイン発現の関連が明らかとなろう．

治療との関連においてはスタチン系薬剤がIL-6, IL-8などの発現抑制効果を示すとの成績が注目される[22,23]．また，酸化LDLコレステロールが単球におけるCXCR-2発現を亢進し，拡張性病変または狭窄性病変へと進展する可能性も示唆されつつある[24]．実際，アトルバスタチンは単核球におけるIL-8産生抑制を介していくつかの心臓血管系のイベントを抑制すると推定される[25,26,27]．また，アンジオテンシン受容体拮抗薬がIL-8産生抑制を介して動脈硬化進展を阻止する可能性もある[28]．

参 考 文 献

1) Libby P. *Nature* 2002; 420: 868-874
2) Higashikata T, et al *Atherosclerosis* 2004; 177: 353-360
3) Higashikata T, et al *Atherosclerosis* 2006; 185: 165-172
4) Boring L, et al *Nature* 1998; 394: 894-897
5) Ito T, et al *Current Drug Targets-Inflammation and Allergy.* 2003; 2: 257-265
6) Kusamo KF, et al *Circ J* 2004; 68: 671-676
7) Koch AE, et al *Am J Pathol* 1993; 142: 1423-1431
8) Yamagishi M, et al *J Am Coll Cardiol* 2004; 43(suppl A): 497A
9) Faber BC, et al *Circ Res.* 2001; 89: 547-554.
10) Matsushima K, et al *Cytokine* 1989; 1: 2
11) Boisvert WA, et al *Immuno Res* 2000; 21: 129-137
12) Yound JL, et al *Thromb Haemost* 2002; 88: 554-567
13) Hansson GK, et al *Circ Res* 2002; 91: 281-291
14) Boisvert WA, et al *J Clin Invest* 1998; 101: 353-363
15) Simonini A, et al *Circulation* 2000; 101: 1519-1526.
16) Chakrabarti S, et al *J Leukoc Biol.* 2005 Apr 14; [Epub ahead of print]
17) Pruijt JF, et al *Proc Natl Acad Sci.* 2002; 99: 6228-6233.
18) Funayama H, et al *Circ J* 2004; 68: 451-454
19) Moreau M, et al Circulation 1999; 99: 420-426
20) Holm T, et al *J Thromb Haemost* 2003; 1: 257-262
21) Huo Y, et al *J Clin Invest* 2001; 108: 1307-1314
22) Takata M, et al *Br J Pharmacol* 2001; 134: 753-762.
23) Ito T, et al *Atherosclerosis* 2002; 165: 51-55
24) Lei ZB, et al *Cardiovasc Res* 2002; 53: 524-532
25) Nissen SE, et al *JAMA.* 2004; 291: 1071-1080.
26) Cannon CP, et al *N Engl J Med.* 2004; 350: 1495-1504.
27) Wahre T, et al *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 1460-1467
28) Dol F, et al *J Cardiovasc Pharmacol* 2001; 38: 395-405