

## 総説 (第40回徳島医学会賞受賞論文)

### 薬剤誘発性大動脈解離易発症モデルマウスを用いた薬効評価

石澤 有紀<sup>1)</sup>, 合田 光寛<sup>2)</sup>, 相澤 風花<sup>3)</sup>, 座間味 義人<sup>3,4)</sup>, 濱野 裕章<sup>4)</sup>,  
八木 健太<sup>2)</sup>, 池田 康将<sup>1)</sup>, 石澤 啓介<sup>3,4)</sup>, 玉置 俊晃<sup>5)</sup>

<sup>1)</sup>徳島大学大学院医歯薬学研究部薬理学分野

<sup>2)</sup>徳島大学病院総合臨床研究センター

<sup>3)</sup>同 薬剤部

<sup>4)</sup>徳島大学大学院医歯薬学研究部臨床薬理学分野

<sup>5)</sup>JA 徳島厚生連阿南医療センター

(令和3年3月22日受付) (令和3年4月7日受理)

#### はじめに

大動脈解離 (または解離性大動脈瘤) とは大動脈壁が中膜レベルで二層に剥離し偽腔を形成した病態をいう。内膜が亀裂し中膜へ血液が流入する“エントリー”の発生する場所や解離の広がりによって、破裂、心タンポナーデ、分枝血管の閉塞など種々の重篤な合併症をきたす、非常に致死率の高い疾患である。2020年改訂版大動脈瘤・大動脈解離診療ガイドラインによると、解離発症の61.4%が病院着前死亡であり、93%が発症後24時間以内に死亡することが推定されている<sup>1)</sup>。近年はその罹患率が増加傾向にあることが示唆されており、その多くが致死的な転帰をたどることから、発症そのものを予防することが重要な課題である。しかしながら、現在のところ有効な治療薬や予防戦略は確立されていない。その要因として、大動脈解離が急激な発症・進展の経過をたどるために臨床研究のデザインが非常に困難であること、さらに基礎研究レベルにおいても病態解明、予防薬探索が充分になされていなかったことが考えられる。

疫学的には、国際多施設共同研究 (International Registry of Aortic Dissection: IRAD) の結果から、加齢、高血圧、アテローム動脈硬化、結合組織疾患の既往等が危険因子であることが明らかとなった<sup>2)</sup>。これらの危険因子となる病態は、同じく大動脈疾患である大動脈瘤と共通する部分が多いが、両疾患の大きな違いの一つが、大動脈内膜破綻の有無である。そこでわれわれは、薬剤誘発性の大動脈瘤モデルマウスに内皮障害の病態を加えるこ

とで、高率に解離を発症し得るマウスの確立を試みた。

#### 1. 大動脈解離易発症モデルマウス

2000年、Daughertyらにより ApoE 欠損マウスにアンジオテンシン II (Ang II) を負荷することで動脈硬化病変および大動脈瘤が形成されること<sup>3)</sup>が報告されて以降、大動脈瘤モデルの一つとして用いられていた。しかし実際は本モデルにおいて大動脈解離の病態を呈していることが明らかとなったことから<sup>4,5)</sup>、代表的な解離モデルマウスとして汎用されている。また、コラーゲンの架橋を阻害することで血管平滑筋層の弾性板を断裂させ、中膜脆弱化を惹起するリジロキシダーゼ阻害剤、 $\beta$ -アミノプロピオニトリル (BAPN) を単剤で投与することで血管の解離病変を形成するモデルが、ラット<sup>6)</sup>や七面鳥<sup>7)</sup>などで古くから作製されていた。その後徳島大学脳神経外科学分野 兼松医師らが、野生型 C57Bl/6J マウスに BAPN と Ang II を併用する大動脈瘤モデルを確立<sup>8)</sup>して以降、遺伝子改変マウスを必要としない、より簡便な解離モデルマウス作製の手段として両薬剤を軸としたさまざまな手法が試みられている<sup>9,10)</sup>。

一酸化窒素合成酵素 (NOS) は血管内皮機能の維持に重要な役割を果たしており、その阻害剤である N $\omega$ -ニトロ-L-アルギニンメチルエステル (L-NAME) を投与したマウスでは全身性の血管内皮障害を呈することが知られている<sup>11)</sup>。そこで、Ang II + BAPN 負荷を開始する3週間前から連日 L-NAME (10mg/kg/日) を投与し、内

皮機能障害の病態を呈したところに瘤形成のトリガー（血圧上昇と中膜脆弱化）を加えるモデルを作成した<sup>12)</sup>。L-NAME を3週間投与をしたマウスでは内皮細胞間接着分子である VE-カドヘリンの発現低下（図1）を認めており，そこに Ang II+BAPN を負荷すると直後より血圧の上昇を認め，破裂により死亡するマウスが認められた。負荷開始後6週間まで観察したところ Ang II+BAPN の2剤のみの場合（AB群）に比べ有意に解離及び破裂の発症率が上昇していた（表1，図2）。この3剤投与した解離モデル（LAB群）では，コントロール（vehicle+sham）群に比べ中膜弾性板の変性断裂，血管壁への炎症性細胞浸潤，血管内皮障害を示す vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 の発現増加など多様な病態が観察されている。われわれが確立した大動脈解離モデルマウスは，遺伝子改変マウスを用いていないため，遺伝性の疾患によって発症する希少疾患としての大動脈解離のモデルではない。加齢や高血圧，内皮機能異常などの複数の危険因子が関与して発症する，いわゆる生活習慣病のアウトプットとしての解離の病態が比較的良く再現できていると言える。そのため本マウスはヒトにおける解離の病態解明や薬効評価に有用であると考え検証を行なった。

## 2. スタチンによる発症予防効果

以前の研究において，脂質降下薬であるピタバスタチンが血管内皮保護作用及び抗炎症作用を示すことを報告した<sup>13)</sup>。そこで，ピタバスタチンが大動脈解離発症予防効果を有するか否かについて新規モデルマウスを用いて検討した<sup>12)</sup>。LAB群に対しピタバスタチンを前投与し

vehicle L-NAME  
(10 mg/kg/day, 3 weeks)

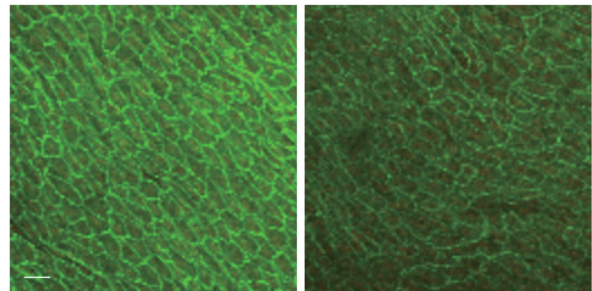


図1 VE-Cadherin En Face 免疫染色像  
(文献12より引用，一部改変)

コントロール群 AB群 LAB群

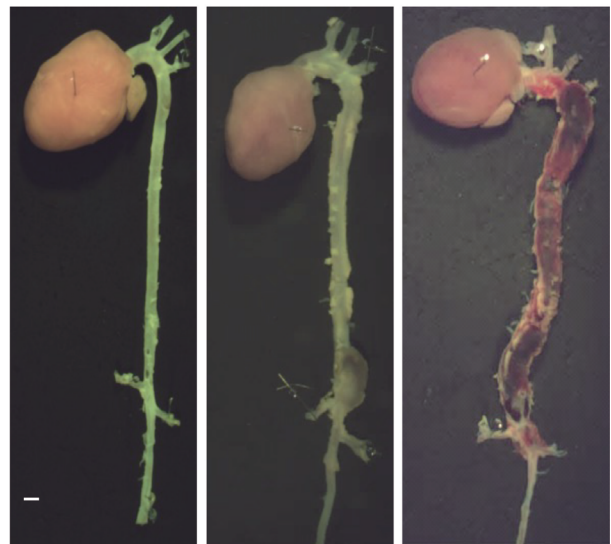


図2 摘出マウス大動脈の肉眼所見  
(文献12より引用，一部改変)

表1 大動脈瘤，解離，破裂の発症率

	コントロール群 n (%)	AB群 n (%)	LAB群 n (%)
胸部大動脈瘤	0/19 (0)	19/51 (37)	13/25 (52)
腹部大動脈瘤	0/19 (0)	28/51 (55)	19/25 (76)
大動脈解離	0/19 (0)	4/51 (8)	11/25 (44)**
破裂	0/19 (0)	8/51 (16)	9/25 (36)*

各病態の形成は以下の基準により判定した。

大動脈瘤：Angiotensin II+BAPN負荷開始6週後に摘出した大動脈の最大径が最小径の1.5倍以上に拡大したもの

大動脈解離：負荷開始6週後に摘出した大動脈切片をEVG染色し，偽腔の形成が認められたもの  
破裂：負荷開始後6週間に破裂により死亡した例

\*\*P<0.01, \*P<0.05 vs AB群

(文献12より引用，一部改変)

た群では、解離の発症率が有意に抑制されることが明らかとなった（表2）。大動脈の組織学的変化を検討したところ、中膜弾性板の崩壊・変性スコアがピタバスタチン投与により改善された。また、マクロファージの特異的マーカーを用いた免疫染色や mRNA 発現の検討から、血管壁へのマクロファージ浸潤が有意に抑制されていることが明らかとなった。これまでの報告同様、ピタバスタチンの抗炎症作用が大動脈解離発症抑制の機序の一つと考えられた。また VCAM-1 の発現抑制、NOS 発現増加、大動脈組織中での窒素化合物（NOx）の産生増加など、*in vivo*、*in vitro* の検討から本モデルにおいてピタバスタチンが血管内皮細胞保護効果を示していることが明らかとなった。以上の基礎研究結果から、大動脈解離の発症には血管内皮障害が重要な役割を果たしていることが明らかとなり、ピタバスタチンは内皮細胞保護効果を介して抗炎症作用・抗酸化ストレス作用を示し、解離発症予防に寄与する可能性が示唆された。

さらに、大規模医療情報データベース（医療ビッグデータ）の一つである、独立行政法人医薬品医療機器総合機構（PMDA）に報告・蓄積されている医薬品副作用データベース JADER（the Japanese Adverse Drug Event Report）を用いて、薬物治療中に発症した大動脈解離に対するスタチン系薬剤の予防効果を検証した。その結果、スタチン系薬剤を併用している群においては、併用なしの群に比べ有意に解離発症の報告例が少ないことが明らかとなった（表3）。本研究において基礎研究結果

表2 ピタバスタチン投与により解離、破裂の発症が抑制された

	大動脈解離 n (%)	破裂 n (%)
LAB 群	7/10 (70)	2/10 (20)
LAB 群+ピタバスタチン	2/11 (18)*	0/11 (0)

Angiotensin II + BAPN 負荷開始後 1 週間での発症率  
\*P<0.05 vs LAB 群 (文献12より引用、一部改変)

と大規模医療情報データベースの解析結果が一致したことから、われわれが確立した LAB モデルマウスが薬効評価に有用であることが示された。

### 3. 食品由来成分による発症予防効果

大動脈解離は突然発症し急激に進展するため、発症予防戦略の確立が求められている。そのためには医療用医薬品のみならず食品由来成分などを利用したセルフメディケーション策が有効である。そこで、大動脈解離易発症 LAB モデルマウスを用いて、発症予防に効果があることが期待される食品由来成分の薬効評価を行なっている。タマネギなどの野菜や果物に豊富に含まれるポリフェノールの一つであるケルセチンは、強力な抗酸化作用を有しており、内皮保護作用や抗炎症作用を介して心血管疾患を予防する可能性が示唆されている<sup>14</sup>。ケルセチンはピタバスタチンと同様、培養血管内皮細胞および摘出大動脈組織中において VCAM-1 の発現を抑制し（図3）、マクロファージの浸潤を抑制した。その結果、解離の発症および破裂による死亡を抑制した（表4）<sup>15</sup>。また、同じく抗酸化活性を有する数種のポリフェノールが含まれている杜仲葉エキスでも、大動脈解離の発症を抑制する傾向を認めており（未発表）、現在その機序についても検討を進めている。

### おわりに

大動脈瘤を惹起する高血圧、中膜脆弱化に加え、内皮機能異常を呈した状態では、解離や破裂などのより重篤な病態を示す可能性が示唆された（図4）。この3つの病態を模した LAB モデルを用いた解析は、医療ビッグデータから得られる臨床的な知見とも一致することが示され、よりヒトの解離発症の病態に近い形での薬効評価が可能であると期待できる。今後もさらに、医療ビッグ

表3 医薬品副作用データベース JADER 解析

Drug A	Drug A 併用なし, n (%)	Drug A 併用あり, n (%)	オッズ比 (95%CI)	p 値
ピタバスタチン	118/109966 (0.11)	1/1792 (0.06)	0.52 (0.07-3.72)	0.5148
スタチン系薬剤	113/95090 (0.12)	6/16668 (0.04)	0.30 (0.13-0.69)	0.0043

大動脈解離の発症が報告された薬剤投与症例において、スタチン系薬剤の併用によりオッズ比の低下を認めた。

(文献12より引用、一部改変)

データ解析と基礎薬理的な手法を組み合わせることで、大動脈解離発症予防に向けた既存薬のドラッグリポジショニングおよび食品由来成分によるセルフメディケーション戦略の確立を目指す。

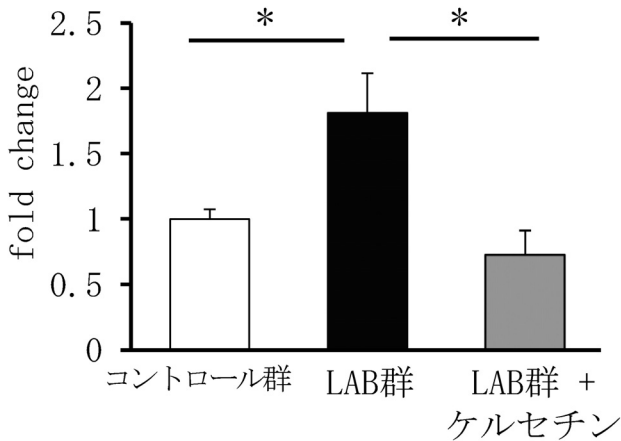


図3 摘出マウス大動脈における VCAM-1 mRNA 発現  
\*P<0.05 (文献15より引用, 一部改変)

表4 ケルセチン投与により解離, 破裂の発症が抑制された

	大動脈解離 n (%)	破裂 n (%)
LAB 群	6/18 (33)	4/18 (22)
LAB 群+ケルセチン	4/25 (16)	0/25 (0)*

Angiotensin II + BAPN 負荷開始後 1 週間での発症率  
\*P<0.05 vs LAB 群 (文献15より引用, 一部改変)

謝 辞

これらの研究遂行にあたり多大なるご協力, ご助言を賜りました徳島大学医歯薬学研究部 薬理学分野および臨床薬理学分野の先生方をはじめ, 共同研究者の皆様にご心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) 2020年改訂版 大動脈瘤・大動脈解離診療ガイドライン. 日本循環器学会/日本心臓血管外科学会/日本胸部外科学会/日本血管外科学会合同ガイドライン
- 2) Pape, L. A., Awais, M., Woznicki, E. M., Suzuki, T., *et al.*: Presentation, Diagnosis, and Outcomes of Acute Aortic Dissection: 17-Year Trends From the International Registry of Acute Aortic Dissection. *J Am Coll Cardiol.*, 66 : 350-358, 2015
- 3) Daugherty, A., Manning, M. W., Cassis, L. A.: Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice. *J Clin Invest.*, 105 : 1605-1612, 2000
- 4) Saraff, K., Babamusta, F., Cassis, L. A., Daugherty, A.: Aortic dissection precedes formation of aneurysms and atherosclerosis in angiotensin II-infused, apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 23 : 1621-1626, 2003
- 5) Trachet, B., Aslanidou, L., Piersigilli, A., Fraga-Silva,

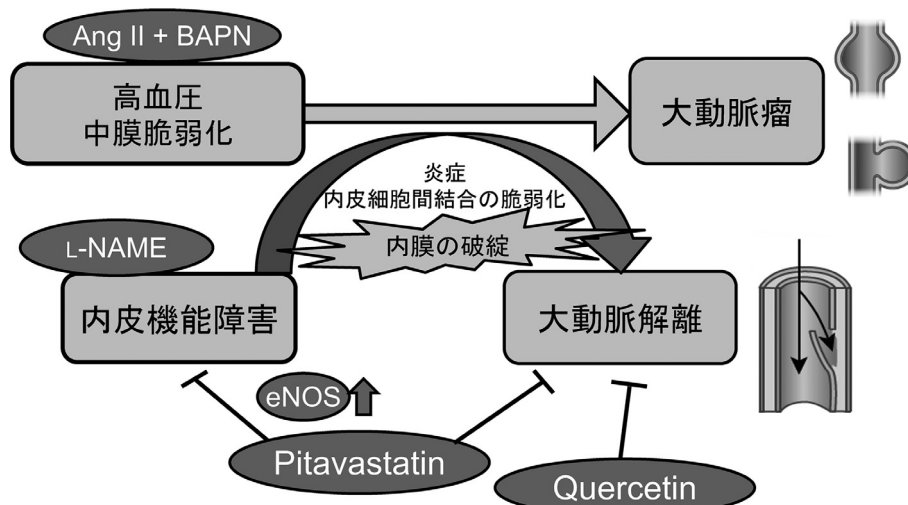


図4 薬剤誘発性の動脈解離易発症モデルマウスの作製と薬効評価

- R. A., *et al.*: Angiotensin II infusion into ApoE<sup>-/-</sup> mice: a model for aortic dissection rather than abdominal aortic aneurysm? *Cardiovasc Res.*, **113**: 1230-1242, 2017
- 6) Nakashima, Y., Sueishi, K.: Alteration of elastic architecture in the lathyrus rat aorta implies the pathogenesis of aortic dissecting aneurysm. *Am J Pathol.*, **140**: 959-969, 1992
- 7) Simpson, C. F., Kling, J. M., Palmer, R. F.: Beta-aminopropionitrile-induced dissecting aneurysms of turkeys: treatment with propranolol. *Toxicol Appl Pharmacol.*, **16**: 143-153, 1970
- 8) Kanematsu, Y., Kanematsu, M., Kurihara, C., Tsou, T. L., *et al.*: Pharmacologically induced thoracic and abdominal aortic aneurysms in mice. *Hypertension.*, **55**: 1267-1274, 2010
- 9) Jia, L. X., Zhang, W. M., Zhang, H. J., Li, T. T., *et al.*: Mechanical stretch-induced endoplasmic reticulum stress, apoptosis and inflammation contribute to thoracic aortic aneurysm and dissection. *J Pathol.*, **236**: 373-383, 2015
- 10) LeMaire, S. A., Zhang, L., Luo, W., Ren, P., *et al.*: Effect of Ciprofloxacin on Susceptibility to Aortic Dissection and Rupture in Mice. *JAMA Surg.*, **153**: e181804, 2018
- 11) Ishizawa, K., Yamaguchi, K., Horinouchi, Y., Fukuhara, Y., *et al.*: Drug discovery for overcoming chronic kidney disease (CKD): development of drugs on endothelial cell protection for overcoming CKD. *J Pharmacol Sci.*, **109**: 14-19, 2009
- 12) Izawa-Ishizawa, Y., Imanishi, M., Zamami, Y., Toya, H., *et al.*: Development of a novel aortic dissection mouse model and evaluation of drug efficacy using *in-vivo* assays and database analyses. *J Hypertens.*, **37**: 73-83, 2019
- 13) Le, N. T., Takei, Y., Izawa-Ishizawa, Y., Heo, K. S., *et al.*: Identification of activators of ERK5 transcriptional activity by high-throughput screening and the role of endothelial ERK5 in vasoprotective effects induced by statins and antimalarial agents. *J Immunol.*, **193**: 3803-3815, 2014
- 14) Ishizawa, K., Yoshizumi, M., Kawai, Y., Terao, J., *et al.*: Pharmacology in health food: metabolism of quercetin *in vivo* and its protective effect against arteriosclerosis. *J Pharmacol Sci.*, **115**: 466-470, 2011
- 15) Kondo, M., Izawa-Ishizawa, Y., Goda, M., Hosooka, M., *et al.*: Preventive Effects of Quercetin against the Onset of Atherosclerosis-Related Acute Aortic Syndromes in Mice. *Int J Mol Sci.*, **21**: 7226, 2020

## *Drug evaluation using pharmacologically induced aortic dissection prone model mice*

*Yuki Izawa-Ishizawa<sup>1)</sup>, Mitsuhiro Goda<sup>2)</sup>, Fuka Aizawa<sup>3)</sup>, Yoshito Zamami<sup>3,4)</sup>, Hirofumi Hamano<sup>4)</sup>, Kenta Yagi<sup>2)</sup>, Yasumasa Ikeda<sup>1)</sup>, Keisuke Ishizawa<sup>3,4)</sup>, and Toshiaki Tamaki<sup>5)</sup>*

<sup>1)</sup>*Department of Pharmacology, Tokushima University Graduate School of Biomedical Sciences, Tokushima, Japan*

<sup>2)</sup>*Clinical Research Center for Developmental Therapeutics, Tokushima University Hospital, Tokushima, Japan*

<sup>3)</sup>*Department of Pharmacy, Tokushima University Hospital, Tokushima, Japan*

<sup>4)</sup>*Department of Clinical Pharmacology and Therapeutics, Tokushima University Graduate School of Biomedical Sciences, Tokushima, Japan*

<sup>5)</sup>*Anan Medical Center, Tokushima, Japan*

### SUMMARY

Aortic dissection (or dissecting aortic aneurysm) is a condition in which the aortic wall is separated into two layers at the medial level to form a pseudocavity. The intima crack, called the “entry”, allows blood to tear through the medial layer and flow in. The location of the “entry” and the extent of the dissection can cause a variety of serious complications, including rupture, cardiac tamponade, and obstruction of branched vessels. According to the Guideline on Diagnosis and Treatment of Aortic Aneurysm and Aortic Dissection 2020, it is estimated that 61.4% of the onset of dissection die before arrival at the hospital, and 93% will die within 24 hours after the onset. It has been suggested that the morbidity rate has been increasing in recent years. Since many of them have a fatal prognosis, it is an important issue to prevent the onset itself. However, no effective therapeutic agent or preventive strategy has been established so far. The first reason is that it is extremely difficult to design clinical studies because aortic dissection traced the rapid onset and progression. The second is that the pathophysiology and preventive drug search are not sufficiently conducted even at the basic research level. Epidemiologically, the results of the International Registry of Aortic Dissection (IRAD) revealed that aging, hypertension, atherosclerosis, and hereditary connective tissue diseases are risk factors. The aortic aneurysm also shows similar pathological conditions caused by these risk factors. However, one of the major differences between aneurysm and dissection is the presence of aortic intima rupture. Therefore, we attempted to establish a mouse model developing dissection at a high rate by adding the endothelial dysfunction to a pharmacologically induced aortic aneurysm model mouse. Furthermore, we evaluated the efficacy of pitavastatin and several nutrients using our novel model mice and verified its usefulness as a model animal.

Key words : aortic dissection, endothelial dysfunction, statin, polyphenol, large medical databases