

## 大動脈瘤におけるキマーゼの役割 - キマーゼ阻害薬による大動脈瘤進展抑制効果について -

常深孝太郎<sup>1</sup> 高井 真司<sup>2</sup> 西本 昌義<sup>1</sup> 金 徳男<sup>2</sup> 阪口 真人<sup>2</sup>  
 澤田 吉英<sup>1</sup> 湯田 淳<sup>1</sup> 佐々木進次郎<sup>1</sup> 宮崎 瑞夫<sup>2</sup>

**要 旨**：大動脈瘤におけるキマーゼの役割を検討する目的で、ハムスターを用いた大動脈瘤モデルの経時的変化を検討し、さらに、キマーゼ阻害薬を用い、大動脈瘤とキマーゼの関係について検討した。その結果、実験モデルにおいて、術後14日目でキマーゼ活性の有意な上昇( $P<0.001$ )と大動脈径の有意な拡大( $P<0.001$ )を認めた。さらに、同モデルを用いて、キマーゼ阻害薬内服処置を行った結果、キマーゼ活性は有意に抑制( $P<0.05$ )され、さらに、大動脈径の拡大をも抑制( $P<0.001$ )した。このことは、キマーゼが大動脈瘤進展において重要な役割を果たしている可能性を示唆し、さらに、キマーゼ阻害薬により、大動脈瘤進展を抑制できる可能性を示唆するものと考えられる。(J. Jpn. Coll. Angiol., 2003, 43: 749-754)

Key words: Aortic aneurysm, Angiotensin II, Chymase, Chymase inhibitor

### はじめに

大動脈瘤は、中膜弾性線維の高度な破壊・消失を病理学的特徴としており、その機序に外膜側における慢性的炎症性変化が関与することが報告されている<sup>1-5</sup>。近年、その破壊・消失および大動脈瘤進展におけるマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)9の関与について多く報告がなされている<sup>1,5-8</sup>。一方で、MMP-9は、アンジオテンシン(Ang II)や、セリンプロテアーゼの一つであるキマーゼを介し、活性化されることが明らかとなってきた<sup>9-11</sup>。

組織におけるAng IIは、心血管ではリモデリングに関与していることが知られるようになってきた。最近では、組織Ang IIはアンジオテンシン変換酵素(ACE)ばかりでなく、キマーゼによっても変換されていることが知られている<sup>11</sup>。内皮細胞に存在しているACEに対して<sup>12</sup>、キマーゼは、正常時には肥満細胞に存在し、炎症などの刺激により脱顆粒・活性化し、Ang IをAng IIに変換する<sup>11</sup>。キマーゼの働きには種差が存在し、ヒトやハムスターではAng IをAng IIに変換するが、ラットではキマーゼはAng Iを不活化する<sup>11</sup>。

われわれは、これまでに血管壁におけるキマーゼ産

生Ang IIとさまざまな病態の関連について検討を行ってきた<sup>11-15</sup>。さらに、血管壁Ang II産生機構とヒト大動脈瘤の関係についての検討も行い、ヒト大動脈瘤壁外膜において、キマーゼとキマーゼ産生Ang IIの有意な活性の亢進が認められることを示し、この活性亢進が大動脈瘤進展において重要な役割を果たしている可能性を示してきた<sup>16-18</sup>。しかしながら、大動脈瘤とAng IIの関係を示唆する実験は散見されるのみである<sup>4,19</sup>。

そこでわれわれは、ヒトと同様のAng II産生酵素を有するハムスターを用いて、大動脈瘤実験モデルを作製し<sup>20-21</sup>、Ang II産生酵素であるACEとキマーゼの大動脈瘤進展における役割についての検討を行った。

### 対象と方法

#### 1. ハムスター大動脈瘤実験モデル作製法

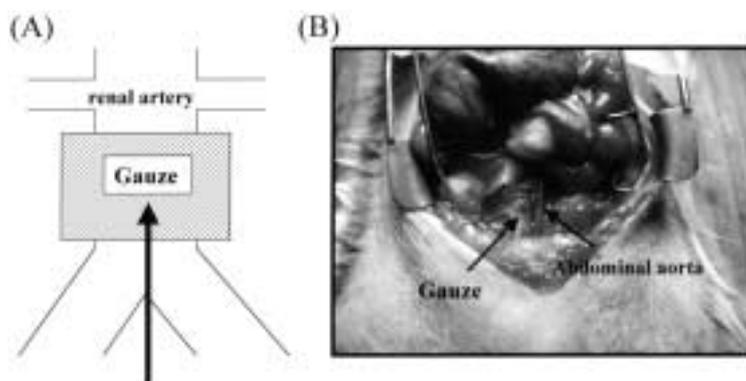
動物モデルにおけるすべての実験が、大阪医科大学動物研究所のガイドラインに従い遂行された。

雄性シリアンハムスター(180~210g)を用いた。ペントバルビタール(50mg/kg)を用いて腹腔内麻酔下に開腹し、腎動脈分岐部以下の腹部大動脈を露出して、腹部大動脈全体をガーゼにより被包した。エラストラーゼ(Type I, SERVA Electrophoresis GmbH) (200単位/ml)を外膜側から30分ごとに計2回ガーゼに浸潤させ、ガー

\* 大阪医科大学薬理学教室

\*\* 大阪医科大学胸部外科

2003年2月7日受付 2003年7月31日受理



**Figure 1** Schematic diagram (A) and performance(B) of elastase-applied procedure in the hamster, as described in methods.

ゼを除去した。対照群では、エラスターゼの代わりに生理的食塩水を浸潤させた( Fig. 1 )。

経時の変化をみるために、術当日( ガーゼ除去後15分の時点)、術後7、14、28日目に再度腹腔麻酔下に開腹し、ノギスを用いて腹部大動脈径を実測した。術後7、14、28日目に関しては大動脈径の実測後、腹部大動脈を摘出し、生化学的、組織学的な検討を行った。

ついで、経時の変化の検討結果に基づき、今回の検討では内服可能であるキマーゼ阻害薬NK3201( 2-( 5-formylamino-6-oxo-2-phenyl-1, 6-dihydropyrimidin-1-yl )-N-[( 3,4-dioxo-1-phenyl-7-( 2-pyridyloxy ))-2-heptyl]acetamide )を用いて、検討を行った。投与法は、術3日前からNK3201 を30mg/kg内服投与を開始し、術後13日目まで投薬し、術後14日目に再開腹した。投薬による大動脈瘤の変化について、同様に大動脈径の変化と生化学的・組織学的な検討を行った。

## 2. 生化学的検討

各サンプルを20mMのリン酸緩衝液( pH 7.4 )を用いてhomogenizeし、その上清液を用いてAng II産生酵素であるACEとキマーゼの酵素活性を測定した。ACE活性は上清液とACE特異的合成基質であるhippuryl-histidyl-leucine ( HHL )との反応の結果遊離してくるhippolic acidを高速液体クロマトグラフィーにて測定した<sup>16-17)</sup>。キマーゼ活性はACE阻害薬( EDTA )存在下で基質Ang Iから産生されるAng II量を蛍光法にて測定した<sup>16-17)</sup>。蛋白量はBCA測定キット( Pierce社 )を用いて測定した<sup>16-17)</sup>。

## 3. 組織学的検討

各サンプルを10%ホルマリン液で固定してパラフィン包埋後、連続切片を作製し、組織構築をElastica van Gieson染色にて検討した。

## 4. 統計処理

すべてのデータはmean±Standard Errorで表しており、統計学的処理には、2群間の比較検討にはStudent's t-testを、3群間の比較検討にはone-way ANOVA、Fisher's PLSDを用い、P<0.05を有意とした。

## 結 果

( 1 )エラスターゼ( 生理的食塩水 )処置直前の腹部大動脈径を100%として、術当日、術後7日目、14日目、28日目の大動脈径は、エラスターゼ処置群では157.6±2.6%、184.8±6.3%、183.3±6.0%、168.0±3.3%と、対照群( 術当日；123.0±2.4%、術後7日目；127.2±4.9%、術後14日目；122.4±4.3%、術後28日目；106.5±3.1 )に比べて、有意に拡大していた( P<0.001 )( Fig. 2 )。

( 2 )ハムスターの無処置腹部大動脈におけるACE活性、キマーゼ活性はそれぞれ0.31±0.03mU/mg、0.58±0.06mU/mgであった( Fig. 3 )。

( 3 )ACE活性はエラスターゼ処置群では術後7、14、28日目にそれぞれ1.85±0.48mU/mg、3.55±0.44mU/mg、8.48±0.81mU/mgと対照群( 術後7日目；0.34±0.04mU/mg、術後14日目；0.58±0.02mU/mg、術後28日目；0.48±0.04mU/mg )に比べ有意に上昇していた( P<0.05 )( Fig. 3 )。

(4)キマーゼ活性はエラスターゼ処置群では術後7, 14, 28日目にそれぞれ2.09±0.34mU/mg, 3.44±0.62mU/mg, 4.80±0.94mU/mgと対照群(術後7日目; 0.29±0.02mU/mg, 術後14日目; 0.35±0.10mU/mg, 術後28日目; 0.53±0.07mU/mg)に比べ有意に上昇していた(P<0.05)(Fig. 3)。

(5)組織学的検討では, エラスターゼ処置群では, 高度の弾性線維の破壊像が認められたが, 対照群のそれは正常群とほぼ変化はみられなかった(Fig. 4)。

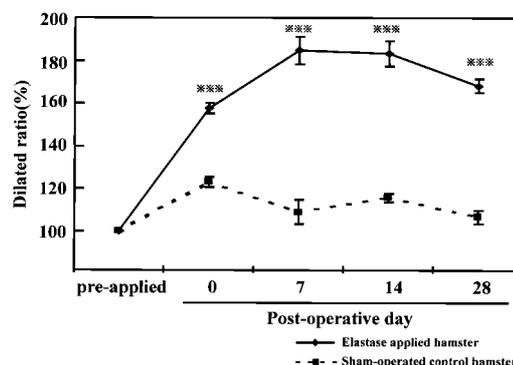
(6)キマーゼ阻害薬投薬群の大動脈径は, 術当日は153.5±3.6%とエラスターゼ処置群と有意差は認めなかったが, 術後14日目の大動脈径は124.7±3.7%とエラスターゼ処置群に比べ, 有意に縮小を認めた(P<0.001)(Fig. 5)。また, キマーゼ阻害薬投薬群の大動脈径の変化は術当日と比べ, 術後14日目で有意に拡大は抑制されていた(P<0.001)。

(7)キマーゼ阻害薬投薬群では, キマーゼ活性は2.027±0.309mU/mgで, エラスターゼ処置群と比べ, 有意に抑制されていた(P<0.05), ACE活性(3.302±0.144mU/mg)に有意差は認めなかった(P=0.57)(Fig. 6)。

(8)キマーゼ阻害薬投薬群において, 弾性線維はエラスターゼ処置群同様に破壊像が認められた(Fig. 4)。

### 考 案

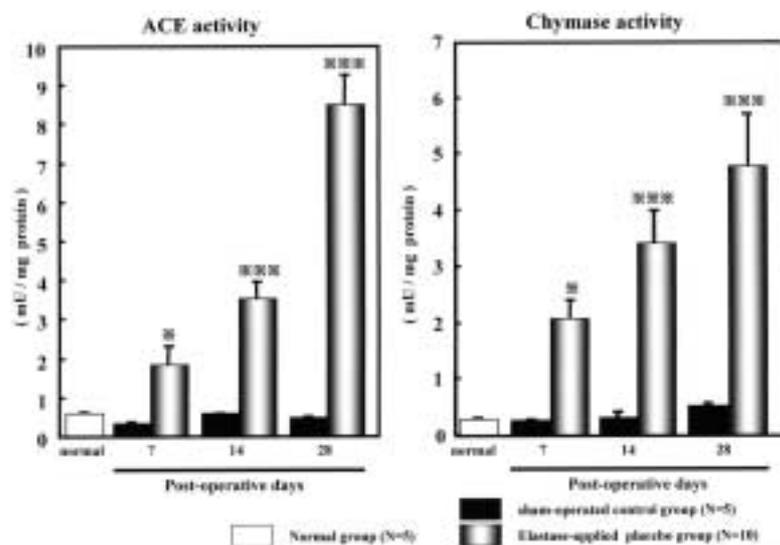
本研究において, われわれは, 大動脈瘤実験モデルにおいて, ヒト大動脈瘤壁と同様に<sup>16-18)</sup>, 血管壁の



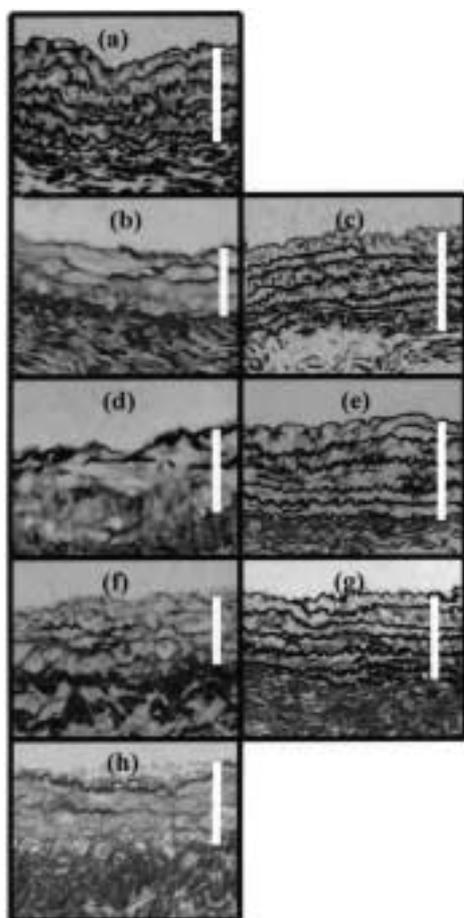
**Figure 2** Development of elastase-applied abdominal aortic aneurysms in the hamster. The measurement of aortic diameter following transient treatment with elastase expressed as increase by percentage points between the pre application and final aortic diameter. Each point represents the mean ±S.E.M. (P<0.001 versus the sham operated control group, Student's t test)

ACEおよびキマーゼの活性が亢進していることを確認した。さらに, キマーゼ阻害薬を投薬することで, キマーゼ, またはキマーゼによるAng II産生の増加が大動脈瘤進展に関与することが示された。

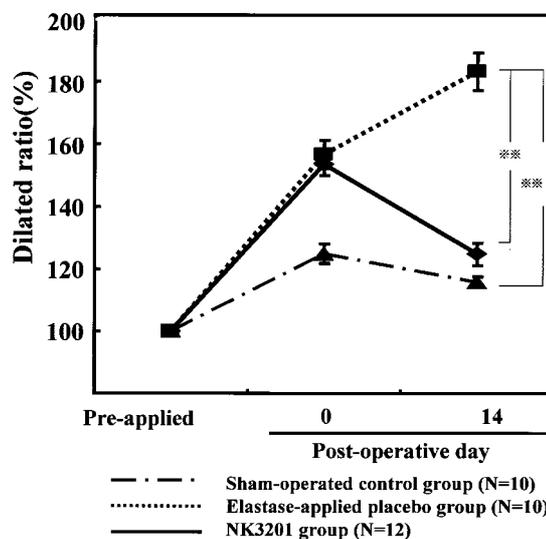
本研究において作成したモデルを用い, 経時的変化を検討すると, Ang II産生酵素であるACEおよびキマーゼの活性は, 術後7日目より亢進し, 術後14日目, そして, 術後28日目ではさらに亢進している。レニン・アンジオテンシン系の最終活性物質であるAng IIは, 1)血管内皮細胞障害<sup>22)</sup>, 2)平滑筋細胞の遊走・増殖<sup>22)</sup>,



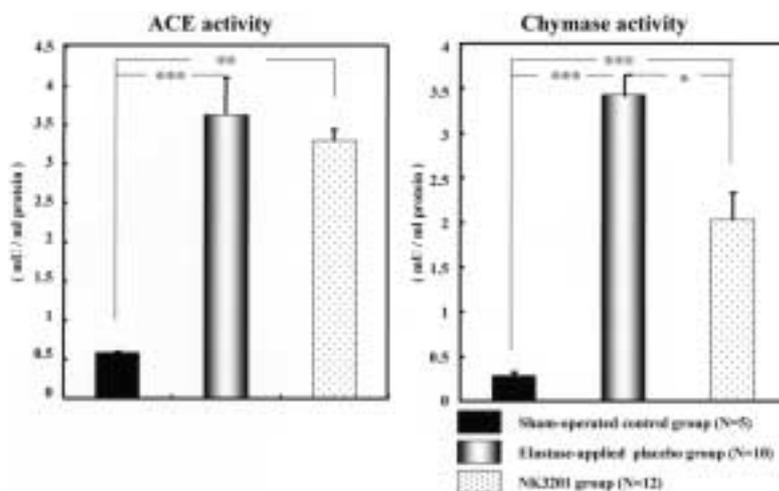
**Figure 3** Each bar shows the transition of the levels of ACE and chymase activities. P<0.001 and P<0.05 vs each placebo group or normal group. There are no significant changes between normal group and each sham-operated control group. (Student's t test)



**Figure 4** Characteristics of aortic tissue in hamster abdominal aorta. Sections are stained with elastica van Gieson. The histological findings: (a) normal aorta, (b)(d)(f) elastase-applied placebo aorta on days 7, 14, 28 after the operation, respectively, (c)(e)(g) sham-operated control aorta on days 7, 14, 28 after the operation, respectively, (h) chymase inhibitor treated aorta on day 14 after the operation. White bar is tunica media.



**Figure 5** The decreased aortic dilatation treated with NK3201 on days 14 after the operation.  $P < 0.01$  versus Elastase-applied placebo hamster. (Fisher's PLSD)



**Figure 6** Effects of NK3201 on aneurysmal aortas. Each bar represents the mean  $\pm$  S.E.M.. The chymase activity in NK3201 group was significantly suppressed compared with that of elastase-applied group ( $P < 0.05$ ), although there was no significant changes in the ACE activity. (  $***$  :  $P < 0.001$ ,  $**$  :  $P < 0.01$ ,  $*$  :  $P < 0.05$ , Fisher's PLSD)

3)細胞外マトリックスの増加<sup>22-23)</sup>, 4)成長因子, サイトカインの発現調節<sup>24)</sup>, 5)接着因子, 化学走化因子の発現<sup>25)</sup>, 6)マクロファージの活性化<sup>25)</sup>, 7)酸化ストレスの増強<sup>26)</sup>, などの炎症の病態を形成する作用が認められている。Ang IIがリモデリングに関与していること<sup>22-26)</sup>, 本実験における大動脈瘤実験モデルの酵素活性の変化から, このモデルにおいて, 大動脈径の拡大が続かない状態であるのに, Ang II産生酵素であるACEとキマーゼの活性が亢進し続けるのは, Ang IIによる血管壁の破壊の状態が限界に達しているが, 血管内では破壊機序のリモデリングが続き, 最終的に破綻(破裂)への継続と結びつくと考えられる。

Ang IIと大動脈瘤の関係については, 実験的には, Daughertyらは, Ang IIの持続的注入により, 大動脈瘤は形成され<sup>4,19)</sup>, Ang II タイプ1 受容体拮抗薬であるロサルタンの投薬でその形成は抑制されたと報告している<sup>19)</sup>。大動脈瘤進展の機序に外膜側における慢性的炎症性変化が関与すること<sup>1-5)</sup>とヒト大動脈瘤壁による各酵素の亢進<sup>16-18)</sup>, Daughertyらの結果<sup>4,19)</sup>から, この炎症性変化をAng IIが増悪させている可能性が考えられる。

本研究で用いたキマーゼ阻害薬NK3201を用いて, われわれが行ったさまざまな検討では, NK3201は, ACE活性を抑制することなく, 血管を含めた組織におけるキマーゼ活性の著明な抑制を示した<sup>14-15)</sup>。今回の検討においても, ACE活性を抑制せず, キマーゼ活性のみを抑制し, さらに, 大動脈径の有意な拡大の抑制が示された。しかしながら, 組織学的には弾性線維の破壊像が著明であるにもかかわらず, 大動脈径の有意な拡大の抑制が認められたことは, 大動脈瘤の進展機序において, 弾性線維の破壊だけでなく, キマーゼやキマーゼ産生Ang IIなどの破壊機序を進行させる物質の活性亢進が重要な因子となることを示唆するものである。

最近の報告では, Ang IIがMMP-9を活性化するという報告がみられる<sup>10)</sup>。一方, キマーゼはAng IからAng IIへの変換以外にも, MMP-9の活性化や<sup>11)</sup>, MMP阻害物質であるTIMP(Tissue inhibitor of MMP)を分解する<sup>27)</sup>ことが報告されている。Elmoreらは, 正常大動脈においてはMMP-9とTIMPはバランスよく存在しているが, 大動脈瘤進展時には, アンバランスが生じていると報告しており<sup>8)</sup>, そのバランスの崩れはキマーゼ自体の活性化, またはキマーゼにより変換されたAng IIにより引き起こされている可能性も考えられる。

キマーゼ, ACE, Ang II, MMP-9などの関連について, 今後のさらなる詳細な検討が必要であるが, 今回の検討から, キマーゼは大動脈瘤の進展に深く関与している可能性が示唆された。さらに, キマーゼ阻害薬は大動脈瘤の進展予防薬として有用である可能性をも示唆するものである。

## 結 論

われわれはヒト大動脈瘤壁を解析して得られた結果から<sup>16-18)</sup>, ヒトと同様のAng II産生機構を有するハムスターを用いた実験モデルを作製し, ヒト大動脈瘤と同様のACE活性, キマーゼ活性の亢進が認められることを確認した。さらに, キマーゼ阻害薬を内服させることで, キマーゼ, またはキマーゼ産生Ang IIが大動脈瘤進展に重要な役割を果たしていることを示した。

## 文 献

- 1) Freestone T, Turner RJ, Coady A et al: Inflammation and matrix metalloproteinases in the enlarging abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*, 1995, **15**: 1145-1151.
- 2) Anidjar S, Dobrin PB, Eichorst M et al: Correlation of inflammatory infiltrate with the enlargement of experimental aortic aneurysms. *J. Vasc. Surg*, 1992, **16**: 139-147.
- 3) White JV, Haas K, Phillips S et al: Adventitial elastolysis is a primary event in aneurysmal formation. *J. Vasc. Surg*, 1993, **17**: 371-381.
- 4) Daugherty A, Manning MW, Cassis LA: Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice. *J. Clin. Invest*, 2000, **105**: 1605-1612.
- 5) 渡辺徹雄, 澤井高志, 佐藤 成他: 腹部大動脈瘤におけるMatrix metalloproteinases(MMP-2とMMP-9)の発現と中膜弾性線維崩壊との関連 マッピングを用いた検討 . *日血外会誌*, 2000, **9**: 539-544 .
- 6) McMillan WD, Tamarina NA, Cipollone M et al: Size matters; The relationship between MMP-9 expression and aortic diameter. *Circulation*, 1997, **96**: 2228-2232.
- 7) Pyo R, Lee JK, Shipley JM et al: Targeted gene disruption of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) suppresses development of experimental abdominal aortic aneurysms. *J. Clin. Invest*, 2000, **105**: 1641-1649.
- 8) Elmore JR, Keister BF, Franklin DP et al: Expression of matrix metalloproteinases and TIMP in human abdominal aortic aneurysms. *Ann. Vasc. Surg*, 1998, **12**: 221-228.
- 9) Fang KC, Raymond WW, Blount JL et al: Dog mast cell  $\alpha$ -chymase activates progelatinase B by cleaving the Phe<sup>88</sup>-Gln<sup>89</sup> and Phe<sup>91</sup>-Glu<sup>92</sup> bonds of the catalytic domain. *J. Biol.*

- Chem, 1997, **272**: 25628-25635.
- 10) Rouet-Benzineb P, Gontero B, Dreyfus P et al: Angiotensin II induced nuclear factor- $\kappa$ B activation in cultured neonatal rat cardiomyocytes through protein kinase C signaling pathway. *J. Mol. Cell. Cardiol*, 2000, **32**: 1767-1778.
  - 11) Miyazaki M, Takai S: Role of chymase on vascular proliferation. *J. Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst*, 2000, **1**: 23-26.
  - 12) Okunishi H, Miyazaki M, Okamura T et al: Different distribution of two types of angiotensin II-generating enzymes in the aortic wall. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 1987, **149**: 1186-1192.
  - 13) Miyazaki M, Sakonjo H, Takai S: Anti-atherosclerotic effect of an angiotensin converting enzyme inhibitor and an angiotensin II antagonist in Cynomolgus monkeys fed a high-cholesterol diet. *Br. J. Pharmacol*, 1999, **128**: 523-529.
  - 14) Takai S, Jin D, Nishimoto M et al: Oral administration of a specific chymase inhibitor, NK3201, inhibits vascular proliferation in grafted vein. *Life Sci*, 2001, **69**: 1725-1732.
  - 15) Okamoto Y, Takai S, Miyazaki M: Oral administration of a novel chymase inhibitor, NK3201, prevents peritoneal adhesion formation in hamsters. *Jpn. J. Pharmacol*, 2002, **90**: 94-96.
  - 16) 常深孝太郎, 高井真司, 西本昌義他: 大動脈瘤壁の各膜別に見た局所アンジオテンシンII産生の検討. *脈管学*, 2002, **42**: 827-834.
  - 17) Tsunemi k, Takai S, Nishimoto M et al: Possible roles of angiotensin II-forming enzymes, angiotensin converting enzyme and chymase-like enzyme, in human aneurysmal aorta. *Hypertens. Res*, 2002, **25** (11): 817-822.
  - 18) Nishimoto M, Takai S, Fukumoto H et al: Increased local angiotensin II formation in aneurysmal aorta. *Life Sci*, 2002, **71**: 2195-2205.
  - 19) Daugherty A, Manning MW, Cassis LA: Antagonism of AT2 receptor augments angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysms and atherosclerosis. *Br. J. Pharmacol*, 2001, **134**: 865-870.
  - 20) Origuchi N, Shigematsu H, Izumiyama N, et al: Aneurysm induced by periarterial application of elastase heals spontaneously. *Int. Angiol*, 1998, **17**: 113-119.
  - 21) 折口信人, 重松 宏: 動脈瘤の発生・進展に関する実験的検討: エラスターゼの外膜および内腔投与モデルの比較. *脈管学*, 2000, **40**: 69-74.
  - 22) Gibbons GH, Dzau VJ: The emerging concept of vascular remodeling. *N. Engl. J. Med*, 1994, **330**: 1431-1438.
  - 23) Williams B, Baker AQ, Gallacher B et al: Angiotensin II increases vascular permeability factor gene expression by human vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, 1995, **25**: 913-917.
  - 24) Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 1993, **362**: 801-809.
  - 25) Hernandez-Presa M, Bustos C, Ortego M et al: Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents arterial nuclear factor-kappa B activation, monocyte chemoattractant protein-1 expression, and macrophage infiltration in a rabbit model of early accelerated atherosclerosis. *Circulation*, 1997, **95** (6): 1532-1541.
  - 26) Yanagitani Y, Rakugi H, Okamura A et al: Angiotensin II type 1 receptor mediated peroxide production in human macrophages. *Hypertension*, 1999, **33** (1 pt. 2): 335-339.
  - 27) Frank BT, Rosall JC, Caughey GH et al: Mast cell tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is cleaved and inactivated extracellularly by  $\alpha$ -chymase. *J. Immunol*, 2001, **166**: 2783-2792.

## The Role of Chymase in Aortic Aneurysm: the Effect of Chymase Inhibitor on the Suppression of the Progression of Aortic Aneurysm

Koutaro Tsunemi<sup>\*\*\*</sup>, Shinji Takai<sup>\*</sup>, Masayoshi Nishimoto<sup>\*\*\*</sup>, Denan Jin<sup>\*</sup>, Masato Sakaguchi<sup>\*</sup>, Yoshihide Sawada<sup>\*\*</sup>, Atsushi Yuda<sup>\*\*\*</sup>, Shinjiro Sasaki<sup>\*\*</sup>, and Mizuo Miyazaki<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Department of Pharmacology, Osaka Medical University, Osaka, Japan

<sup>\*\*</sup>Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Osaka Medical University, Osaka, Japan

**Key words:** Aortic aneurysm, Angiotensin II, Chymase, Chymase inhibitor

To investigate the role of chymase in aortic aneurysm (AA), we prepared a hamster AA model induced by periarterial application of elastase. We examined the role of angiotensin II-forming pathway, as well as, the effect of a novel chymase inhibitor, NK3201, against the progression of AA on the hamster experimental model. 14 days after the operation, the aortic diameter (AD) in the AA group was dilated ( $P < 0.001$ ), and the chymase activity in the AA group was significantly higher ( $P < 0.001$ ), compared with the control group. In the chymase inhibitor-treated (CI) group, the chymase activity was significantly suppressed, compared with that in the AA group ( $P < 0.05$ ). The AD 14 days after surgery in the CI group was reduced compared with that in the AA group ( $P < 0.001$ ). Thus, vascular chymase may play an important role in the progression of AA, and a specific chymase inhibitor, NK3201, which can be administered orally, may suppress the progression of AA. (J. Jpn. Coll. Angiol., 2003, **43**: 749-754)