

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09155

研究課題名(和文) 動脈瘤の進展における石灰化因子OPG・RANKL・TRAILネットワークの解明

研究課題名(英文) Elucidation of OPG-RANKL-TRAIL system in the process of abdominal aortic aneurysm progression

研究代表者

三宅 隆 (Miyake, Takshi)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座准教授

研究者番号：40219746

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：動脈瘤の進展・破裂における血管壁の石灰化の影響を明らかにするために、Osteoprotegerin欠損マウスを用い、塩化カルシウム誘発の大動脈瘤モデルを作成した。Osteoprotegerin欠損マウスでは、著明な動脈瘤の進展と高度な石灰化が見られた。石灰化因子と炎症性因子は相互に作用しており、石灰化の亢進により炎症反応が遷延する可能性が考えられた。また、転写因子NF- κ BまたはRunx2をブロックする核酸医薬デコイは石灰化に伴う血管炎症の有効な治療薬になる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to investigate vascular calcification and its influence on changes in vascular inflammation in the process of aneurysm formation. Deletion of osteoprotegerin increased the severity of CaCl₂-induced mouse abdominal aortic aneurysms. Both osteogenic and inflammatory factors were increased in the aneurysm wall, and vascular calcification is thought to influence vascular inflammation. Inhibition of Runx2 or NF- κ B using nucleic acid drug, decoy oligodeoxynucleotide, in the aneurysm wall protected AAA formation. This therapeutic approach might be useful to treat AAA.

研究分野：医学(循環器外科学)

キーワード：腹部大動脈瘤 石灰化 炎症

1. 研究開始当初の背景

大動脈瘤は血管壁の破壊により動脈が拡張・瘤化する疾患で、破裂した場合の救命率は50%以下と言われている。慢性炎症性の疾患であるが、発症・進展に関わる分子レベルの機序は不明な点が多い。また、小径の大動脈瘤の進展予測因子や新たな治療法の研究・開発が国内外で盛んに行われているが、十分な成果は得られていない。

これらの研究のなかで、動脈瘤と石灰化に関する臨床研究が相次いで報告された。一つは小径大動脈瘤の石灰化が全周の50%を超えると瘤の進展が抑制される報告で、もうひとつは、切迫破裂を含めた破裂例では、瘤径に関係なく石灰化が進行しているとする報告である。内膜側の動脈硬化部に形成された石灰化は内張りの役目として拡大を抑制する。しかし、PETの検討では石灰化が活発な部位では炎症が増強されており、中膜の石灰化は炎症の起点として血管壁の破壊を進行する可能性が考えられた。

我々は血管壁の異所性石灰化の制御因子として Osteoprotegerin (OPG) - Receptor activator of NF κ B ligand (RANKL) - Receptor activator of NF κ B (RANK) システムに注目した。このシステムは破骨細胞の分化・成熟に必須で、骨芽細胞で産生された RANKL が破骨細胞の前駆細胞膜上にある RANK を刺激し、破骨細胞へ分化させる。OPG は主に骨芽細胞で産生され、デコイレセプターとして RANKL に結合し、RANK への刺激をブロックする。OPG、RANKL、RANK は血管内の細胞でも発現しており、特に動脈硬化の進展・石灰化に関与することが報告されている。また、破骨細胞の分化では、RANK の刺激は炎症を制御する転写因子 NF κ B や AP-1 を活性化する。血管の細胞でも同じ反応を示すと考えられ、RANK を発現するマクロファージや平滑筋細胞は RANKL の刺激で炎症性因子を産生し、炎症を持続・増強させる可能性は高い。

RANKL 以外に OPG がデコイレセプターとして抑制する因子が TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) である。TRAIL は癌細胞に発現する TRAIL レセプターと結合してアポトーシスを誘導することから、癌領域を中心に研究が進められている。TRAIL とそのレセプターは平滑筋細胞にも発現し、アポトーシスを誘導する。細胞死のデブリスが核となる石灰化は良く知られており、ヒトでも TRAIL と OPG の発現が中膜石灰化の周囲で確認されている。

これらのことから、中膜石灰化に伴う炎症の進行・持続と平滑筋細胞のアポトーシスといった OPG-RANKL-TRAIL の機能は、臨床研究で報告された石灰化と破裂の関係を良く表すことになる。しかし、動脈硬化の石灰化は冠動脈疾患などの危険因子として認識されているが、中膜石灰化と動脈瘤の関係を分子レベルで解析した報告はこれまでされていない。

2. 研究の目的

動脈瘤破裂の救命率は非常に低い。そのため、多くの因子が進行予測や治療ターゲットとして検討されたが、いまだに満足する結果は得られていない。本研究では、中膜の石灰化が動脈瘤の進展・破裂の重要な因子と考え、OPG-RANKL-TRAIL ネットワークに注目した。OPG はデコイレセプターとして RANKL と TRAIL を抑制する。RANKL は平滑筋細胞を骨芽細胞様に分化させ血管石灰化を引き起こすが、その過程で NF κ B、AP-1 などの炎症性の転写因子を活性化させるので、炎症の起点となる可能性が高い。一方、TRAIL は平滑筋細胞のアポトーシスを誘導する。これらの現象は動脈瘤の病態に一致しており、動脈瘤の発症から進展・破裂に至る新しい分子機序と考えた。本研究では、動脈瘤壁での OPG-RANKL-TRAIL の役割の解明をベースに、石灰化因子を標的分子とした治療法の可能性を検証する。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

血管平滑筋細胞を骨芽細胞様に分化させ、石灰化を誘導する実験系において、石灰化因子あるいは炎症性因子を核酸医薬デコイにより転写レベルで抑制し、石灰化と炎症の関係を検討した。石灰化因子の抑制には、平滑筋細胞を骨芽細胞に分化するマスター転写因子 Runx2 をブロックする Runx2 デコイを使用した。また、炎症の制御には、転写因子 NF κ B に対するデコイを使用している。

12 ウェル培養プレートにヒト血管平滑筋細胞を播種し (Day 1)、24 時間後に FuGENE HD Transfection Regent (Promega) を導入試薬として NF κ B デコイまたは Runx2 デコイ (10nM、30nM) を導入した (Day 2)。24 時間培養後に、過酸化水素を添加した骨芽細胞分化用培地 (Osteogenic Induction Medium, Lonza) に培養液を交換して骨芽細胞様への分化を誘導した (Day 4)。3 日間の培養後に培養液を採取・保存して、分泌蛋白などの解析のため保存した (Day 7)。Day 14 に細胞内カルシウム濃度の測定およびコッサ染色による石灰化沈着を評価した。

(2) 動物実験

動脈瘤形成における動脈石灰化の影響を明らかにするために、中膜石灰化が形成される OPG 欠損マウスで動脈瘤モデルを作製した。

12 および 21 週齢のオス OPG 欠損マウスと野生型 C57BL/6J マウスを用い動脈瘤モデルを作製した。全身麻酔下に開腹、腎動脈下の腹部大動脈周囲を剥離した。この大動脈周囲に 0.5M 塩化カルシウムを 15 分間作用させ、動脈瘤形成を誘発した。対象群は塩化カルシウムの代わりに、生理食塩水を作用させた。

4 週後に摘出した大動脈から大動脈径の測定を行い、組織は機序解析のサンプルとして

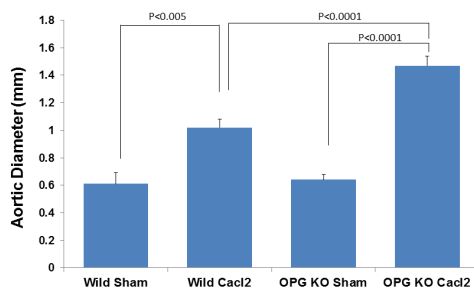
保存した。次に、石灰化および炎症反応の抑制が、動脈瘤の進展に及ぼす影響を検討した。石灰化因子と炎症性因子の制御は培養実験で使用した核酸医薬デコイで行った。塩化カルシウムによるインキュベーションが終了後、生理食塩水で洗浄した大動脈周囲にデコイ (60 ug) を含有させたアテロコラーゲン (導入基材) を留置した。4 週後に摘出サンプルで大動脈径の測定を行い、組織は保存した。

OPG 欠損マウスの動脈瘤形成におけるアンジオテンシン II 全身投与の影響を検討した。OPG 欠損マウスと野生型 C57BL/6J マウスの背部皮下にミニポンプを挿入し、アンジオテンシン II (1.44、4.22 mg/Kg/Day) の全身持続投与を行った。1 週ごとにテイルカフ法で血圧と脈拍を計測した。アンジオテンシン II の影響で血圧が上昇するため、飲水液にヒドララジン (20 mg/Kg/Day) を溶解し、経口投与した。アンジオテンシン II 投与 4 週後に大動脈を摘出し、形態的な評価を行った。

4. 研究成果

大動脈瘤の進展・破裂における血管壁の石灰化の影響を明らかにするために、動脈に石灰化を誘導する OPG-RANKL-TRAIL の役割の解明をベースに、石灰化因子を標的分子とした治療法の可能性を検証した。

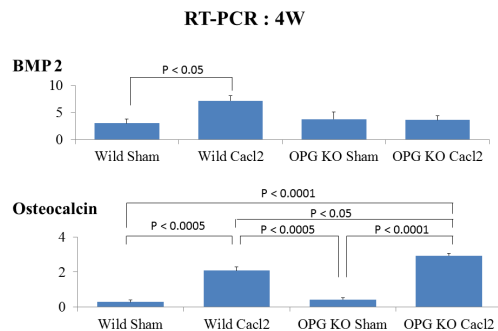
生体内で OPG は石灰化を促進する RANKL と細胞死を誘導する TRAIL を抑制している。そのため OPG 遺伝子を欠損させた OPG 欠損マウスは、中膜の石灰化が加齢とともに進行する。このマウスを用い、塩化カルシウム (CaCl₂) で誘発する腹部動脈瘤モデルを作製した。野生型マウスの動脈瘤に比べ、OPG 欠損マウスでは著明な動脈瘤の進展・拡大を示した。



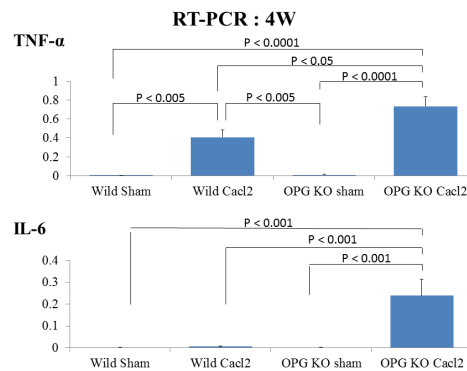
N = 7-15

また、組織検査では野生型マウスは中膜弾性線維の伸展による動脈拡大であったが、OPG 欠損マウスの動脈瘤壁では強い弾性線維の破壊が見られ、中膜の著明な変性による拡張であった。コッサ染色による石灰化の評価では、弾性線維の損傷に一致するように中膜の強い石灰化が認められた。しかし、断裂エラスチンにはカルシウムが沈着しやすいと考

えられており、この石灰化が能動的な変化かどうかを腹部動脈瘤モデルのサンプルを使い検討した。OPG 欠損マウスでは RANKL の発現亢進が認められ、骨芽細胞が産生するオステオカルシンの遺伝子発現は OPG 欠損マウスで有意に上昇していた。しかし、骨芽細胞の分化を誘導する蛋白 BMP2 の遺伝子発現は変化していなかった。この結果から、本モデルでは、動脈瘤の形成に RANKL の過剰発現による石灰化が関与する可能性が示唆されたが、BMP2 以外の経路で骨形成が誘導されると考えられた。



次に、動脈瘤壁の炎症反応について検討した。OPG 欠損マウスでは、外膜側でマクロファージの著明な浸潤を認めた。また、炎症性サイトカイン TNF- α の遺伝子発現は両者とも亢進するが、OPG 欠損マウスでの上昇は有意に高く、インターロイキン 6 (IL-6) は OPG 欠損マウスのみで上昇していた。



血管中膜の破壊を引き起こす分解酵素 MMP-2 と MMP-9 も OPG 欠損マウスで有意に高い活性を示すが、In situ zymography の検討では、シャム群の OPG 欠損マウスでも血管平滑筋細胞の MMP 活性が亢進していた。これらの炎症性因子は転写因子 NF- κ B が制御しており、OPG がブロックする RANKL-RANK-NF- κ B の活性化により炎症性因子の発現プロファイルが修飾されると考えられた。

炎症と石灰化の関係を明らかにするため、血管平滑筋細胞を使った培養実験を行った。血管平滑筋細胞を骨芽細胞分化用培地で培養すると骨芽細胞様に分化する。この培養系で、骨芽細胞分化のマスター転写因子をブロックする Runx2 デコイを平滑筋細胞に導入することで石灰化因子の発現を抑制した。また、炎症を制御する転写因子 NF B に対するデコイにより炎症反応を抑制した。どちらのデコイ投与でも石灰化沈着(コッサ染色)と細胞内カルシウム濃度は低下した。また、石灰化の指標であるオステオカルシンの培養液濃度の低下に加え、炎症性サイトカイン IL-6 の産生抑制も Runx2 デコイと NF B デコイの両導入群で認められた。これらのことから石灰化因子と炎症性因子は相互に作用しあうことで、今回使用した動脈瘤モデルの病態形成に関与すると考えられた。

OPG の欠損によりマウス動脈瘤の進展と瘤壁石灰化が同時に亢進することが分かった。そこで、この動脈瘤モデルに Runx2 デコイと NF B デコイを局所投与し、石灰化あるいは炎症性因子の制御が瘤化に及ぼす影響を検討した。塩化カルシウムを作用させると、OPG 欠損マウスでは著明な瘤形成が見られる。そこで、塩化カルシウム作用後にアテロコラーゲンを導入試薬として血管壁に Runx2 デコイまたは NF B デコイを導入したが、どちらのデコイも動脈瘤の進展抑制効果が見られた。RANKL-RANK-NF B 系で活性化される NF B と塩化カルシウム自体で誘導される NF B 活性の亢進は、NF B デコイで抑制される。一方、RANKL-RANK で誘導される Runx2 の制御により瘤の進展が抑制されることから、骨形成因子をターゲットとした治療法の開発も可能であると考えられた。

従来の研究では、慢性炎症の結果として血管石灰化が誘導されると考えられてきた。しかし、本研究では炎症反応と石灰化は相互に作用しており、石灰化の亢進により炎症反応が遷延する可能性が示唆された。また、核酸医薬デコイには2種類の転写因子を同時にブロックするキメラデコイもあり、NF B と Runx2 をブロックするキメラデコイは石灰化に伴う血管炎症の有効な治療薬になる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三宅 隆 (MIYAKE Takashi)
大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座
准教授
研究者番号：40219746

(2) 研究分担者

森下 竜一 (MORISHITA Ryuichi)
大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座
教授
研究者番号：40291439

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()