

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20898

研究課題名(和文) TGF の新しい役割に着目した、大動脈瘤破裂を誘導するシグナルの解析

研究課題名(英文) TGF β signaling pathways involved in rupture of aortic aneurysms

研究代表者

山城 義人 (YAMASHIRO, Yoshito)

筑波大学・生命領域学際研究センター・助教

研究者番号：70751923

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：上行大動脈瘤のモデル(SMKO)マウスを用いて、TGF 中和抗体を投与し瘤破裂の誘導条件を検討した。投薬開始後、急激な瘤破裂を誘導したため、TGF 中和抗体濃度を調整し、破裂を誘導する条件を確立した。また、横行大動脈縮窄術(TAC)による血管内圧負荷の増大に伴って、アンギオテンシン変換酵素(ACE)、転写因子Egr1 とマトリセルラータンパク質Thrombospondin-1(TSP1)が上行大動脈で発現亢進している事を見出し、これらを機械刺激応答因子と定義した。瘤発生の初期からEgr1, TSP1の発現が亢進するため、機械刺激応答因子が大動脈瘤の形成を促していると推察した。

研究成果の概要(英文)：In the Fln4SMKO (mice model for ascending aortic aneurysm; SMKO) mice, treatment with TGF- neutralizing antibody (1D11) leads to aneurysm rupture. We examined conditions for 1D11 treatment and signaling pathways involved in aneurysm rupture in SMKO mice. First, We considered concentration, administration period for 1D11 treatment and finally established suitable conditions for 1D11 treatment leading rupture. In addition, we found that the expression of ACE (angiotensin converting enzyme), Egr1 (Early growth response-1) and Thrombospondin-1 increased in ascending aorta after TAC procedure, which enhanced mechanical stress in the aorta. Thus, we defined these molecules as mechanical stress response factor and hypothesized that mechanical stress response factor might involved in aneurysm initiation.

研究分野：血管生物学

キーワード：大動脈瘤 TGF メカニカルストレス

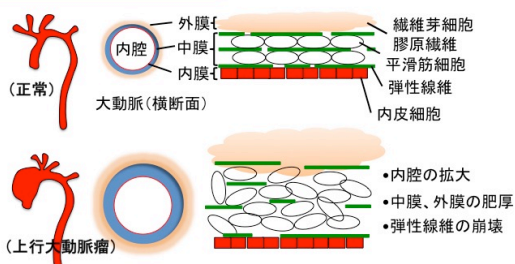
1. 研究開始当初の背景

大動脈瘤は血管壁が異常に拡張する疾患であるが、その発生機序の詳細は未だ不明である。また、大動脈瘤破裂時の死亡率は80%以上と非常に高く、破裂を未然に防ぐ内科的治療法も未だ確立されていない。我が国では、大動脈瘤疾患を有する患者数は年々増加している(大動脈瘤・解離診療ガイドライン 2011 改訂版)。したがって、大動脈瘤破裂の分子メカニズムを解明し、疾患の予防・治療法の開発へと発展させることが急務であると考えられる。

これまでに、マルファン症候群とその近縁疾患である Loey-Dietz 症候群では、大動脈壁における TGFβ の上昇が大動脈瘤の原因として提唱されている(Neptune, *Nature Genet.* 2003 ; Loey, *Nat Genet.* 2005) が、大動脈瘤破裂に関与する TGFβ の役割は明らかになっていない。一方で、細胞外マトリクスの異常や、血管平滑筋細胞の収縮性蛋白質の変異が大動脈瘤を引き起すことも知られている(Judge, *J Clin Invest.* 2004 ; Zhu, *Nature Genet.* 2006)。細胞外マトリクス Fibulin-4 は大動脈の血管壁に多く発現しており、局所的な欠損は皮膚弛緩症や弾性線維の崩壊をもたらす事が報告されている(Huchtagowder, *Am J Hum Genet.* 2006)。

我々の研究室では、Fibulin-4 の血管平滑筋特異的ノックアウト(SMKO)マウスが、上行大動脈瘤を発症する事を報告している(Huang, *Circ Res.* 2010、下図)。病変部では、弾性線維の崩壊と平滑筋細胞の増殖(脱分化)による、中膜の肥厚が観察された。また、病変部ではアンギオテンシン変換酵素(ACE)とそれに続くアンギオテンシン II (AngII) のシグナルが局所的に増加している事、ACE 阻害剤、AngII 1 型受容体(AT1R)拮抗薬

大動脈の構造と動脈瘤の表現型



を用いて上行大動脈瘤の形成が完全に抑

止出来る事を報告している(Huang, *Sci Transl Med.* 2013)。

興味深い事に、SMKO マウスでは自然発生的な大動脈瘤破裂は認められない。しかし、TGFβ シグナルの活性を遮断する neutralizing (中和) 抗体を投与したマウスでは大動脈瘤の発達が亢進し、破裂を誘導する事を見出した。この結果は、TGFβ によって制御される血管壁内のシグナルが大動脈瘤の“維持”に必須である事を示唆している。言い換えると、大動脈瘤病変部において TGFβ を遮断すると、血管壁は破裂する。よって、「TGFβ を介した大動脈壁制御のメカニズム」が大動脈瘤破裂を解明する上で重要な働きをするのではないかという着想に至った。

2. 研究の目的

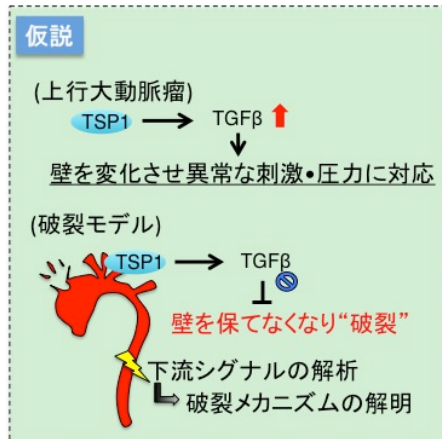
前述の動脈瘤形成機序の研究において、大動脈瘤の発生は血管壁の弾性線維形成時期と密接に結びついており、生後7日目から30日の間に瘤が形成される事がわかっている。本研究は、Fibulin-4 の血管平滑筋特異的ノックアウトマウス(SMKO)を用いて TGFβ シグナルの遮断が引き起す大動脈瘤破裂のメカニズムを、以下の3点に絞り解明する。

- (1) 瘤の破裂誘導をコントロールしうる条件(抗体の至適濃度、投薬開始時期)を検索する。
- (2) TSP1 や collagen、細胞骨格・平滑筋細胞の表現型を制御する蛋白質の発現・局在変化を観察し、TGFβ の遮断が与える大動脈瘤血管壁の変化を捉える。
- (3) 標的分子に対する薬理的阻害実験を行い大動脈瘤破裂を誘導する刺激を特定し、今後の治療法の開発に役立てる。

3. 研究の方法

大動脈瘤が破裂する際には、血管壁内の機械的負荷が増大し、壁の平衡も頂点に達していると考え、大動脈瘤が破裂する“直前”の血管壁内でどのようなシグナルが亢進・抑制し、どのような血管壁変化が瘤破裂を誘導するのかを精査する。まず、瘤破裂誘導の至適条件を検討し、“破裂直前”の時

期を特定する。その時期における、血管壁内の機械的負荷の変化、平滑筋細胞・膠原繊維の変化を解析する。加えて、どのシグナル経路が大動脈瘤血管壁の維持に関与しているのかを特定し、今後の治療法開発へと役立てる。



研究計画 1: 瘤破裂誘導の至適条件、破裂“直前”時期の特定

TGFβ 中和抗体 (1D11) の投与方法や分量は先行研究を参考にする (*J Bone Miner Res*, 2010)。申請者が行った予備実験では、生後 7 日の SMKO マウスに対して 1D11 の濃度を 10 mg/kg BW と設定したが、投薬開始後 30 日以内の急激な破裂誘導を引き起こした(破裂率 89%; 下図)。より個体差を少なくするために抗体の投与量を低濃度 (1.0, 3.0, 5.0 mg/kg BW) で検討し、さらに投薬開始期間を (生後 14 日 (病変形成期)、30 日 (病変確立期)、90 日 (病変慢性期)) で検討することが求められる。血管壁の TGFβ シグナル経路 (p-Smad2/3, p-ERK1/2) が抑制されているかどうかをウェスタン法で検討し、抗体の有効性を確認する。

	Mouse	
ab	CTL	SMKO
CTL	0/6	0/6
1D11	0/4	8/9

Table. TGFβ neutralizing 抗体 (1D11, 10mg/kg BW)処理後の大動脈瘤破裂数の比較。

研究計画 2: 瘤破裂誘導時の血管壁の変化を明らかにする

● 破裂“直前”の血管壁の形態解析

表現型の解析は、組織標本 ; HE 染色 (血管平滑筋)、Hart's 染色 (弾性線維)、Masson-Trichrome 染色 (コラーゲン蛋白質) で精査する。瘤が破裂する直前の血管壁の内周、外周、壁の厚さを横断面にて計測する。また、破裂した後の組織に対して、破裂箇所を特定し、破裂箇所における壁の変化を解析、破裂直前と比較する。

● 破裂“直前”の機械的負荷、平滑筋細胞・膠原繊維の変化を解析

TGFβ シグナルを活性化する機械刺激応答因子 TSP1 の発現・局在が瘤の破裂箇所では局所的に増加しているのではないかと予想されるため、免疫組織染色法を用いて解析する。さらに、前述の大動脈瘤形成機序の研究で同定された細胞骨格調整因子 Slingshot-1, cofilin の発現、リン酸化状態の変化をウェスタン法で確認し、大動脈瘤破裂誘導に関与するか否か検証する。加えて、平滑筋細胞の分化マーカー遺伝子 (SMemb, SM-MHC, Acta2, Myh11, Cnn1, Mlck, Sm22) を用いた定量的 PCR を行い、TGFβ の遮断が平滑筋細胞の表現型に影響を与えるか否かを検証する。さらに、生後 14 日目以降の病変部では機械的負荷への応答として膠原繊維の発現・局在が変化することから、TGFβ 遮断によるその影響を精査する。大動脈瘤の維持に関与すると考えられるこれらの分子を解析する事で、TGFβ の遮断が大動脈瘤破裂を誘導するメカニズムを解明する。

● TSP1-TGFβ を介した大動脈瘤破裂に関与する未知のシグナル分子の解析

大動脈瘤破裂の誘導には機械刺激応答因子の局所的な亢進や、平滑筋細胞・膠原繊維の異常などの変化が予想されるが、研究が当初計画通りに進まない時の対応として、大動脈瘤破裂に関する未知の分子を解析する。破裂する“直前”の上行大動脈瘤を採取し、抗体未処理の上行大動脈瘤との蛋白質の発現差異を、二次元

電気泳動法（2D-DIGE）を用いて解析、質量分析計を用いて分子を同定する。また、同時に DNA マイクロアレイ解析を行う。さらに、同定された分子に対してウェスタン法や RT-PCR 法を用いて結果の検証を行う。

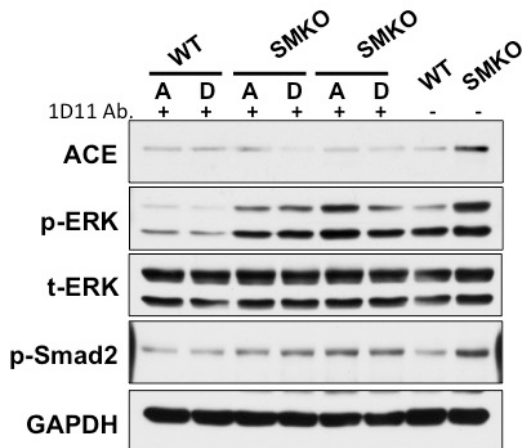
研究計画 3: 標的分子の特定と治療戦略の構築

上記の検討で TGF β を介した大動脈瘤破裂を誘導する分子が明らかになれば、その分子を標的にした薬理的阻害実験を行う。TGF β の遮断によって、コラーゲンの発現・局在が変化しているのであれば、コラーゲンと弾性線維の架橋酵素である Lysyl oxydase を不可逆的に阻害する beta-aminopropionitrile (BAPN) を用いて、TGF β 中和抗体と同様の効果（瘤破裂の誘導）が得られるか検証する。標的分子が平滑筋細胞の表現型に関与、または細胞骨格を制御する分子であれば、PI3K/AKT 阻害剤（Wortmannin, LY294002）, ROCK 阻害剤（Y-27632）を用いる。その他のターゲットに関しては、研究計画 2 の結果次第で適宜対応し、標的分子を特定、今後の治療法の開発に役立てる。

4. 研究成果

(1) 大動脈瘤破裂の条件検討

生後 7 日目の大動脈瘤マウス（SMKO）と野生型マウス（WT）に対して、TGF β 中和抗体（1D11）1mg/kg BW を生後 49 日目まで投与した。大動脈を採取し、左鎖骨下動脈を含む、上行大動脈と大動脈弓部位を(A)、下行大動脈を（D）としてタンパク質を回収し、ウ

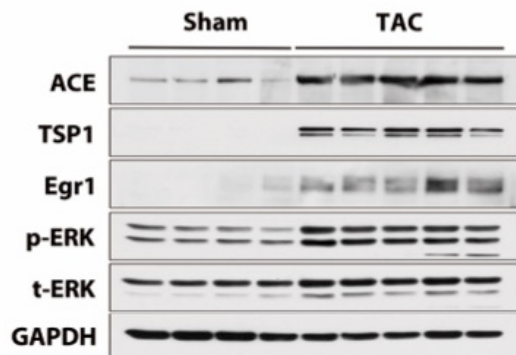


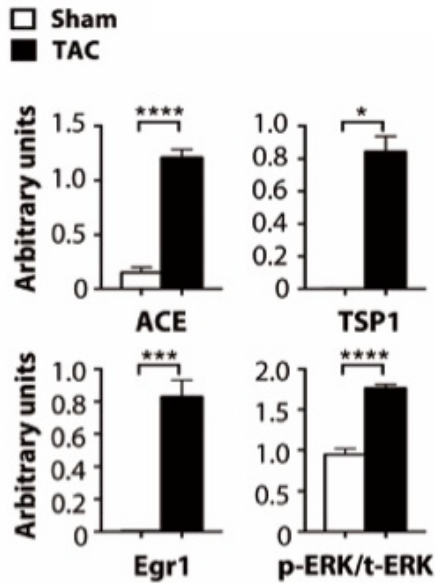
ェスタンプロット法による、アンギオテンシン変換酵素（ACE）、Extracellular signaling regulated kinase（ERK）と TGF β の下流標的分子 Smad のリン酸化状態を解析した。SMKO における ACE の発現、Smad のリン酸化は 1D11 投与により抑制されたが、ERK のリン酸化には影響を与えなかった。投与開始後、急激な瘤破裂を誘導したため、さらに低濃度での破裂誘導条件を検討することが必要であった。また、投与開始期間を生後、14 日目、30 日目の病変形成後に変更する必要性があった。血管壁の変化を組織票本；HE 染色、Hart's 染色、Masson-Tricrome 染色で解析した。これらの詳細は、今現在（2017 年 6 月）論文投稿準備中のため、結果の記載は控える。

(2) 機械刺激応答因子の同定

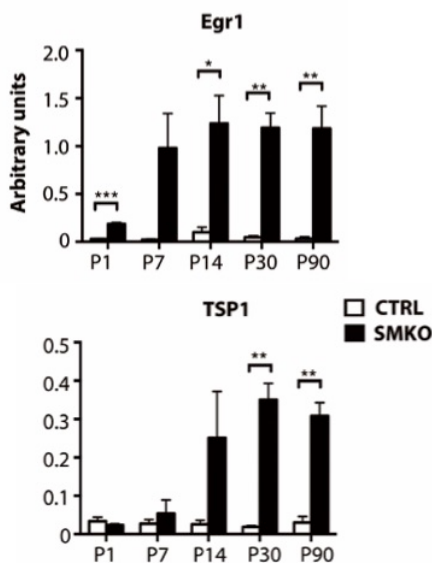
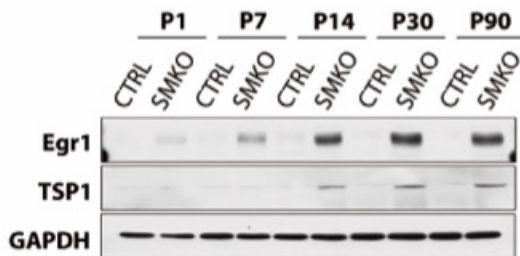
本申請書のメインテーマとは異なるが、解析の途中で血管壁の圧負荷に応答する因子を同定したので、以下に報告する。

生後 8 週齢の野生型マウスに横行大動脈縮窄術（Transverse aortic constriction；TAC）による大動脈の狭窄を 3 週間行った。結果、血管内圧負荷が増大し、心臓の肥大化を引き起こしたが、大動脈瘤破裂には至らなかった。上行大動脈における圧負荷応答を調べる目的で、Sham（非狭窄）と TAC 後の大動脈を採取し、ウェスタンプロット法による下記のタンパク質の発現を解析した。上行大動脈において、アンギオテンシン変換酵素（ACE）、転写因子 Early growth response-1（Egr1）と cell-cell 間、または cell-matrix 間の相互作用を仲介するマトリセルラータンパク質 Thrombospondin-1（TSP1）が TAC により発現亢進している事を見出し、これらを機械刺激応答因子と定義した（下図）。

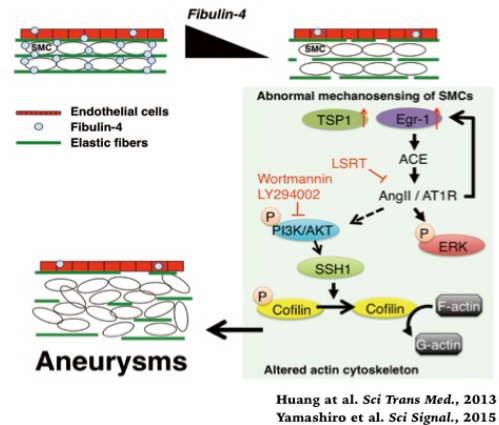




次に、これらの機械刺激応答因子の大動脈瘤血管壁内での発現を解析した。野生型 (CTRL)、大動脈瘤マウス (SMKO) の上行大動脈血管壁における、Egr1 と TSP1 の発現量を解析した (下図)。SMKO マウスにおいて、大動脈瘤は生後 7 日目 (P7) 以降に形成される。TSP 1 は生後 14 日目以降



に亢進するのに対して、Egr 1 は生後 1 日目から発現が更新していることを見出した。Egr1 は TSP1 と ACE のアクチベーターとして知られている事から、Egr1 の亢進が TSP1, ACE の発現を誘導し、大動脈瘤の形成を促していると推察した (下図)。これらの結果は、Science Signaling 誌に掲載されている。(雑誌論文 1)



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

1. **Yamashiro Y**, Papke CL, Kim J, Ringuette LJ, Zhang QJ, Liu ZP, Mirzaei H, Wagenseil JE, Davis EC, Yanagisawa H. Abnormal mechanosensing and cofilin activation promotes the progression of ascending aortic aneurysm in mice. *Sic. Signal.* 8, ra105, 2015. PMID: 26486174
DOI: 10.1126/scisignal.aab3141
2. Papke CL, Tsunozumi J, Ringuette LJ, Nagaoka H, Terajima M, **Yamashiro Y**, Urquhart G, Yamauchi M, Davis EC, Yanagisawa H. Loss of fibulin-4 disrupts collagen synthesis and maturation: Implications for pathology resulting from EFEMP2 mutations. *Hum. Mol. Genet.* 24 (20): 5867-5879, 2015. PMID: 26220971
DOI: 10.1093/hmg/ddv308
3. Papke CL, **Yamashiro Y**, Yanagisawa H. MMP17/MT4-MMP and thoracic aortic aneurysms: OPning new potential for effective treatment. *Circ. Res.* 117: 109-112, 2015. PMID: 26139854
DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.117.306851

[学会発表] (計 6 件)

1. **山城義人** 「血管壁の機械刺激応答と病態形成を誘導するシグナル分子の解析」
“**第 11 回 Vascular Biology Innovation Conference**” 8 月 20-21 日、ホテル椿山荘東京 (東京都・文京区)、2016
2. **山城義人** 「上行大動脈瘤におけるメカニカルストレス応答因子の解析」
“**第 48 回日本結合組織学会**” 6 月 24-25 日、長崎大学医学部 (長崎県・長崎市)、2016
3. **山城義人** 「血管壁とメカニカルストレス」
“**第 2 回日本血管生物医学会若手の会**” 3 月 4-5 日、東北大学加齢医学研究所 (宮城県・仙台市)、2016
4. **山城義人** 「上行大動脈瘤マウスモデルから得た知見」
“**第 12 回日本エラスチン研究会**” 12 月 4-5 日、アルカディア市ヶ谷 (東京都・千代田区)、2015
5. **Yamashiro Y.** 「Abnormal mechanosensing and cofilin activation promotes the progression of ascending aortic aneurysm in mice」
“**Gordon Research Seminar: Elastin, Elastic fibers & Microfibrils**” July 25-31 in Biddeford, USA, 2015.
6. **山城義人** 「上行大動脈瘤マウスモデルの解析：メカニカルストレス応答と細胞骨格のリモデリング」
“**第 8 回大動脈分子病態研究会**” 8 月 20 日、久留米大学筑水会館 (福岡県・久留米市)、2015

[その他]

ホームページ等

<http://saggy mouse.tara.tsukuba.ac.jp/>

[受賞]

- ①日本血管生物医学会 若手研究奨励賞
- ②日本心臓財団 (研究奨励賞)
- ③稲盛財団 (研究奨励賞)
- ④日本血管生物医学会若手の会 (優秀プレゼンテーション賞)
- ⑤日本結合組織学会 (若手研究奨励賞)
- ⑥日本応用酵素協会 (若手研究助成)
- ⑦日本応用酵素協会 VBIC (優秀プレゼンテーション賞)
- ⑧Molecular Cardiovascular Conference II (ベストポスターセッション賞)

[メディアへの掲載状況]

- ・筑波大学広報 (注目の研究)
<http://www.tsukuba.ac.jp/attention-research/p201510210300.html>
- ・QLife Pro 医療ニュース
<http://www.qlifepro.com/news/20151023/identify-the-signaling-pathways-involved-in-the-formation-of-aortic-aneurysm.html>
- ・参天メディカルチャンネル
<https://www.santen.co.jp/medical-channel/op/medicalnews/2015/1023-identify-the-signaling-pathways-involved-in-the-formation-of-aortic-aneurysm.html>
- ・サイエンスシグナリングに載った日本人研究者 (コスモバイオ株式会社発行)
http://www.sciencemag.jp/files/Japanese_Scientists_Signaling2015.pdf

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山城 義人 (Yoshito Yamashiro)
筑波大学・生命領域学際研究センター・助教
研究者番号：70751923

(2) 研究協力者

柳沢 裕美 (Hiromi Yanagisawa)
筑波大学・生命領域学際研究センター・教授
研究者番号：40746301