

令和元年6月7日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05425

研究課題名(和文) マクロファージ機能の選択的制御による新たな大動脈瘤退縮治療法の開発

研究課題名(英文) Pharmacotherapy development for aortic aneurysm by regulating macrophage function

研究代表者

吉村 耕一 (YOSHIMURA, Koichi)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授(特命)

研究者番号：00322248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：大動脈瘤は動脈壁の脆弱化によって径が拡大し、ついには破裂死に至る疾患である。大動脈瘤の治療法は外科的治療に限られているため、病態解明に基づく薬物療法の開発が待ち望まれている。本研究において、シグナル分子focal adhesion kinase (FAK)が、マクロファージの機能を炎症促進性に制御することによって大動脈瘤病態を増悪させる重要な鍵分子であることを発見した。さらに、大動脈瘤を発症したモデル動物にFAK阻害剤(PF573228)を投与し、一旦出来た小径大動脈瘤の進展を完全に阻止することに成功した。FAKは大動脈瘤の新しい治療標的として期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究における大動脈瘤の新たな病態機序の発見は、大動脈瘤の薬物治療法開発に繋がる可能性が高い。すなわち、FAK阻害療法が今後実用化されれば、多くの大動脈瘤患者が無侵襲に治療可能となり、患者予後の改善が期待される。また、大動脈瘤のみならず広く慢性炎症性疾患に対して、感染症の危険性の少ない新たな作用機序の抗炎症薬の提供に繋がる。

研究成果の概要(英文)：Despite recent improvements in therapeutic options, pharmacotherapy for abdominal aortic aneurysm (AAA) has yet to be achieved. We have investigated the role of focal adhesion kinase (FAK), a major mediator of integrin signaling pathways, in the pathogenesis of AAA. We found that FAK was highly activated in AAA wall specimens. Activated FAK was mostly localized to macrophages in the AAA walls. FAK inhibitor PF573228 significantly reduced levels of inflammatory molecules. We created the mouse model of AAA by periaortic application of CaCl₂. Treatment of mice with PF573228 significantly reduced inflammatory cell infiltration and disruption of the elastic lamellae, and prevented the progression of AAA. FAK represents a novel therapeutic target for the treatment of AAA.

研究分野：心臓血管外科学

キーワード：大動脈瘤 マクロファージ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 大動脈瘤の主病態は、浸潤・集積したマクロファージによる炎症増幅と組織破壊である。マクロファージ抑制により瘤の炎症病態を是正することができれば、瘤壁組織の治癒を促す可能性は高い。しかし、免疫抑制・感染症が一方で懸念される。研究代表者は、炎症増幅と組織破壊に関わるマクロファージの病的機能のみを選択的に制御することを着想し、そのための標的分子として focal adhesion kinase (FAK、接着斑キナーゼ) に着目した。

(2) ヒト大動脈瘤の原因は未だに不明であるが、壁脆弱化を来し瘤拡大に関与する病態は、慢性炎症の持続と組織破壊の亢進である。モデル動物の瘤発症が防止されたとの報告は少なからずあるが、大動脈瘤薬物療法の実用化には至っていない(引用文献)。薬物療法実現のために克服すべき課題は二つある。第一に、現在用いられている動物モデルは発症過程ではなく、病態が進行して瘤が拡大する過程の再現である。したがって、一旦発症した瘤の進行阻止の実証が重要である。第二に、瘤の主病態は免疫細胞並びに免疫系分子に関わる慢性炎症である。無論、免疫系は治療標的になり得るが、同時に免疫抑制の副作用が懸念されるため、正常な生体防御機能は保持し、瘤組織における病的機能異常のみ選択的に制御することが求められる。

(3) 研究代表者は一旦形成されたマウス大動脈瘤に対し、ストレス応答性シグナル分子 JNK の阻害療法を施し、瘤の進行阻止のみならず、退縮治癒を促進し得ることを世界で初めて実証した(引用文献)。しかし、JNK は免疫応答にも関わるため、理論上 JNK の包括的な抑制は免疫抑制のリスクを伴うと推測される。研究代表者は、瘤病変部に特異な JNK 活性化機序を探索した結果、周囲の細胞外基質から受ける刺激が FAK を介して JNK を活性化し、瘤壁細胞の炎症応答を惹起することを発見した(引用文献)。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、FAK が瘤壁マクロファージの病的機能異常を選択的に制御する分子機構を解明し、FAK を標的とする有効かつ安全な大動脈瘤治療法を新たに創出することである。

3. 研究の方法

(1) 大動脈瘤進展時におけるマクロファージ集積と FAK 活性亢進を明らかにするために、手術症例から大動脈瘤壁組織を入手し、マクロファージ浸潤程度並びに FAK 活性、炎症系分子 MCP-1 等及び細胞外基質分解系分子 MMP-9 等を解析した。さらに、野生型雄マウス(C57BL/6)を用い、0.5M CaCl_2 局所刺激により6週間で徐々に形成される腹部大動脈瘤モデルを作製し、 CaCl_2 刺激前と刺激後の大動脈組織を経時的に採取し、マクロファージ浸潤程度並びに FAK 活性、炎症系分子 MCP-1 等及び細胞外基質分解系分子 MMP-9 等を解析した。

(2) 瘤進展に関わるマクロファージの機能異常が FAK 活性依存性であることを明らかにするために、野生型雄マウス腹腔由来のマクロファージを採取し、FAK 活性亢進のために炎症性サイトカイン TNF- α を添加し、FAK 活性抑制のために低分子化合物である FAK 阻害剤 PF573228 または FAK inhibitor 14 を添加、あるいは FAK 低分子干渉 RNA をレンチウイルスベクター(LV)により細胞に導入し、FAK 蛋白発現・活性の定量、炎症系分子 MCP-1 等、細胞外基質分解系分子 MMP-9 等を解析した。さらに、野生型雄マウスを用いて、0.5M CaCl_2 局所刺激による腹部大動脈瘤モデルを作製した。 CaCl_2 刺激後3週目に、FAK 阻害剤 PF573228 または Vehicle の投与を5日間のみ短期間行い、FAK 阻害が炎症系・基質分解系蛋白を抑制し、マクロファージ数減少を促進するかを検討した。

(3) 自然免疫に関わるマクロファージの正常機能が FAK 活性に依存しないことを実証するために、野生型雄マウス腹腔由来のマクロファージを採取し、FAK 活性亢進のために炎症性サイトカイン TNF- α を添加し、FAK 活性抑制のために低分子化合物である FAK 阻害剤 PF573228 または FAK inhibitor 14 を添加し、蛍光標識されたマイクロビーズ粒子を用いて貪食能アッセイを行った。

(4) FAK 阻害が大動脈瘤に対する有用な予防・治療法であることを明らかにするために、野生型雄マウスを用いて、0.5M CaCl_2 局所刺激による腹部大動脈瘤モデルを作製した。瘤形成が始まる CaCl_2 刺激後3週目から刺激後6週間まで、FAK 阻害剤 PF573228 または Vehicle を投与し、FAK 阻害が瘤の拡大を防止するかを検討した。具体的には、大動脈瘤形成の程度(瘤径)と弾性線維破壊程度(EVG染色所見)、マクロファージ浸潤程度並びに FAK 活性、炎症系分子 MCP-1 等及び細胞外基質分解系分子 MMP-9 等を解析した。さらに、培養ヒト大動脈瘤組織における炎症系・基質分解系蛋白分泌の亢進が FAK 阻害療法で是正できることを実証するために、手術症例から得られる大動脈瘤壁組織を細切して培養し、FAK 阻害剤 PF573228 を添加し、FAK 活性、炎症系分子 MCP-1 等及び細胞外基質分解系分子 MMP-9 等を解析した。

4. 研究成果

(1) 手術症例から得られたヒト大動脈瘤組織を解析した結果、瘤壁のマクロファージ集積部に

において FAK 活性化を認めた。さらに、CaCl₂ 局所刺激による腹部大動脈瘤モデルを経時的に解析し、瘤形成に伴って病変組織部の FAK 活性が亢進することが明らかとなった。

(2) マウス腹腔由来の培養マクロファージにおいて、炎症性サイトカイン TNF- α 刺激による FAK 活性化、MCP と MMP-9 の分泌亢進が、複数種の低分子 FAK 阻害剤あるいは FAK 低分子干渉 RNA による FAK 阻害によって阻止された。さらにモデルマウスの大動脈壁におけるマクロファージの集積が、FAK 阻害剤投与によって抑制されることが明らかとなった。

(3) マイクロビーズを用いた貪食能アッセイの結果、マウス腹腔由来の培養マクロファージの貪食能は、複数種の低分子 FAK 阻害剤のいずれによっても抑制されなかった。

(4) 野生型雄マウスを用いて CaCl₂ 局所刺激によるマウス大動脈瘤モデルを作成し、FAK 阻害剤 PF573228 の予防的投与を行った結果、マウス大動脈瘤の形成が FAK 阻害剤によって防止できることが明らかとなった。さらに、CaCl₂ 局所刺激による腹部大動脈瘤モデルにおいて、小径瘤が形成される時期 (CaCl₂ 刺激後 3 週目) を待ってから、FAK 阻害剤 PF573228 の治療的投与を開始した。対照として、Vehicle 投与を行った。その結果、Vehicle 投与では CaCl₂ 刺激後 3 週目から 6 週目の間に瘤径が増大したが、FAK 阻害剤投与ではマウス大動脈瘤の進行・拡大がほぼ完全に防止できた。さらに、培養ヒト大動脈瘤組織の実験系において、FAK 阻害剤を添加した。その結果、ヒト瘤組織においても FAK 阻害剤投与によって瘤病態に関連する炎症系分子が抑制されることが示された。

(5) これらの結果から、マクロファージにおける FAK の活性化が大動脈組織の炎症増幅と組織破壊を誘導し、大動脈瘤の進展を促進していることが明らかとなった。FAK は大動脈瘤の新しい治療標的として期待される。

< 引用文献 >

- Yoshimura K, Aoki H. Recent Advances in Pharmacotherapy Development for Abdominal Aortic Aneurysm. *Int J Vasc Med*. 2012; 648167, 2012.
- Yoshimura K, Aoki H, Ikeda Y, Fujii K, Akiyama N, Furutani A, Hoshii Y, Tanaka N, Ricci R, Ishihara T, Esato K, Hamano K, Matsuzaki M. Regression of abdominal aortic aneurysm by inhibition of c-Jun N-terminal kinase. *Nat Med*. 11(12): 1330-1338, 2005.
- Yamashita O, Yoshimura K, Nagasawa A, Ueda K, Morikage N, Ikeda Y, Hamano K. Periostin Links Mechanical Strain to Inflammation in Abdominal Aortic Aneurysm. *PLoS ONE*. 8(11): e79753, 2013.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- Sakalihasan N, Michel JB, Katsargyris A, Kuivaniemi H, Defraigne JO, Nchimi A, Powell JT, Yoshimura K, Hultgren R. Abdominal aortic aneurysms. *Nat Rev Dis Primers*. 4(1): 34, 2018. 査読有 doi:10.1038/s41572-018-0030-7
- Yoshimura K, Morikage N, Nishino-Fujimoto S, Furutani A, Shirasawa B, Hamano K. Current Status and Perspectives on Pharmacologic Therapy for Abdominal Aortic Aneurysm. *Curr Drug Targets*. 19(11): 1265-1275, 2018. 査読有 doi:10.2174/1389450119666171227223331
- Harada T, Yoshimura K, Yamashita O, Ueda K, Morikage N, Sawada Y and Hamano K. Focal adhesion kinase promotes the progression of aortic aneurysm by modulating macrophage behavior. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 37(1): 156-165, 2017. 査読有 doi:10.1161/ATVBAHA.116.308542

[学会発表] (計 8 件)

- 原田剛佑, 吉村耕一, 山下 修, 上田晃志郎, 森景則保, 濱野公一. 腹部大動脈瘤進展の病態においてマクロファージが担う役割. 第 59 回日本脈管学会. 2018.
- Yoshimura K. A Mechanistic Link between Mechanical Stress and Inflammation in the Progression of Aortic Diseases. 6th International Meeting on Aortic Diseases. 2018.
- 原田剛佑, 吉村耕一, 山下 修, 上田晃志郎, 森景則保, 濱野公一. Focal Adhesion Kinase (FAK)は大動脈瘤進展を促進する. 第 118 回日本外科学会. 2018.
- 吉村耕一. 腹部大動脈瘤に対する薬物療法開発の現状. 第 40 回日本高血圧学会. 2017.
- 吉村耕一, 原田剛佑, 濱野公一. 大動脈瘤病態における FAK /JNK 経路の役割. 第 49 回日本結合組織学会. 2017.
- 原田剛佑, 吉村耕一, 山下 修, 上田晃志郎, 森景則保, 濱野公一. 腹部大動脈瘤形成・進展におけるマクロファージの制御を介した FAK の役割. 第 117 回日本外科学会. 2017.
- 吉村耕一. 大動脈解離・大動脈瘤の発生メカニズム. 日本心血管画像動態学会. 2017.
- Yoshimura K, Harada T, Hamano K. Focal adhesion kinase is a novel target for pharmacotherapy of abdominal aortic aneurysm. 5th International Meeting on Aortic

Diseases. 2016.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：吉田 恭子(今中 恭子)

ローマ字氏名：YOSHIDA, Kyoko

所属研究機関名：三重大学

部局名：医学系研究科

職名：准教授

研究者番号(8桁)：00242967

研究分担者氏名：山下 修(削除：2016年11月4日)

ローマ字氏名：YAMASHITA, Osamu

所属研究機関名：山口大学

部局名：医学部附属病院

職名：助教

研究者番号(8桁)：30744388

(2)研究協力者

研究協力者氏名：原田 剛佑

ローマ字氏名：HARADA, Takasuke

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。