

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591483

研究課題名（和文）Inflammasome 抑制による薬物的大動脈瘤根治療法の開発

研究課題名（英文）Pharmacologic therapy for aortic aneurysm by inhibiting inflammasome

研究代表者

吉村 耕一（YOSHIMURA KOICHI）

山口大学・医学部・講師

研究者番号：00322248

研究成果の概要：大動脈瘤は破裂死に至る临床上重要な疾患であるが、発症原因は未だ不明である。本研究では、大動脈瘤壁細胞への異常な伸展刺激と大動脈瘤の中心病態である慢性炎症との関連を検討した。すなわち、マクロファージは、細胞進展刺激に应答して炎症シグナルを活性化し、さらに炎症性サイトカインの分泌を亢進した。また、このマクロファージの刺激応答は、自然免疫における炎症惹起蛋白複合体 inflammasome のエフェクター分子である Caspase-1 の阻害剤で抑制された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：大動脈瘤, 伸展刺激, マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

(1) 大動脈瘤は、破裂により突然死に至る临床上重要な疾患であり、本邦で 20 万人以上の患者がいると推定される。ほとんど無症状のまま進行し、自然に治癒することは無いため、瘤径の拡大によって破裂の危険性が高まれば、ステントグラフト治療を含む外科的治療法以外に生命予後を改善する手段はない。侵襲的治療に限られる現状では患者予後の改善には限界があり、薬物的根治療法の開発が急務である。

(2) 近年、ステントグラフトを用いた血管内治療により大動脈瘤の退縮が観察された。この事実から、不可逆的変化と思われていた大動脈瘤が退縮治癒する潜在力を有していることと、瘤壁細胞の血行力学的ストレス応答のシグナル伝達経路を遮断すれば、ステントグラフト治療と同じ分子機序によって瘤を退縮治癒することができると考えた。研究代表者らは、ストレス応答性細胞内シグナル伝達分子 c-Jun N-terminal kinase (JNK) が、ヒト大動脈瘤壁の基質分解酵素活性を亢進し、同時に組織修復を阻害する重要な鍵分

子であることを発見した。さらに、JNK 阻害により一旦完成したマウス大動脈瘤の薬物的退縮治療に世界で初めて成功した (Yoshimura, Nature Medicine 2005)。

(3) 研究代表者らによって、JNK 活性化が大動脈瘤進展の重要な病態鍵分子あることが証明されたが、いかなるストレス刺激がどのような機序で JNK を活性化するかは未解決の謎であった。研究代表者らは、ステントグラフト治療による血行力学的ストレス遮断が臨床上明らかに有効な退縮療法であるという事実から、血行力学的ストレス、特に伸展刺激に着目した。

(4) 最近、inflammasome と呼ばれる蛋白質複合体が、自然免疫における炎症応答の初期段階で重要な役割を果たしていることが発見された。Inflammasome は、細菌やウイルス等の病原体に感知して形成され、その結果活性化された Caspase-1 が IL-1 β の分泌誘導を介して、炎症を惹起する (Martinon, Cell. 2004)。さらに、病原体のみならず細胞膜の障害または透過性亢進に伴う K⁺イオンの細胞外流出時にも inflammasome は形成され Caspase-1 活性化し、IL-1 β 分泌を促進することが報告されている (Mariathasan, Nature 2006)。

(5) 拡大した瘤壁の細胞は過度の伸展刺激に曝されているという事実と inflammasome の知見から、研究代表者らは、過度の伸展刺激が細胞膜障害による K⁺イオンの流出を介して inflammasome 複合体形成を誘導するとの仮説に至った。Inflammasome 形成は Caspase-1 を活性化し、IL-1 β 分泌を介して JNK を活性化する。また、Caspase-1 が直接細胞内で JNK を活性化する可能性もある (Lamkanfi, J Biol Chem. 2004)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、大動脈瘤壁細胞の伸展刺激応答における inflammasome の役割を解明し、伸展刺激応答機序を治療標的として新たな薬物的大動脈瘤根治療法を開発することである。より具体的には、大動脈瘤壁細胞への異常な伸展刺激が細胞の炎症シグナルを活性化することを証明し、さらにその炎症応答が inflammasome のエフェクター分子である Caspase-1 の阻害で抑制されるか否かを検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞実験系：マウス大動脈からエクスプラント法にて初代培養平滑筋細胞を確立した。また Thioglycollate 刺激後のマウス腹腔内からマクロファージを採取し、培

養を行った。

(2) 培養細胞刺激実験：伸展刺激実験用の平滑筋細胞はラミニン処理のシリコンチャンバー、マクロファージはゼラチン処理のシリコンチャンバー上で培養した。刺激 24 時間前に LPS 添加の前処置を行った後に、伸展刺激装置(ストレックス社製)にシリコンプレートセットし、伸展刺激を加えた(24 時間、30 往復/秒、伸展率 10%)。刺激後の培地と細胞ライセートを回収して、サンプルとした。また、K⁺イオンの細胞外流出を促進して実験的に inflammasome を活性化することが知られている K⁺イオノフォア Nigericin を添加する実験を行った。

(3) サンプル解析：刺激後に培地中に分泌された IL-1 β は、マウス IL-1 β ELISA Kit (Endogen) を用いて、定量解析した。細胞ライセート中の JNK 活性化は、活性化型 (リン酸化型) JNK 抗体 (Promega) を用いたウエスタンブロット法で定量的に検出した。

4. 研究成果

(1) 伸展刺激(30 往復/秒、伸展率 10%) 開始後 24 時間に、平滑筋細胞とマクロファージの両方で、JNK の顕著な活性化が認められた。しかし、培地中への炎症性サイトカイン IL-1 β 分泌は、マクロファージでのみ伸展刺激後に増加した。すなわち、平滑筋細胞とマクロファージの両方が伸展刺激を受容しているが、炎症性サイトカインの分泌を亢進して炎症応答を惹起するのはマクロファージであると考えられた。

(2) 培養マクロファージに Nigericin を添加し、inflammasome を実験的に活性化すると、予想通り IL-1 β 分泌が亢進した。このとき、Nigericin は JNK を顕著に活性化した。これは、伸展刺激後の JNK 活性化が inflammasome 活性化と関連していることを示唆する結果と考えられた。

(3) マクロファージの伸展刺激応答における JNK アイソフォームの役割を明らかにするために、JNK1 遺伝子欠損マウス、JNK2 遺伝子欠損マウスならびに野生型マウスから腹腔マクロファージを採取し、上記 (1) と同様の伸展刺激実験を施行した。その結果、JNK1 遺伝子欠損マウス由来のマクロファージは、野生型マクロファージと同様に、伸展刺激後に JNK が活性化し、IL-1 β 分泌が亢進した。しかしながら、JNK2 遺伝子欠損マウス由来のマクロファージでは、この伸展刺激に対する炎症応答が消失した。したがって、マクロファージにおける伸展刺激後の IL-1 β 分泌には、JNK2 の活性化が不可欠であると考

えられた。

(4) マクロファージの伸展刺激応答における inflammasome の役割を明らかにするために、inflammasome 構成蛋白の一つでエフェクターである Caspase-1 を阻害する実験を行った。対照実験では、伸展刺激後に IL-1 β 分泌が亢進したが、Caspase-1 阻害剤添加によって IL-1 β 分泌がほぼ完全に抑制された。したがって、マクロファージの伸展刺激後の IL-1 β 分泌には、Caspase-1 の活性化すなわち inflammasome の活性化が必須であることが示された。

(5) 本研究から、大動脈瘤壁に浸潤してきたマクロファージが伸展刺激を受容して IL-1 β 放出を亢進し、その結果瘤壁の炎症をさらに増幅している可能性が示された。この結果は、瘤壁における伸展刺激が大動脈瘤の原因となる慢性炎症を引き起こすことを示すと同時に、ステントグラフト治療が瘤の退縮治癒に有効である分子機序の説明となりうる。この伸展刺激による inflammasome 活性化は、薬物治療の標的候補になりうると考えられる。現在、本研究をさらに発展させるために、inflammasome 構成分子の一つ ASC に着目し、ASC が治療標的になりうるか否かをマウス大動脈瘤モデルで検討中である。

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 6 件)

1. 吉村耕一, 青木浩樹, 木村泰三, 古谷彰, 濱野公一, 松崎益徳. 大動脈瘤に対する薬物療法の up-to-date. *Heart View*. 2008; 12(11): 54-59. 査読無
2. 吉村耕一, 青木浩樹, 松崎益徳. 大動脈瘤に対する薬物療法開発の最前線. *医学のあゆみ*. 2008. 9. 6. : 226(10) 7495-7501. 査読無
3. 青木浩樹, 吉村耕一, 松崎益徳. 大動脈瘤のトランスレーショナルリサーチ. *化学と生物*. 2008; 46(3): 180-186. 査読無
4. Yoshimura K, Aoki H, Ikeda Y, Furutani A, Hamano K, Matsuzaki M. Regression of Abdominal Aortic Aneurysms by Pharmacological Inhibition of c-Jun N-terminal Kinase. *Bull Yamaguchi Med School*. 2007; 54(3-4): 29-31. 査読有
5. 青木浩樹, 吉村耕一, 松崎益徳. 大動脈瘤の薬物治療. *Angiology Frontier*. 2007; 6(4): 43-49. 査読無
6. Aoki H, Yoshimura K, Matsuzaki M. Turning back the clock: regression of

abdominal aortic aneurysms via pharmacotherapy. *J Mol Med*. 2007; 85(10): 1077-88. 査読有

[学会発表] (計 10 件)

1. Yoshimura K, Aoki H, Kimura T, Ikeda Y, Aoyama H, Miyazaki Y, Morikage N, Furutani A, Hamano K, Matsuzaki M. Involvement of JNK2 in Mechanosensing and Proinflammatory Signaling during Development of Aortic Aneurysm. 日本循環器学会. 2009年3月20-22日, 大阪.
2. Yoshimura K, Aoki H, Kimura T, Ikeda Y, Aoyama H, Morikage N, Furutani A, Hamano K, Matsuzaki M. c-Jun N-terminal Kinase 2 Translates Mechanical Stress to Inflammatory Signal in Macrophages and Promotes Progression of Abdominal Aortic Aneurysm In Vivo. American Heart Association Scientific Sessions 2008. Nov 9-12, 2008, New Orleans, LA, U.S.A.
3. Yoshimura K, Aoki H, Ikeda Y, Furutani A, Hamano K, Matsuzaki M. Pharmacological therapy of AAA in animal. International Meeting on Aortic Aneurysms -New insights into an old problem-. Sep 19-20, 2008. Liege, Belgium.
4. 吉村耕一, 青木浩樹, 池田安宏, 濱野公一, 松崎益徳. 大動脈瘤の病態解明と薬物療法開発の試み. 第 56 回日本心臓病学会. 2008年9月8-10日, 東京.
5. 吉村耕一. 大動脈瘤トランスレーショナルリサーチの最前線. 第 92 回日本循環器学会中国・四国合同地方会. 2008年6月6日, 下関
6. Yoshimura K, Aoki H, Ikeda Y, Hamano K, Matsuzaki M. Critical Role of JNK in Chronic Inflammation of Abdominal Aortic Aneurysms. *Chronic Inflammation and Cardiovascular Diseases*. 日本循環器学会. 2008年3月28-30日, 博多.
7. Yoshimura K, Aoki H, Ikeda Y, Morikage N, Furutani A, Hamano K, Matsuzaki M. Critical Role of JNK2 for Development of Abdominal Aortic Aneurysm in Mice. 日本循環器学会. 2008年3月28-30日, 博多.
8. Yoshimura K, Aoki H, Ikeda Y, Matsuzaki M. Regression of Abdominal Aortic Aneurysm in animal models. American Heart Association Scientific Sessions 2007. Nov 4-7, 2007,

- Orlando, Florida, U.S.A.
9. Yoshimura K, Aoki H, Ikeda Y, Aoyama H, Morikage N, Furutani A, Hamano K, Matsuzaki M. c-Jun N-terminal Kinase 2 is Required for Development of Abdominal Aortic Aneurysm in Mice. American Heart Association Scientific Sessions 2007. Nov 4-7, 2007, Orlando, Florida, U.S.A.
 10. Yoshimura K, Aoki H, Hamano K, Matsuzaki M. Regression of Abdominal Aortic Aneurysm through Pharmacologic Therapy. 8th annual international symposium on advances in understanding aortic diseases. October 13-14, 2007, Tokyo.

[図書] (計1件)

1. Yoshimura K, Aoki H, Ikeda Y, Furutani A, Hamano K, Matsuzaki M. Development of pharmacological therapy for abdominal aortic aneurysms based on animal studies. In the Text Book "Aortic Aneurysms, New insights into an old problem" (ed. by Sakalihan N.), Édition de l'Université de Liège, Liège, p453-476, 2008. 査読無

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉村 耕一 (YOSHIMURA KOICHI)
山口大学・医学部・講師
研究者番号：00322248

(2) 研究分担者

青木 浩樹 (AOKI HIROKI)
山口大学・医学部・特命准教授
研究者番号：60322244

(3) 連携研究者 なし

