

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592063

研究課題名(和文)メカニカルストレス応答因子を介した新規腹部動脈瘤治療の検討

研究課題名(英文)New therapeutic strategy to treat abdominal aortic aneurysm via mechano-stress regulatory factor: periostin

研究代表者

東 純哉 (JUNYA, AZUMA)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：20614671

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：腹部動脈瘤(AAA)は大動脈の病的拡張の末に破裂に到る致死性の疾患である。しかしAAAの拡大を抑制しうる薬物治療ははまだ存在しない。我々は以前に力学的ストレスに反応して発現するペリオスチン(Periostin:PN)が高リスクAAA症例およびマウスAAAモデルの拡張相で強発現していることを確認した。PNにはスプライシングバリエーション(PN1, PN2)が存在し、細胞接着作用を介した組織のリモデリングに深く関与している。そこでこれらの因子をノックアウトしたマウスを作製し、AAAに対するPNを介した血管リモデリングの機能を解析した。

研究成果の概要(英文)：Abdominal aortic aneurysm (AAA) has complex hemodynamics which leads various mechanical stresses in aortic wall. Periostin (PN) is a matricellular protein that is induced by mechanostress and regulates organ remodeling. Our previous genome transcriptional profiling of the murine angiotensin II (Ang II) induced AAA have shown 3.5-fold up-regulation of PN in AAA in early remodeling phase over saline-control sample. Moreover we also found it was highly expressed in human AAA samples. The purpose of the present study was to investigate the potential role of PN in AAA disease progression. PN was significantly unregulated in early remodeling phase of AAAs and its ablation contributed to reduce AAA growth. Antagonists against PN will potentially lead to new therapeutic targets on a molecular basis to limit AAA disease progression.

研究分野：腹部動脈瘤

キーワード：腹部動脈瘤 メカニカルストレス

### 1. 研究開始当初の背景

腹部動脈瘤 (AAA) は大動脈の病的拡張の末に破裂に到る致死性の疾患である。しかし AAA の拡大を抑制する薬物治療はまだまだ存在しない。

我々は以前に力学的ストレスにตอบสนองして発現するペリオスチン (Periostin:PN) が高リスク AAA 症例およびマウス AAA モデルの拡張相で強発現していることを確認した。さらに PN にはスプライシングバリエーション (PN1, PN2) が存在し、細胞接着作用を介した組織のリモデリングに深く関与していることを見出した。

### 2. 研究の目的

本研究では AAA に対する PN を介した血管リモデリング抑制治療の可能性を AngII - AAA モデル検討した。

さらにニコチン誘発型 AAA モデルを用いて PN の AAA における役割を検討した。

典型的な全身炎症性疾患である川崎病にも着目し、合併する冠動脈リモデリングと血中 PN の関連を検討した。

### 3. 研究の方法

6ヶ月齢の ApoE ノックアウトマウス (ApoEKO: n=12) もしくは PN2 ノックアウトマウス (PN2KO) に ApoEKO を掛け合わせた ApoE -PN2 ダブルノックアウトマウス (ApoE-PN2DKO: n=10) の皮下に浸透圧ポンプ (Alzet1004) を留置し、アンジオテンシン II を 1000 で 28 日間皮下投与した。AAA の形成過程は腹部超音波検査にて経時的に観察した。ポンプ挿入後に尾動脈を用いたカフ法で毎週血圧測定を行い、アンジオテンシン II (AngII) の効果を確認した。28 日後にマウスの大動脈を摘出し胸部大動脈、大動脈弁はオイルレッド O 染色を行い、動脈硬化巢の定量を行った。また腹部大動脈は組織病理学的検査に用いた。2 群間の比較に T 検定を

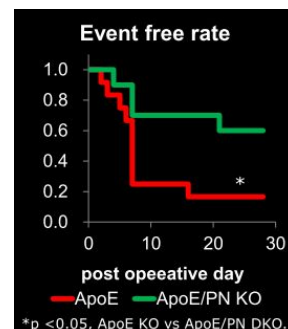
用いた。生存率解析には Kaplan-Meier 法を用い、2 群間の検定には Log-rank 法を用いた。

APOE もしくは ApoE-PN2DKO に浸透圧ポンプ (Alzet: 1006) を用いてニコチン (1.5mg/kg/day) を経皮的に 6 週間持続投与を行った。体血圧は無麻酔で尾動脈を用いて毎週経時的に計測を行った。また、腎動脈上部の腹部大動脈の最大径を超音波装置で毎週経時的に計測した。死亡例は剖検を行い、死因が AAA 破裂によるものか検討を行った。各データは T 検定により解析を行った。

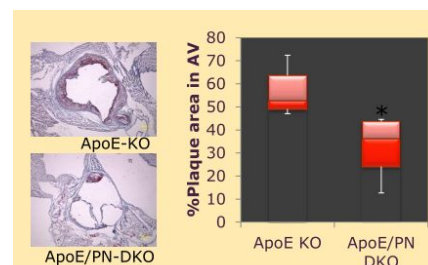
川崎病に合併する冠動脈瘤形成と血中 PN の関連を検討するため、愛仁会高槻病院を受診し、川崎病と診断された患者のうち、文書による同意が取得された患者検体 (n=13) の解析を行った。

### 4. 研究成果

AngII の投与前の野生種および PN2KO マウスでは血管性状に差を認めなかった。また AngII の投与前後で両群間に血圧の差は認められなかった。しかし、瘤破裂率は ApoE-PN2DKO で有意に低下していた (図 1)。



さらに大動脈弁輪部での動脈硬化度も ApoE-PN2DKO で有意に低下していた (図 2)。



ApoEKO および ApoE-PN2DKO マウスにニコ

チン投与を行ったが、6週間の観察期間を通じて有意な血圧の上昇は認められなかった。また、ニコチン投与初期に両群で痙攣が誘発されたが致死的ではなかった。また観察期間と通じてAAAの破裂による死亡例は認められなかった。

腹部超音波装置による血管径の計測ではApoEKOマウス群において14日目より拡大傾向が認められた。ApoE-PN2DK0マウス群でも14日目より拡大傾向が認められたが、ApoEKOマウス群と比較して21日目より有意に血管径拡大は抑制されていた(156.1±9.6 vs 113.9±4.0% at day 42, p<0.05)。

6週目にAAA形成を剖検で確認したが、両群ともにAngII誘発AAAモデルで認められる特徴的な解離性動脈瘤用の血腫形成は認められなかった。

以上から、ニコチンはAngIIとは異なる機序でAAAを誘発している可能性があるが、PNの中でもPN2を抑止することでいずれの刺激に対しても血管径の拡大、もしくはAAA破裂による死亡を抑止できることが確認された。

川崎病診断時の血中PN濃度は127.9±48.2ng/mlであったが、IVIG後は2150.4±63.8ng/mlと著名な上昇を認めた。本研究では川崎病診断時の血中PN濃度は患者の重症度と相関は認めなかった。また、IVIG後に著名な血中PN濃度の上昇を認めたが、川崎病の治癒過程との関連は認めなかった。

本研究では、診断時及びIVIG投与後の冠動脈の拡張率、瘤形成率とPNの血中濃度の相関は認めなかった。後の検討で免疫グロブリン製剤中に高濃度のPNが存在することが確認され、現在は免疫グロブリン製剤中のPNスプライシングバリエーションの解析を行っている。

##### 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 17件)

- 1: Maegdefessel L, Spin JM, Raaz U, Eken SM, Toh R, Azuma J, Adam M, Nagakami F, Heymann HM, Chernugobova E, Jin H, Roy J, Hultgren R, Caidahl K, Schrepfer S, Hamsten A, Eriksson P, McConnell MV, Dalman RL, Tsao PS. miR-24 limits aortic vascular inflammation and murine abdominal aneurysm development. *Nat Commun.* 2014 Oct 31;5:5214. doi: 10.1038/ncomms6214.
2. Sanada S, Taniyama Y, Azuma J, Yuka II, Iwabayashi M, Rakugi H, Morishita R. Endothelial progenitor cells in clinical settings. *J Stem Cells.* 2014;9(2):117-25. doi: jsc.2014.9.2.117.
3. Maegdefessel L, Azuma J, Tsao PS. MicroRNA-29b regulation of abdominal aortic aneurysm development. *Trends Cardiovasc Med.* 2014 Jan;24(1):1-6. doi: 10.1016/j.tcm.2013.05.002.
4. Shimamura M, Nakagami H, Sata M, Takaoka M, Azuma J, Kiomy Osako M, Koriyama, Kurinami H, Wakayama K, Miyake T, Morishita R. Unique remodeling processes after vascular injury in intracranial arteries: analysis using a novel mouse model. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2013 Aug;33(8):1153-9. doi: 10.1038/jcbfm.2013.62.
5. Taniyama Y, Azuma J, Kunugiza Y, Iekushi K, Rakugi H, Morishita R. Therapeutic option of plasmid-DNA based gene transfer. *Curr Top Med Chem.* 2012;12(15):1630-7.

6. Shimizu K, Taniyama Y, Sanada F, Azuma J, Iwabayashi M, Iekushi K, Rakugi H, Morishita R. Hepatocyte growth factor inhibits lipopolysaccharide-induced oxidative stress via epithelial growth factor receptor degradation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012 Nov;32(11):2687-93. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.300041.
7. Makino H, Aoki M, Hashiya N, Yamasaki K, Azuma J, Sawa Y, Kaneda Y, Ogihara T, Morishita R. Long-term follow-up evaluation of results from clinical trial using hepatocyte growth factor gene to treat severe peripheral arterial disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012 Oct;32(10):2503-9. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.244632.
8. Iwabayashi M, Taniyama Y, Sanada F, Azuma J, Iekushi K, Okayama K, Chatterjee A, Rakugi H, Morishita R. Inhibition of Lp(a)-induced functional impairment of endothelial cells and endothelial progenitor cells by hepatocyte growth factor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 Jun 22;423(1):79-84. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.05.086.
9. Okayama K, Azuma J, Dosaka N, Iekushi K, Sanada F, Kusunoki H, Iwabayashi M, Rakugi H, Taniyama Y, Morishita R. Hepatocyte growth factor reduces cardiac fibrosis by inhibiting endothelial-mesenchymal transition. *Hypertension.* 2012 May;59(5):958-65. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.183905.
10. Maegdefessel L, Azuma J, Toh R, Deng A, Merk DR, Raiesdana A, Leeper NJ, Raaz U, Schoelmerich AM, McConnell MV, Dalman RL, Spin JM, Tsao PS. MicroRNA-21 blocks abdominal aortic aneurysm development and nicotine-augmented expansion. *Sci Transl Med.* 2012 Feb 22;4(122):122ra22. doi: 10.1126/scitranslmed.3003441.
11. Maegdefessel L, Azuma J, Toh R, Merk DR, Deng A, Chin JT, Raaz U, Schoelmerich AM, Raiesdana A, Leeper NJ, McConnell MV, Dalman RL, Spin JM, Tsao PS. Inhibition of microRNA-29b reduces murine abdominal aortic aneurysm development. *J Clin Invest.* 2012 Feb;122(2):497-506. doi: 10.1172/JCI61598.
12. Kusunoki H, Taniyama Y, Azuma J, Iekushi K, Sanada F, Otsu R, Iwabayashi M, Okayama K, Rakugi H, Morishita R. Telmisartan exerts renoprotective actions via peroxisome proliferator-activated receptor- /hepatocyte growth factor pathway independent of angiotensin II type 1 receptor blockade. *Hypertension.* 2012 Feb;59(2):308-16. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.176263.
13. Iwabayashi M, Taniyama Y, Sanada F, Azuma J, Iekushi K, Kusunoki H, Chatterjee A, Okayama K, Rakugi H, Morishita R. Role of serotonin in angiogenesis: induction of angiogenesis by sarpogrelate via endothelial 5-HT1B/Akt/eNOS pathway in diabetic mice. *Atherosclerosis.*

2012 Feb;220(2):337-42. doi:  
10.1016/j.atherosclerosis.2011.10.0  
42.

14. Saatchi S, Azuma J, Wanchoo N, Smith SJ, Yock PG, Taylor CA, Tsao PS. Three-dimensional microstructural changes in murine abdominal aortic aneurysms quantified using immunofluorescent array tomography. *J Histochem Cytochem.* 2012 Feb;60(2):97-109. doi: 10.1369/0022155411433066.
15. 遺伝子治療・診断の最先端技術と新しい医薬品・診断薬の開発「心不全における遺伝子治療、診断の現状と今後有望な開発ターゲットの考察」谷山義明、東 純哉、眞田文博、楽木宏実、森下竜一 技術情報協会、2014年5月31日発行
16. 「メタボリックシンドロームと降圧治療」東 純哉、谷山義明、岩林正明、森下竜一 循環器内科、73(6):p690-697, 2013
17. 老年医学の展望「老化とMicroRNA」東 純哉、家串和真、岩林正明、谷山義明、森下竜一 *Japanese Journal of Genetics*, vol.50, no.1, 2013 Jan. 9-15

〔学会発表〕(計 5件)

1. Periostin Regulates Aortic Rupture and Remodeling in Angiotensin II Induced Abdominal Aortic Aneurysm Junya Azuma, Yoshiaki Taniyama, Rei Otsu, Takashi Miyake, Kazuma Iekushi, Masaaki Iwabayashi, Ryuichi Morishita The 85th American Heart Association, Scientific Session 2012 (11.4.Los Angeles)
2. Is hypertension related to the growth of abdominal aortic aneurysm? J

Azuma, Y Taniyama, H Rakugi, R Morishita The 20th Annual Meeting of the Japanese Vascular Biology and Medicine Organization (Symposium) The 10th Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology (12.7.Tokushima)

3. Nicotine Accelerates the Expansion of Abdominal Aortic Aneurysms via a Matricellular Protein, Periostin (Poster) Junya Azuma, Rei Otsu, Yoshiaki Taniyama, Masaaki Iwabayashi, Ryuichi Morishita The 86th American Heart Association, Scientific Session 2013 (2013.11.20. Dallas)
4. The impact of Periostin splicing isoforms in cardiac remodeling (Poster) Junya Azuma, Yoshiaki Taniyama, Rei Otsu, Naruto Katsuragi, Keita Okayama, Kazuma Iekushi, Masaaki Iwabayashi, Ryuichi Morishita Basic Cardiovascular Sciences (BCVS) 2013 Scientific Sessions (2013.7.21. Las Vegas)
5. 腹部動脈瘤におけるペリオスチンの役割 (oral) 東 純哉、谷山義明、大津礼、岩林正明、三宅 隆、森下竜一 第13回日本抗加齢医学会総会 (2013.6.30.横浜)

〔図書〕(計 4件)

1. 高血圧を合併する狭心症患者にはCa拮抗薬と遮断薬のどちらを選択するべきでしょうか？各々の薬剤にも多くの種類がありますが、どのような薬剤を選択するべきでしょうか？ 東 純哉、森下竜一 高血圧診療Q & A-エキスパート100人からの回答 中外医学社(東京) 50-53, 2013

2. 大動脈瘤 東 純哉、谷山義明、森下竜  
— 予防とつきあい方シリーズ3 [改訂版]老年病・認知症～長寿の秘訣～  
メディカルレビュー社(京),98-99,2013
3. Sanada F, Taniyama Y, Azuma J,  
Ikeda-Iwabe Y, Iwabayashi M, Rakugi H,  
Morishita R Endothelial Progenitor  
Cells in Clinical Setting.  
Progenitor Cells, Biology,  
Characterization and Potential  
Clinical Application, Editor Patrick  
M. Horton and Brett E. Lawrence,  
Chapter 5, P87-103
4. Iwabayashi M, Taniyama Y, Azuma J,  
Sanada F, Iekushi K, Rakugi H,  
Morishita R Role of Serotonin in  
Angiogenesis in Diabetes. J. L.  
Mehta, N. S. Dhalla (eds.),  
Biochemical Basis and Therapeutic  
Implications of Angiogenesis Advances  
in Biochemistry in Health and Disease  
Volume 6, 2013, pp 225-238

〔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

<http://www.cgt.med.osaka-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

東 純哉(AZUMA, Junya)

大阪大学大学院医学系研究科・特任助教

研究者番号：20614671

(2)研究分担者

谷山 義明(TANIYAMA, Yoshiaki)

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:60372611

(3)連携研究者

眞田 文博(SANADA, Fumihiro)

大阪大学大学院医学系研究科・寄附講座特  
任助教

研究者番号： 30722227