

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07967

研究課題名(和文) 血管内皮障害を基盤とする新規大動脈解離モデルの開発と分子病態の解明

研究課題名(英文) Development of novel aortic dissection model based on vascular endothelial dysfunction and elucidation of pathophysiological mechanisms

研究代表者

石澤 啓介 (ISHIZAWA, Keisuke)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・教授

研究者番号：60398013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：野生型のC57Bl/6Jマウスに一酸化窒素合成酵素(NOS)阻害剤で内皮障害を惹起するL-NAME、血圧を上昇させるangiotensin II、リジリオキシターゼ阻害剤で弾性線維の脆弱化を惹起するBAPNの3つの薬剤(以下LABと略記)を合わせて投与することで、高率に大動脈解離の発症を惹起し得る新規の薬剤誘発性大動脈解離モデルマウスを確立することに成功した。さらに、スタチンがLABモデルの大動脈解離発症を抑えること、その抑制効果には血管内皮細胞におけるERK5活性化が関与していることをマウスモデルおよびヒト臍帯静脈内皮細胞を用いて明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we have succeeded to establish a novel acute aortic dissection model mouse. Aortic dissection in C57Bl/6J mouse is induced by the combined usage of N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), angiotensin II (Ang II), and -aminopropionitrile (BAPN). L-NAME induces endothelial cell damage. Administration of Ang II elevated systolic blood pressure. BAPN is one of the lysyloxidase inhibitor, which causes vessel medial fragility. We named this model "LAB" model. Pitavastatin, an HMG-CoA inhibitor used as lipid lowering agent, suppressed the incidence of aortic dissection. From the results of in vitro analysis using cultured human umbilical vein endothelial cells, pitavastatin effects are mediated by extracellular signal-regulated kinase 5 (ERK5) activation. Our findings suggested that this novel "LAB" model are useful to examine the pathophysiology of aortic dissection and the estimation of the drug efficacy against aortic dissection.

研究分野：薬理学

キーワード：動脈硬化 大動脈解離 血管内皮

1. 研究開始当初の背景

大動脈解離とは大動脈壁が中膜レベルで二層に剥離し偽腔を形成した病態をいう。その発症メカニズムは未だ解明されておらず、有効な治療法・予防法は確立されていない。その分子メカニズムの解明にあたっては、適切なモデル動物が確立していないためにこれまで大動脈瘤と解離を区別して解析することが困難であった。大動脈瘤と解離の形成はどちらも中膜の脆弱化、高血圧の関与が考えられており、共通の病態を基盤としていることが推察される。一方で、そのイベント発症機序は明らかに異なっており、解離には血管中膜へのエンタリー、すなわち“血管内膜の破綻”が必須であると考えられる。実際に近年国内外から、解離と内皮障害の関与を示す報告が発表され始めている (Circulation 2014)(Turk Kardiyol Dern Ars. 2014)。共同研究者である Kanematsu らが開発した薬剤誘発性大動脈瘤モデルでは、C57Bl/6J マウスに angiotensin II (Ang II) と弾性線維を分解するリジロオキシダーゼ阻害剤の一つ -aminopropionitrile (BAPN) を投与することで腹部・胸部ともに瘤の形成が確認される (Hypertension 2010)。我々は eNOS 阻害剤である N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) を Ang II + BAPN モデルに前投与し、薬剤性に内皮障害を惹起することを試みた。その結果、中膜に偽腔を有する解離像を呈する症例が、Ang II + BAPN 群に比べ L-NAME 前投与群では有意に増加した。

一方、extracellular signal-regulated protein kinase 5 (ERK5) は血管内皮細胞において抗アポトーシス作用、eNOS 発現上昇、抗炎症作用などを有し、血管内皮機能の維持・保護に重要であることが報告されている。また脂質異常症の治療薬であるスタチン系薬剤、ピタバスタチンが ERK5 活性化を介して血管保護効果、抗炎症作用を示すことを報告している (Y Izawa-Ishizawa, et. al. J Immunol 2014)。

そこで、L-NAME + Ang II + BAPN 誘導性解離モデルマウスを新たに確立し、内皮保護効果が明らかとなっているスタチン系薬剤、あるいは内皮保護シグナルの鍵分子である ERK5 の内皮特異的欠損マウス (ERK5-EKO) を用いて検討を行った。

2. 研究の目的

本研究は、内皮機能障害を基盤とした大動脈解離の新規モデルマウスの確立および本マウスを用いた解離発症の分子メカニズム解明・予防戦略の開発に向けた基盤研究を行うことが目的である。具体的な研究目的は、以下の通りである。

- (1) eNOS 阻害剤を用いた内皮機能障害マウスにおける大動脈解離の発症誘導
- (2) スタチン系薬剤の大動脈解離発症に対する予防効果の検討
- (3) 大動脈解離発症における内皮機能の病態

生理学的意義とその分子メカニズムの解明

3. 研究の方法

大動脈解離病変が形成される過程に内皮障害が関与するか否かを明らかにするため、以下の方法により検討を進めた。

- (1) eNOS 阻害剤 (L-NAME) 投与による薬剤誘発性大動脈解離モデルを確立する。
- (2) 新規解離モデルに対するスタチンの効果を検討した。
- (3) ERK5 内皮特異的欠損マウスにおける解離発症率を検討した。
- (4) スタチンと同様に ERK5 の活性化を惹起するフラボノイドであるケルセチンによる解離に対する効果を検討した。
- (5) 培養細胞を用いてスタチンあるいはによる血管内皮細胞および血管平滑筋細胞への効果を検討した。

4. 研究成果

本研究課題において大動脈解離発症のリスクを高めると考えられている中膜の脆弱化・高血圧に加え、血管中膜へのエンタリー、すなわち“血管内膜の破綻”を薬剤誘発性に惹起させることで大動脈解離を高率に発症するモデルマウスの確立に成功した。本モデルでは、野生型の C57Bl/6J マウスに一酸化窒素合成酵素 (NOS) 阻害剤で内皮障害を惹起する N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)、血圧を上昇させる angiotensin II (Ang II)、リジロオキシダーゼ阻害剤で弾性線維の脆弱化を惹起する -aminopropionitrile (BAPN) の3つの薬剤 (以下 LAB と略記) を合わせて投与することで、従来 Ang II + BAPN 負荷による大動脈瘤発症モデルに比べ有意に解離の発症率を高めた。さらに、ピタバスタチンが上記 LAB モデルの大動脈解離発症を抑えることが明らかとなった。その抑制効果には血管内皮細胞における extracellular signal-regulated kinase 5 (ERK5) 活性化が関与している可能性がヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いた in vitro の検討より明らかになった。

そこで ERK5-flox マウスを Cdh5-Cre マウスと掛け合わせて内皮特異的な ERK5 欠損マウスを作製した。Flox/flox のホモ欠損マウスは胎生致死のため flox/- のヘテロ欠損マウスを使用し、Ang II + BAPN 負荷を与えた。その結果、コントロールマウスに比べ内皮特異的ヘテロ欠損マウスでは L-NAME を投与していないにも関わらず投与開始後3週までに50%が大動脈破裂による死亡を認め、解離の発症率が上昇している可能性が示唆されている。

また、ピタバスタチンと同様に ERK5 の活性化、一酸化窒素合成酵素 (eNOS) 発現上昇作用を有するポリフェノール的一种であるケルセチンが、LAB モデルにおいて解離および大動脈破裂によるマウスの死亡率を有意に

改善することを見出した。内皮細胞での ERK5 活性化は、炎症性サイトカインである tumor necrosis factor (TNF)- による細胞接着分子 (vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1) の発現を抑制することが HUVEC において観察され、実際に LAB マウスでもケルセチン投与によって VCAM-1 発現の抑制が見られた。その結果、血管壁への炎症細胞浸潤が抑制されていることが、マクロファージ特異的マーカーである Mac-2 の免疫染色および F4/80 の mRNA 発現検討によって確認された。以上の結果から、内皮障害の存在が大動脈解離発症の鍵となっていることが明らかとなった。その分子メカニズムとして eNOS による内皮機能維持が重要であり、eNOS の低下が炎症細胞の浸潤、血管透過性の亢進などを惹起する。血管内皮細胞における ERK5 をピタバスタチンやケルセチンなど薬理学的手法によって活性化させることが eNOS 発現の増加、すなわち内皮障害の改善による解離発症予防に有用であ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6件)

Yasumasa Ikeda, Yuya Horinouchi, Hirofumi Hamano, Tasuku Hirayama, Seiji Kishi, Yuki Izawa-Ishizawa, Masaki Imanishi, Yoshito Zamami, Kenshi Takechi, Licht Miyamoto, Keisuke Ishizawa, Ken-ichi Aihara, Hideko Nagasawa, Koichiro Tsuchiya, Toshiaki Tamaki. Dietary iron restriction alleviates renal tubulointerstitial injury induced by protein overload in mice. *Sci Rep*, 査読有、7、10621、2017
DOI: 10.1038/s41598-017-11089-0

Yoshito Zamami, Masaki Imanishi, Kenshi Takechi, Keisuke Ishizawa. Pharmacological approach for drug repositioning against cardiorenal diseases. *J Med Invest*, 査読有、64、2017、197-201
DOI: 10.2152/jmi.64.197

Keisuke Oshima, Yasumasa Ikeda, Yuya Horinouchi, Hiroaki Watanabe, Hirofumi Hamano, Yoshitaka Kihira, Seiji Kishi, Yuki Izawa-Ishizawa, Licht Miyamoto, Tasuku Hirayama, Hideko Nagasawa, Keisuke Ishizawa, Koichiro Tsuchiya, Toshiaki Tamaki. Iron suppresses erythropoietin expression via oxidative stress-dependent hypoxia-inducible factor-2 alpha inactivation. *Lab Invest*, 査読有、97、2017、555-566
DOI: 10.1038/labinvest.2017.11.

Yutaka Fukunaga, Yuki Izawa-Ishizawa, Yuya Horinouchi, Eriko Sairyo, Yasumasa Ikeda, Keisuke Ishizawa, Koichiro Tsuchiya,

Yoshiro Abe, Ichiro Hashimoto, Toshiaki Tamaki. Topical application of nitrosonifedipine, a novel radical scavenger, ameliorates ischemic skin flap necrosis in a mouse model. *Wound Repair Regen*, 査読有、25、2017、217-223
DOI: 10.1111/wrr.12510

Yasumasa Ikeda, Mizuki Imao, Akiho Satoh, Hiroaki Watanabe, Hirofumi Hamano, Yuya Horinouchi, Yuki Izawa-Ishizawa, Yoshitaka Kihira, Licht Miyamoto, Keisuke Ishizawa, Koichiro Tsuchiya, Toshiaki Tamaki, Iron-induced skeletal muscle atrophy involves an Akt-forkhead box O3-E3 ubiquitin ligase-dependent pathway. *J Trace Elem Med Biol*, 査読有、35、2016、66-76
DOI: 10.1016/j.jtemb.2016.01.011

Yasumasa Ikeda, Hirofumi Hamano, Akiho Satoh, Yuya Horinouchi, Yuki Izawa-Ishizawa, Yoshitaka Kihira, Keisuke Ishizawa, Ken-ichi Aihara, Koichiro Tsuchiya, Toshiaki Tamaki, Bilirubin exerts pro-angiogenic property through Akt-eNOS-dependent pathway. *Hypertens Res*, 査読有、38、2015、733-740
DOI: 10.1038/hr.2015.74

[学会発表](計7件)

石澤有紀、鍵本優有、今西正樹、堀ノ内裕也、鈴木琴子、岩田悠佑、座間味義人、武智研志、池田康将、玉置俊晃、石澤啓介、ケルセチンによる動脈硬化性疾患発症に対する予防効果の検討、2017.12.1、第27回日本循環薬理学会、ウインクあいち(愛知県・名古屋市)

今西正樹、田中恭平、生藤来希、座間味義人、武智研志、堀ノ内裕也、石澤有紀、池田康将、藤野裕道、土屋浩一郎、玉置俊晃、石澤啓介、Angiotensin II 誘発性血管リモデリングに対する febuxostat の効果、第46回日本心臓血管作動物質学会、2017.2.10、琉球大学(沖縄県・中頭郡)

Yuki Izawa-Ishizawa, Masaki Imanishi, Yuya Horinouchi, Kenshi Takechi, Yoshito Zamami, Yasumasa Ikeda, Koichiro Tsuchiya, Toshiaki Tamaki, Keisuke Ishizawa, The effects of pitavastatin, a lipid-lowering agent, against aortic dissection model mice induced by L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor, The 9th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, 2016.10.21、仙台国際センター(宮城県・仙台市)

鍵本優有、石澤有紀、今西正樹、座間味義人、木平孝高、池田康将、土屋浩一郎、玉置俊晃、石澤啓介、無機リン刺激による血管平滑筋細胞石灰化における rho-kinase 及び cyclophilinA の関与、日本薬学会第136年

会、2016.3.27、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

石澤有紀、今西正樹、木平孝高、宮本理人、座間味義人、池田康将、玉置俊晃、土屋浩一郎、石澤啓介、Development of endothelial dysfunction-induced aortic dissection model and search for a preventive strategy、第89回日本薬理学会年会、2016.3.9、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

斎藤尚子、石澤有紀、石澤啓介、戸谷紘基、今西正樹、鍵本優有、細岡真由子、木平孝高、池田康将、土屋浩一郎、玉置俊晃、大動脈解離発症における内皮障害の関与、第25回日本循環薬理学会、2015.12.4、東大寺総合文化センター（奈良県・奈良市）

石澤有紀、石澤啓介、大越瑞穂、土肥紗希子、木平孝高、池田康将、玉置俊晃、血管石灰化シグナルにおける Rho キナーゼおよびサイクロフィリン A の関与、第47回日本動脈硬化学会総会・学術集会、2015.7.10、仙台国際センター（宮城県・仙台市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石澤 啓介 (ISHIZAWA, Keisuke)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授
研究者番号：60398013

(2) 研究分担者

石澤 有紀 (ISHIZAWA, Yuki)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・講師
研究者番号：40610192