

令和元年6月25日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10669

研究課題名(和文)大動脈解離における血管平滑筋STAT3の保護的役割の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the protective role of vascular smooth muscle STAT3 in aortic dissociation

研究代表者

平方 佐季(Hirakata, Saki)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：60597425

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：大動脈解離は大動脈壁の急激な破壊により発症し、炎症応答によって促進されると報告されている。我々は、 α -アミノプロピオニトリルとアンジオテンシンII投与により大動脈解離を発症するマウスモデルを用い、平滑筋におけるJak/Statシグナル伝達経路のネガティブ調節因子であるSocs3の大動脈解離病態における役割を調べた。平滑筋細胞特異的なSocs3遺伝子ノックアウトは大動脈壁の慢性炎症応答をきたし、線維芽細胞増加、大動脈壁強度増強及び組織破壊の重症化抑制に関連していた。急性の炎症応答は、大動脈解離にとって有害とされるが、平滑筋による炎症応答は、大動脈解離に対して保護的な役割があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大動脈解離は、社会的な影響が重大な50代男性に好発する致命的な疾患であるにもかかわらず、外科的治療以外にその進行を阻止するような積極的治療法はない。病態もほとんど未解明であるため病状を把握することも困難であるのが現状である。本研究の結果から、従来大動脈解離にとって破壊を促進する有害なものとされた炎症が、反対に保護的な役割も担っている可能性があることがわかり、その中心となるのが平滑筋細胞であることも発見した。具体的に線維芽細胞の増加、大動脈壁強度の増強により組織破壊の重症化が抑制されていることも明らかとなったことから、これまで進んでいなかった解離進行阻止療法の開発につながる重要な知見となった。

研究成果の概要(英文)：Aortic dissection (AD) is an acute destruction of aortic wall, which is reportedly promoted by inflammatory response. We investigated the role of smooth muscle Socs3, a negative regulator of Jak/Stat signaling, in AD pathogenesis using a mouse model with α -aminopropionitril and angiotensin II infusion. Genetic deletion of Socs3 specifically in smooth muscle cells resulted in chronic inflammatory response of the aortic wall, which was associated with increase in fibroblasts, reinforced aortic tensile strength and less severe tissue destruction. Although acute inflammatory response is detrimental to AD, smooth muscle-regulated inflammatory response seemed protective against AD.

研究分野：医歯薬学

キーワード：大動脈解離 血管 分子生物学

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

1. 研究開始当初の背景

(1) 臨床的背景

大動脈解離は、中膜の突然の破断に引き続き大動脈壁破壊が進行する致命的な疾患である。働き盛りの50代男性に好発し、社会的な影響も重大である。近位部解離に対する外科的治療以外に積極的治療がなく、発症後5年以内に半数近くが大動脈壁破壊の進行による合併症を起こす。病態はほとんど解明されておらず、大動脈壁破壊を阻止する治療法や病態を評価するバイオマーカーもない。

(2) 学術的背景

ヒトおよびマウスモデルの解離組織ではIL-6が高発現し(J Surg Res 2011、J Clin Invest 2009)、IL-6下流のSTAT3が血管平滑筋細胞およびマクロファージで活性化している(自験)。STAT3は細胞の種類により多様な作用を示すが、大動脈解離における役割は不明だった。

(3) 申請者独自の発見

平滑筋STAT3亢進マウスでは、外膜の細胞増殖、コラーゲン線維および強度が増加し、解離が抑制された。逆にSTAT3抑制マウスでは解離が促進された。さらに申請者らはマクロファージ特異的なSTAT3応答亢進マウスでは炎症促進性のM1分化が誘導され解離が促進されることを発見した(CircJ 76, Spp1 2014, AHA2015, ESC2015等)。申請者らはこのモデルを用いて、平滑筋特異的なSTAT3応答抑制マウス(STAT3ノックアウト)およびSTAT3応答亢進マウス(SOCS3ノックアウト)を用いて解離研究を進めてきた(H24-25、H26-27若手研究B)。大動脈解離の発症・進行機構を解明するため、申請者らはコラーゲン架橋酵素阻害薬BAPNとアンジオテンシンIIの2週間投与で解離が発症・進行するモデルを開発した(BAPN+AngIIモデル、Circulation 2012変法)。以上の知見から、平滑筋細胞STAT3活性化は破壊阻止、マクロファージSTAT3活性化は破壊促進という相反する機能を担うことが明らかになった。申請者は、平滑筋STAT3による外膜強化・大動脈保護機構を解き明かすことで、大動脈解離発症後の組織破壊を阻止できる可能性に気づいた。

2. 研究の目的

本研究では、解離における外膜強化を、(1)STAT3活性化、(2)外膜細胞増殖、(3)ECM形成促進に分けて解明することで解離進行阻止療法の開発に挑戦し、さらに、これらに基づく病態モニタリング法を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 動物実験

11-14週齢の各遺伝子改変マウスの雄マウスを用いたBAPN+AngIIモデルを作成し、その組織や細胞を用いて平滑筋STAT3活性化操作の効果を検証した。BAPN+AngII注入(解離刺激)後約7日で解離を発症し始め、14日以内に約70%から80%が解離を発症する。そのため、発症前の組織および分子表現型の分析が可能であり、解離発症に先立つ平滑筋STAT3依存性変化も検討した。

(2) 表現型の解析

大動脈解離の表現型を分析するために、解離刺激前と刺激後14日の大動脈サンプルを採取した。このモデルの大動脈解離病変では、大動脈解離の特徴である中膜の破壊および壁内と外膜両方の血腫形成を伴う大動脈径の増大がみられ、直径が遠位端の1.5倍を超えて拡大した部位を大動脈解離病変と定義した。大動脈を弓部、下行、腎動脈上、腎動脈下に分け、各部位の病変長を組織破壊の重症度の指標とした。

(3) タンパク発現解析

大動脈解離発症前の形態学および分子学的表現型を解析するため、解離刺激前および刺激後3日に大動脈サンプルを採取した。Stat3、リン酸化Stat3(pStat3)、Jnk、リン酸化Jnk(pJnk)、Smad2、リン酸化Smad2(pSmad2)、Lox及びCyclin D3に特異的な抗体を用いてウェスタンブロットを行った。

(4) 組織染色、イメージングサイトメトリー

パラホルムアルデヒド固定後にパラフィン包埋した組織切片を、各々平滑筋、アクチン、pStat3、Ki67に特異的な抗体を用いて免疫染色した。コラーゲン生成の評価として、ピクロシロウスレッド染色を行うための組織切片も採取した。また、線維芽細胞のマーカーであるER-TR7の免疫染色のために、新鮮凍結し、OCT包埋した切片も作成した。SMAとpSmad2、またはSMAとKi67のいずれかで二重染色された組織サンプルはArrayScanXTIでのイメージングサイトメトリーで分析後、FlowJo Softwareでデータ分析した。

(5) トランスクリプトーム解析

液体窒素で急速凍結した大動脈サンプルから全RNAを抽出した。機能的注釈クラスターは、注釈、可視化、および統合発見のためのデータベースv6.8(DAVID, <https://david.ncifcrf.gov/>)により遺伝子オントロジー用語をGOTERM_BP_FAT、GOTERM_CC_FAT、GOTERM_MF_FATにあてはめることで取得した。

(6) ヒト大動脈解離組織

患者から書面によるインフォームドコンセントを得た後、大動脈解離の手術中にヒト大動脈解離組織を採取した。得られた組織は4%パラホルムアルデヒドで固定し、パラフィン包埋した後に5μm厚の組織切片にスライスした。組織切片は、エラスチカ・ファンギーソン(EVG)染色またはpStat3に特異的な抗体による免疫組織化学的染色のいずれかに用いた。

(7) 大動脈壁の機械的性質

我々が考案した血管引張試験装置を用いて大動脈壁の機械的性質を評価した。10mMの2,3-ブタンジオンモノキシムを含むPBSに浸すことで平滑筋細胞(SMC)の収縮を抑制したリング状の大動脈を両側に置かれた2本のタングステン棒(直径0.25mm)の周りに配置し、制御装置に接続されたビデオカメラ、フォースゲージ、およびアクチュエータを備えた顕微鏡の下、一定速度(0.1mm/s)で牽引した。フォースゲージとビデオカメラのデータは同時に記録した。左鎖骨下動脈の分岐部から遠位大動脈弓の末端の大動脈を2mm幅の輪状に採取した。記録を元に得られた波形の鋭いおよび鈍いピークが、それぞれ、内側層および外膜層の最大引張力を示していることが判明した。

4. 研究成果

(1)大動脈解離におけるSTAT3活性化

ヒト大動脈解離組織の大動脈壁破壊部位の外膜及び中膜で活性化(リン酸化)されたStat3が観察された。中膜のStat3が活性している細胞の核は長細く、弾性線維の間に規則正しく配列しており、平滑筋細胞であることを示していた。また、マウス大動脈解離モデルでは、中膜のSMC及び外膜の非SMCでStat3が活性化していた。野生型(WT)及びSTAT3応答亢進マウス(SOCS3ノックアウト)の両方に解離刺激を加え、解離発症前の病態を評価するために、刺激後3日目で大動脈が形態学的には変化しない大動脈を用いて解析した。イメージングサイトメトリー解析により、WTと比べSOCS3ノックアウトの大動脈では、解離刺激前(Pre)及び刺激後3日目の両方で、SMA陰性の非SMCを多く含むことが明らかになった。また、preではSOCS3ノックアウトの大動脈の方がWTよりも高い割合のpStat3陽性細胞を認めた。解離刺激に伴うpSTAT3の増加は、WTではわずかなであったのに対し、SOCS3ノックアウトではより著明であった。SOCS3ノックアウトの大動脈では、pStat3陽性細胞の増加がSMCと非SMCの両方で観察された。これらの結果は、SMCにおけるSOCS3ノックアウトにより、SMC及び非SMC両方にStat3の活性化をもたらすことを示した。さらに、この効果は解離刺激で増強し、SMCにおけるSOCS3ノックアウトは、大動脈における非SMCの増加をもたらした。

(2)大動脈解離病態における平滑筋Socs3の役割

解離刺激により、WTマウス12匹のうち10匹、SOCS3ノックアウトマウス8匹のうち6匹が大動脈解離を発症し、2グループ間で有病率に有意差はなかった。腎動脈下の大動脈には大動脈解離は発症しなかった。4つに分けた他の3つの大動脈(下行、腎動脈上、腎動脈下)と比べ、弓部では、SOCS3ノックアウトマウスと比較してWTの方が有意により重症度が高かった。これらの結果から、SMCにおけるSOCS3ノックアウトマウスが、大動脈弓部における大動脈解離の悪化を抑制したが、有病率には影響を及ぼさなかったことがわかった。

(3)大動脈におけるシグナル伝達経路と平滑筋細胞の表現型

解離刺激3日後のWTの大動脈では、Smad2、Lox及びCyclin D3の発現レベルが有意に増加した。解離刺激により、WTの大動脈ではSMCの合成表現型のマーカーであるSMembの発現が増加した。大動脈におけるJnkの発現および活性化は、解離刺激前よりも後の方が高い傾向にあったが、その差は有意ではなかった。マトリックスメタロプロテイナーゼ(Mmp)-2及びMmp-9は検出されなかった。これらの知見は、3日間の解離刺激が、細胞周期の活性化、ECM合成及び未分化型への形質変換を引き起こすことを示した。しかし、この時点でのWTの大動脈においては、解離刺激は、有意な炎症応答や組織破壊的な応答は引き起こさなかった。SOCS3ノックアウトマウスの大動脈は、WTの大動脈よりも有意に高いStat3活性を示し、この結果は、平滑筋Socs3のノックアウトがin vivoでも大動脈のStat3経路を効果的に活性化することを示した。また、Stat3の活性化は、Jnkの活性化を伴っていた。WTの大動脈とは対照的に、SOCS3ノックアウトマウスの大動脈においてサイクリンD3またはLoxの発現は解離刺激により変化しなかった。注目すべきことに、SOCS3ノックアウトマウスの大動脈は、WTの大動脈と比較して、収縮表現型SMCのマーカーであるSM2とSMembの両方の発現レベルが高かった。しかし、SOCS3ノックアウトマウスの大動脈におけるSM2またはSMemb発現レベルは、解離刺激では変化しなかった。これらの結果は、preでの炎症応答は、WTの大動脈よりもSOCS3ノックアウトマウスの大動脈においてより高かったが、後者は解離刺激への応答が乏しいことを示唆した。

(4)トランスクリプトーム解析

SOCS3ノックアウトの表現型の根底にある分子メカニズムの理解を深めるために、マイクロアレイトランスクリプトーム解析を行い、DAVIDで機能的解析を行った。解離刺激前のベースラインでWTとSOCS3ノックアウトの間で異なる発現の変化を示した遺伝子に焦点を当てた。DNAマイクロアレイで得られた55,681プローブのうち、WTと比較してSOCS3ノックアウトマウスで発現が増加していた遺伝子は337個、減少していた遺伝子は132個であった。DAVIDを用いて機能解析を施行した。SOCS3ノックアウトマウスの大動脈において発現が増加した遺伝子は、enrichment scoresが3以上の167個の遺伝子を含む4つのクラスターに配分された。これらのクラスターに対する代表的なGO termは、「サイトカインに対する反応」、「細胞外空間」、「防御反応」、「免疫反応」及び「炎症応答」であった。対照的に、SOCS3ノックアウトの大動脈において発現が増加した遺伝子のenrichment scoresはわずか1.49であったため、この遺伝子は特定の機能に帰属させなかった。これらの結果から、SMCにおけるSocs3の欠失が炎症応答の活性化及び大動脈における細胞外環境の変化をもたらすことが示唆された。

(5)大動脈解離における細胞合成と増殖応答

大動脈解離発症時の早期反応を観察するため、解離刺激の有無ごとに、WT 及び SOCS3 ノックアウトマウスの大動脈において SMA 及び Ki67 (増殖細胞マーカー) の二重染色を行った。その結果、WT の大動脈に含まれる細胞の約 80% が SMA 陽性の SMC であった。解離刺激により、SMA 陽性細胞の SMA 発現の減少と同時に、非 SMC がわずかに増加した。SOCS3 ノックアウトの大動脈では、ベースライン時に大動脈に含まれる細胞の 30% 以上が SMA 陰性の非 SMC であった。Ki67 染色の結果は、WT の大動脈では、ベースラインにおける細胞増殖応答がごくわずかであることを示した。解離刺激により、SMA 陰性細胞において Ki67 陽性細胞が増加した(刺激前 4.9%、刺激後 26.7%)。WT の大動脈と比べ、SOCS3 ノックアウトの大動脈では、刺激前から Ki67 陽性細胞がわずかに高かった。解離刺激後の細胞増殖応答は、SMC、非 SMC のいずれにおいても、WT よりも SOCS3 ノックアウトの大動脈で低かった。これらの結果は、WT よりも SOCS3 ノックアウトの大動脈において解離刺激前の非 SMC がより豊富であり、SOCS3 ノックアウトの大動脈は、解離刺激に対する細胞増殖応答が弱いことを示した。

(6) STAT3 応答亢進マウスの大動脈外膜におけるコラーゲン増加

上記の結果は、ベースライン時における非 SMC の割合が WT と比較して SOCS3 ノックアウトの大動脈でより高いことを示した。この SMA 陰性細胞の細胞型を同定するため、様々な細胞型マーカーの特異抗体で染色した。線維芽細胞のマーカーである ER-TR7 が、WT よりも SOCS3 ノックアウトにおいてより強く染色された。WT と比較して、SOCS3 ノックアウトの大動脈の外膜と中膜の一部で顕著であった。次に、解離刺激前後の大動脈をピクロシリウスレッドで染色し、WT 及び SOCS3 ノックアウトの大動脈のコラーゲン線維を検出した。その結果、コラーゲン沈着は解離刺激前と後いずれにおいても、WT よりも SOCS3 ノックアウトの大動脈でより顕著であった。この線維化は、中膜に隣接する外膜において特に顕著であった。これらの知見は、SMC における SOCS3 ノックアウトが外膜の線維化および大動脈壁における線維芽細胞の増加を促進したことを示した。

(7) 大動脈壁強度における Socs3 の役割

解離刺激前の大動脈壁の引張強度を測定した。WT と SOCS3 ノックアウトマウスの遠位大動脈弓から輪状に大動脈を採取し、外側方向に引っ張って引張強度を測定した。測定中の動画及び張力の同時記録により、内膜が外膜と比較してより高い引張強度を有し、伸張はより短いことが明らかとなった。これらの所見は、ヒトの大動脈では、中膜の弾性線維が負荷の大部分受け、外膜のコラーゲン線維が緩いネットワークを形成しているという概念と一致していた。WT と SOCS3 ノックアウトの大動脈の間で内膜の引張強度に有意差はなかった。対照的に、外膜の引っ張り強度は、WT よりも SOCS3 ノックアウトの大動脈の方が高かった。これらの結果は、SMC における SOCS3 ノックアウトによって引き起こされる線維芽細胞及び外膜のコラーゲン増生が大動脈壁の外膜を強化することを示唆した。

(8) 結論

本研究により、SMC における SOCS3 ノックアウトが大動脈壁の線維芽細胞及びコラーゲン増生を促進し、それが大動脈壁の引張強度を強化することが示された。この反応は、損傷を受けた大動脈組織を安定化し、そして大動脈解離の進行を阻止するのに重要であると考えた。大動脈組織中の細胞における炎症性シグナル伝達および細胞間相互作用についての今後の研究は、大動脈解離の病因、この生命を脅かす大動脈疾患を治療するための新しい診断および治療戦略を開発するための前提条件の改善された、より正確な理解につながる可能性があります。

5. 主な発表論文等

{雑誌論文} (計 3 件)

Ohno-Urabe S, Aoki H, Nishihara M, Furusho A, Hirakata S, 他 8 名, Role of Macrophage Socs3 in the Pathogenesis of Aortic Dissection. J Am Heart Assoc 7, 2018, 10.1161/JAHA.117.007389

Furusho A, Aoki H, Ohno-Urabe S, Nishihara M, Hirakata S, 他 8 名, Involvement of B Cells, Immunoglobulins, and Syk in the Pathogenesis of Abdominal Aortic Aneurysm. J Am Heart Assoc 7, 2018, 10.1161/JAHA.117.007750

Nishihara M, Aoki H, Ohno S, Furusho A, Hirakata S, 他 5 名, The role of IL-6 in pathogenesis of abdominal aortic aneurysm in mice. PLOS ONE, 2017, 10.1371/journal.pone.0185923

{学会発表} (計 2 件)

Saki Hirakata, Stat3 in smooth muscle cells prevent the progression of AD by reinforcing the physical strength of aortic walls. 第 82 回日本循環器学会学術集会, 2018

Saki Hirakata, H. Aoki, M. Nishihara, S. Ohno, A. Furusho, N. Nishida, S. Ito, M. Hayashi, H. Tanaka, Y. Fukumoto: STAT3 in vascular smooth muscle cells protects aorta from dissection by reinforcing extracellular matrix. ESC Congress Rome 2016

{図書} (計 1 件)

Aoki H, Ohno S, Furusho A, Nishihara M, Nishida N, Hirakata S, Yoshimura K (2016). Mouse Model of Abdominal Aortic Aneurysm Induced by CaCl₂.

〔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)研究分担者

研究分担者氏名:田中 啓之

ローマ字氏名: (TANAKA HIROYUKI)

所属研究機関名:久留米大学医学部

部局名:心臓・血管外科

職名:教授

研究者番号(8桁):70197466

(2)研究協力者:なし

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。