

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02811

研究課題名(和文) 平滑筋ミオシン変異による家族性大動脈解離の分子機構と血管老化機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of familial aortic dissection by smooth muscle myosin mutation and elucidation of vascular aging mechanism

研究代表者

永井 良三 (Nagai, Ryoza)

自治医科大学・医学部・学長

研究者番号：60207975

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)：家族性胸部大動脈瘤および解離(FTAAD)の原因となるミオシン重鎖(Myh11)の病理性多様体Myh11del1256 Kマウスを樹立した。Myh11 K/ Kマウス大動脈は、血管壁厚増加と、細胞接着低下を含む微細構造異常、収縮性の減少を示し、Myh11 K/+マウスは、アンギオテンシン刺激で大動脈解離と壁内血腫を発症した。その機構は、インテグリンサブユニット 2(Itga2)の減少であった。Itga2の減少による細胞接着の影響が大動脈の収縮に欠陥を引き起こすことを示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性大動脈解離は、突然大動脈壁に亀裂を生じ、大動脈破裂や血管の閉塞等の致命的な合併症を引き起こす致死性疾患である。FTAAD家系の38歳女性は第3子を妊娠中後期に胸部大動脈解離を発症し死亡している。幸い女兒が誕生したが動脈管開存症(PDA)を有し、治療法開発が急がれる。予測や予防が非常に難しく、長年臨床医学上の問題とされてきた疾病の機構を明らかにし、治療法開発に繋げることは社会的に意義があると思われる。

研究成果の概要(英文)：We established a pathogenic variant of the myosin heavy chain (Myh11), known to cause familial thoracic aortic aneurysm and dissection (FTAAD), in the form of Myh11del1256 K mice. The Myh11 K/ K mice exhibited thickening of the vascular wall, microscopic structural abnormalities including decreased cell adhesion, and reduced contractility in the aorta. The Myh11 K/+ mice developed aortic dissection and intramural hematoma upon angiotensin stimulation. The underlying mechanism involved a decrease in the integrin subunit 2 (Itga2). The impact of reduced cell adhesion due to Itga2 depletion suggested a defect in aortic contraction.

研究分野：循環器内科学

キーワード：平滑筋ミオシン 家族性大動脈解離

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

急性大動脈解離は、突然大動脈壁に亀裂を生じ、大動脈破裂や血管の閉塞等の致命的な合併症を引き起こす致死性疾患である。大動脈壁が中膜で二層に剥離するが、その原因が明らかでないことから、予測や予防は非常に難しく、長年臨床医学上の問題とされてきた。平滑筋ミオシン遺伝子変異をもつ家族性大動脈瘤・解離(FTAAD)のように遺伝的背景を有することも多い。大動脈解離は動脈硬化を背景としても生ずる。両疾患に共通の病態が、血管平滑筋の形質転換である。このため収縮型平滑筋から合成型平滑筋への変換の機序を解明し、この変換を防止することは、動脈硬化や大動脈瘤、大動脈解離の有効な予防法になると考えられる。我々は1980年代に平滑筋細胞で発現するミオシン重鎖アイソフォーム(SM1、SM2、SMemb)の研究を開始(PNAS 1987)、これらのミオシンが発生過程と動脈硬化における平滑筋形質転換の分子マーカーとなることを見出し(JBC 1989,1989,1991)、合成型平滑筋で発現する胎児型ミオシン SMemb 遺伝子の転写因子 KLF5 を単離同定した。さらに、KLF5 が平滑筋形質変換と動脈硬化を促進すること(Circ Res 1999, Nat Med 2002, Circ Res 2005)を報告した。実際、KLF5 を欠失したヘテロマウスは、大動脈損傷後の内膜肥厚が乏しく、血管周囲の肉芽組織の形成も不良である。また、KLF5 を多く発現する平滑筋細胞は、臨床的にも冠動脈再狭窄を繰り返す(Circulation 2000)。さらに、心臓線維芽細胞で発現する KLF5 は心臓への負荷に回答し、心筋細胞肥大因子である IGF1 を大量に発現し、心臓の組織再構築により負荷に回答する(JCI 2010)。これらの基礎研究の一方で、遺伝性の家族性大動脈疾患にも注目し、多くの家系の遺伝子解析を進めてきた。その過程で高率に大動脈解離を発症する独立した2家系を見出し、解析の結果、SM1 と SM2 ミオシンをコードする Myh11 遺伝子の変異(Exon29 の1263番目のリジン残基欠損)を有することを報告した(Int J Cardiol 2015)。なかでも38歳の女性は、第3子の妊娠中後期に胸部大動脈解離を発症し死亡している。幸い女兒が誕生したが動脈管開存症(PDA)を有し、治療開発が急がれる。以前、動物のボタ口管における平滑筋ミオシン SM2 の早期の発現を報告しており(Circulation 1993)、これをコードする遺伝子変異である本家系で PDA が現れることは、平滑筋分化と PDA 発症の関係性を証明したといえる。

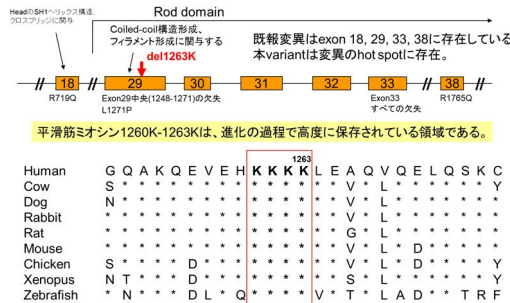


図1. Myh11 del1263K 変異 1260-1263 番目の4つの連続するリジン残基(4K)は種族を超えて認められ、進化の過程で高度に保存されている領域である。

2. 研究の目的

Myh11 の構造的特徴として、1260-1263 番目の4つのリジンは種族を超えて認められ、進化の過程で高度に保存されている領域であり、その重要性が示唆される(図1)。約200kDaの平滑筋ミオシン重鎖の尾部のわずか一つのリジンが欠損することが、なぜ血管平滑筋の形質転換を促し大動脈解離に到るのかは、生物物理学、細胞生物学、血管生物学の大きな謎である。その分子細胞機構が解明されれば、治療開発に繋がると期待される。

3. 研究の方法

(1) Myh11 1256 K 欠損変異マウス

ヒトの Myh11 del1263K 変異はマウスでは Myh11 del1256 K に当たる。標準的な CRISPR-Cas9 システムを用いて、この変異体を B6 マウスに導入することを試みた(図2A)が、この遺伝子操作は胚致死をもたらした。CRISPR-Cas9 システムのオフターゲット効果を低減するために、Cas9(D10A)mRNA を使用して4匹のファウンダーマウスを作出した(図2B,C,D)。ホモ接合体産仔のためにヘテロ接合体を交配したが、原因不明により仔を生育できなかった。ホモ接合体ファウンダーマウスは生後4週で突然死亡した(原因は不明だが大動脈疾患ではない)。そこで、死亡したホモ接合体からの精子で B6 雌との体外受精-胚移植を行った。その結果、次世代のヘテロ接合体が5匹得られ、3回以上バッククロスし得られた野生型(WT)、ヘテロ接合体(Myh11^{ΔK/+})及びホモ接合体(Myh11^{ΔK/ΔK})マウスを解析に用いた。全てのマウスの遺伝子型を遺伝子改変部位の DNA 配列解析により決定した(図2E)。ポンプの埋め込みなどの侵襲的処置の前に三種混合麻酔し、ペダル反射がないことを深い麻酔の指標とした。マウスから組織をサンプリングする前に安楽死させた。子宮の組織学的分析を除いて、この研究では雄マウスを使用した。

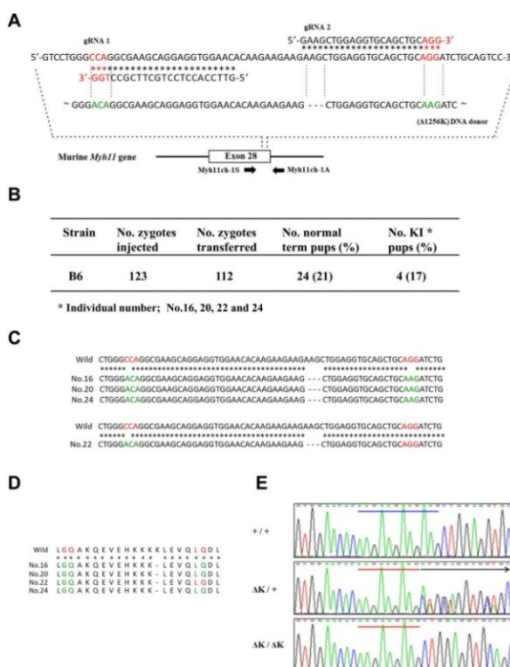


図2. CRISPR/Cas9 システムを用いた Myh11(Δ1256K)マウスの作成

(2)病理組織学

取り出した大動脈、膀胱および子宮を 4% パラホルムアルデヒドで固定し、パラフィンに包埋した。パラフィン包埋組織を厚さ 5 μ m のスライスに切片化し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)、エラスチカ・ワンギーソン(EVG)、マッソントリクローム(MT)で染色した。ImageJ/Fiji を用いて形態計測解析を行った。抗 SM1 抗体および抗 SM2 抗体による免疫染色についても、前述のように実施した。

(3)大規模電子顕微鏡画像

胸部大動脈をリン酸緩衝液(PB、pH7.4)0.1 mol/L 中の 2.5% グルタルアルデヒドで固定し、続いて 0.1 mol/L PB 中の 1% 四酸化オスミウムで固定した。サンプルをエポキシ樹脂に包埋し、厚さ 70nm の極薄切片に切断し、酢酸ウラニルとクエン酸鉛で染色した。走査型電子顕微鏡(JSM-7800F、日本電子)を用いて、横断面全体を覆う区画化された長方形領域の数百枚のデジタル画像を取得した。すべての画像を 1 つにつなぎ合わせ観察した。

(4)平滑筋収縮の解析

麻酔をかけたマウスから約 10 mm の大動脈リングを取り出し、クレブス液を満たしたマグナス管(20 mL)にステンレス鋼クリップで取り付け、37°C に維持し、実験中 95% O₂/5% CO₂ で通気した。全てのリングストリップを 10mN で前負荷し、60 分間インキュベートした。その後のフェニレリン(Phe)投与までの収縮を順次決定し、組織重量で補正した。Phe に対する収縮反応のピーク(10⁻⁵ mol/L)に達した後、アセチルコリン(Ach)およびニトロプルシドナトリウム(SNP)を投与し拡張率を得た。

(5)大動脈解離モデル

浸透圧ミニポンプを 8 週齢マウスに移植した。ポンプに Ang II 溶液(アンジオテンシン)を 1000ng/kg/min の速度で注入されるよう充填した。収縮期血圧は、移植前と Ang II 投与の 2 週間後に測定した。2 週間生存したすべてのマウスを屠殺し、大動脈を取り出した。

(6)RT-qPCR

トータル RNA 抽出および RT-qPCR は、標準的な手順に従って実施した。種々の遺伝子のプライマーを設計し、使用した。実験は三重で行い、全てのデータを *Gapdh* の発現量で標準化した。

(7)イムノプロット解析

タンパク質溶解物は胸部大動脈から調製した。各サンプルの総タンパク質 5 μ g を、10% ビストリスゲルまたは 3~8% トリスアセテートゲルを用いて SDS-PAGE により分離し、iBlot2 ドライプロットングシステムを使用してニトロセルロースメンブレン上に転写し、一次抗体でイムノプロットした。メンブレンを適切な西洋ワサビペルオキシダーゼ結合二次抗体とともに一晩インキュベートし、化学発光キットで可視化し、解析した。

4. 研究成果

(1) *Myh11*^{ΔK/ΔK} 大動脈は中膜と外膜は肥厚していた

構造的特徴評価のために大動脈の組織学的観察を行った。*Myh11*^{ΔK/ΔK} マウスの中膜と外膜は WT に比べて血管壁厚が増加していたが、内腔の円周長は変化がなかった(図 3B)。大動脈の領域(上行、下行、腹部)はいずれも解離率は高くなかった。マウスを解剖したところ、*Myh11*^{ΔK/ΔK} では遠位大動脈弓と肺動脈とをつなぐシャント血管が観察され(図 3C)、FTAAD に頻繁に関連付けられている PDA に類似していた。さらに、膀胱の肥大、パンチアウトや平滑筋層間の隙間などの不均一な染色、水腎症を示す腎臓の腫れが観察された。子宮では形成不全が観察され、平滑筋層(筋腫)の厚さ

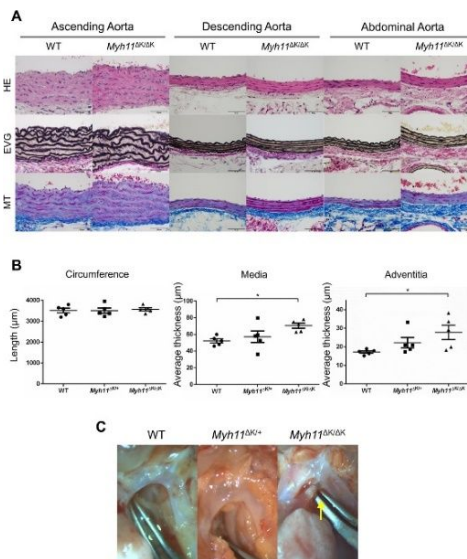


図 3. マウス大動脈表現型の比較

(A)大動脈壁(上行、下行、腹部大動脈)断面 HE,EVG,MT 染色。*Myh11*^{ΔK/ΔK} 大動脈は弾性繊維の部分的な裂け目と中膜と外膜の厚さの増加を示す。(B)形態測定パラメータ。円周長は WT,*Myh11*^{ΔK/ΔK} の間で変わらない。(C) 血管の肉眼的な外観。PDA と見なされる遠位大動脈弓と肺動脈の間のシャント血管が見られた。

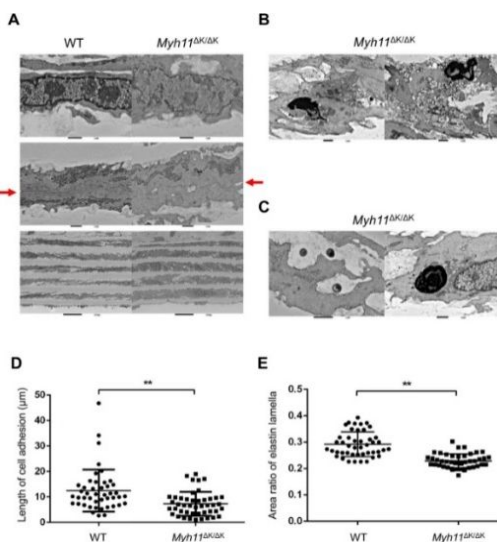


図 4. 大規模電子顕微鏡画像

Myh11^{ΔK/ΔK} 大動脈の細胞内ストレスの増加、弾性板の減少、及び細胞接着の減弱を示す。

を定量化したところ、*Myh11*^{ΔK/ΔK} の子宮筋層は WT より薄かった。

(2) *Myh11* 変異大動脈では平滑筋細胞の接着と細胞外マトリックスの組成が减弱していた

電子顕微鏡での大動脈微細構造の結果、変異核内の核膜が薄くなり、多数の顆粒状成分が明らかになった(図 4A、上段)。核形態において一般的なユークロマチン及びヘテロクロマチンの減少が観察され、活発な転写活性を示した。これは、変異型 SMC(平滑筋細胞)の一部において収縮表現型から合成表現型への潜在的なシフトを示唆した。*Myh11*^{ΔK/ΔK} SMC はまた、他の隣接細胞への細胞接着の减弱を示し、WT SMC に比べて接着面の幅が大きくなっていった(図 4A、中、下段)。さらに、細胞小器官の増加や残屑など死細胞でよく見られる特徴が観察された(図 4B)。また、WT ではあまり見られないミエリン像として知られる同心円状の層状浸透圧物質が、変異型 SMC の内側または外側に見つかった(図 4C)。SMC の細胞間接着の長さ、弾性板面積は *Myh11*^{ΔK/ΔK} 大動脈で大幅に減少した(図 4D,E)。

(3) *Myh11*^{ΔK/ΔK} SMC では収縮機能が减弱した

大動脈リングの等尺収縮力を測定し、マウス胸部大動脈の SMC 収縮性を評価した。*Myh11*^{ΔK/ΔK} マウス大動脈は WT 大動脈と比較して血管収縮薬フェニレフリン(Phe)に反応して発生する力が有意に減少した(図 5A)。Phe または KCl 処理に反応して発生する最大力についても有意に減少した(図 5B)。これは、*Myh11*^{ΔK/ΔK} SMC の収縮性が低下したことを意味する。*Myh11K1256del* は大動脈壁の機械的適応の減少に寄与する可能性がある。対照的に、アセチルコリン(Ach:内皮依存性血管拡張薬)またはニトロプルシドナトリウム(SNP:内皮非依存性血管拡張薬)に反応する血管拡張機能は、WT と *Myh11*^{ΔK/ΔK} の間で同等であった(図 5C)。

(4) Ang II 誘発 *Myh11 K1256del* 変異大動脈解離

Myh11 K1256del に関連する大動脈解離の病理学的メカニズムを調べるために、ポンプを用いて Ang II を投与した。収縮期血圧は、投与前と投与後に測定した。Ang II 投与マウスは収縮期血圧の上昇を示したが、WT と *Myh11*^{ΔK/+} マウスの間に有意差はなかった。また、*Myh11*^{ΔK/+} マウスでは胸部および腹部に小さな壁内血腫が頻りに観察された。大動脈解離は 6 匹の *Myh11*^{ΔK/+} マウスで発生し(40.0%)、また 2 匹(13.3%)が動脈瘤破裂で死亡した。対照的に、壁内血腫または大動脈解離は、Ang II 投与 WT マウスでは誘発されなかった。さらに、十分な数の Ang II 投与 *Myh11*^{ΔK/ΔK} 解析用マウスの生成を試みたが、ほとんどのマウスが動脈瘤破裂で死亡したため、大動脈サンプルの入手は困難であった。予備実験では、3,4 匹の Ang II 投与 *Myh11*^{ΔK/ΔK} マウスは注入開始後 2~4 日で突然死亡した。これらのマウスを解剖し、上行大動脈または大動脈弓に破裂を発見した。組織学的には、Ang II 投与 *Myh11*^{ΔK/ΔK} 大動脈は弾性板の断片化と線維組織沈着と管腔拡張を示した(図 6A,B)。WT 及び *Myh11*^{ΔK/ΔK} 大動脈における Ang II 受容体 1 型(AGTR1)の発現に有意差は認められなかった。

(5) 平滑筋ミオシン重鎖アイソフォーム、平滑筋収縮関連タンパク質の発現及びリン酸化

電子顕微鏡写真上の変異型 SMC の形態学的特徴は、SMC における収縮表現型から合成表現型への変化を示唆しているため、SMC 分化を示す大動脈における SM アイソフォーム(SM1 及び SM2)の発現を解析した。しかし、変異型大動脈における SM1 および SM2 の発現は、WT マウスと

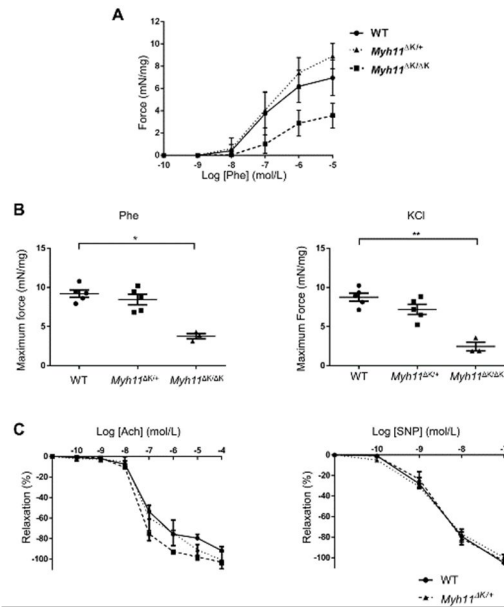


図 5. *Myh11K1256del* は *Myh11*^{ΔK/ΔK} SMC の収縮機能を减弱させる。

(A)Phe によって誘発される大動脈の用量依存性収縮に対する *Myh11 K1256del* の効果。(B)Phe 又は KCl 処理による大動脈が生成した最大力。(C)Phe 収縮反応後の Ach 及び SNP に反応した下行大動脈の弛緩割合。

(4) Ang II 誘発 *Myh11 K1256del* 変異大動脈解離

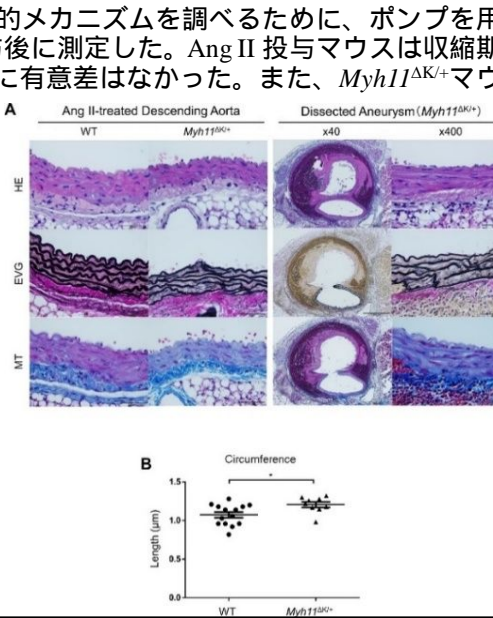


図 6. Ang II 投与は *MYH11*^{ΔK/+} マウスの大動脈解離を誘発する

(A)Ang II 投与 WT 及び *Myh11*^{ΔK/+} マウスの下行大動脈の病理画像。断面を HE、EVG 及び MT で染色した(上パネル)。パネルの左側は、解剖されていない領域における弾性板断片化と線維性組織沈着を示す。(B) WT と *Myh11*^{ΔK/+} の Ang II 投与 14 週間後の胸部上行大動脈円周の長さ。

比較して異常を示さなかったため、大動脈平滑筋は急性血管損傷に見られるような表現型調節を全体的に受けないことが分かった(図7A,B)。

平滑筋収縮に關するタンパク質の発現またはリン酸化が *Myh11*^{ΔK/ΔK} SMC で変化しているかどうかをさらに調べるため、RT-qPCRによるこれらの遺伝子(平滑筋アクチン α : *Acta2*、SM-MHC:*Myh11* 及びカルポニン:*Cnn1*)の発現およびイムノブロットングによるタンパク質レベルとミオシン調節鎖(RLC)リン酸化のレベルの測定を行った。しかし、WT と *Myh11*^{ΔK/ΔK} の間に有意差はなかった(図7C,D,E,F)。焦点接着キナーゼ(FAK)のリン酸化レベルも差がなかった(図7G)。また、TADの病態形成に關連するTGF- β (*Tgfb1*)とその下流カスケードの転写因子(結合組織増殖因子:*Ctgf*、*Mmp2*、*Mmp9*)の遺伝子発現を調べたが、WT と *Myh11*^{ΔK/ΔK} 大動脈の間に発現に有意差は認められなかった(図7C)。

(6) *Myh11*K1256del 人工多能性幹細胞(iPS)の幹細胞性

*Myh11*K1256del が in vitro で大動脈解離をもたらすメカニズムを調べるために、マウス胚性線維芽細胞から山中因子(*Oct3/4*、*Sox2*、*Klf4*、*c-Myc*)を用いて iPS 細胞(iPSC)を樹立し、*Myh11*^{ΔK/ΔK}iPSC と WT iPSC を比較した。アルカリフォスファターゼ陽性コロニーの数は変わらなかった。次に、胚様体(EB)を作製して多能性を評価した。WT EB は拍動細胞を産生したが、*Myh11*^{ΔK/ΔK}iPSC 細胞由来 EB のほとんどは非拍動性および非接着性であり、*Myh11* K1256del が多能性の維持を損なうことを示唆していた。各遺伝子型は、レトロウイルス形質導入後 11 日間は同様の形態を有していたが、*Myh11*^{ΔK/ΔK} コロニーは形態を保たず、3 継代目で顆粒細胞が出現し始めた。次に、山中因子に加えて *Nanog* を追加したところ、*Myh11*^{ΔK/ΔK}iPSC 細胞は ESC 様形態を維持した。

(7) 細胞接着関連遺伝子の減少

Nanog は α -カテニン遺伝子(*Ctnna2*)のエンハンサー領域に結合し、iPSC の幹細胞性が *Nanog* の強制発現によって改善されるため、遺伝子オントロジー(GO)データベースを用いた細胞接着への関与と *Myh11*^{ΔK/ΔK} 大動脈のダウンレギュレーション遺伝子を RNA シーケンシングにより同定した。データベースによる遺伝子の相互作用では *Ctnna2* が細胞間接着に関わる分子との相互作用が最も多いことが明らかになった。白血病抑制因子(LIF)を含まないレチノイン酸(RA)を含む培地で細胞を培養することにより、iPSC を SMC 系統に分化誘導した。分化 5 日目の時点で、細胞は SMC 様形態を呈していなかった(図 8A)。*Myh11* は、分化 3 日目には遺伝子型に関係なくアップレギュレーションされており(図 8B)、細胞が SMC 系統にコミットしていたことを示す。インテグリンサブユニット $\alpha 2$ (*Itga2*)は、SMC 特異的 Smad4 ノックアウトマウスの動脈瘤大動脈においてダウンレギュレーションされており、STRING タンパク質間相互作用分析では、*Itga2* が *Myh11*^{ΔK/ΔK} 大動脈でダウンレギュレーションされた焦点接着関連分子との相互作用の数が 2 番目に多いことを示した。SMC 系細胞の *Itga2* mRNA 発現の測定においても、*Myh11*^{ΔK/ΔK} 由来では *Itga2* 発現の有意な減少を示した(図 8C)。

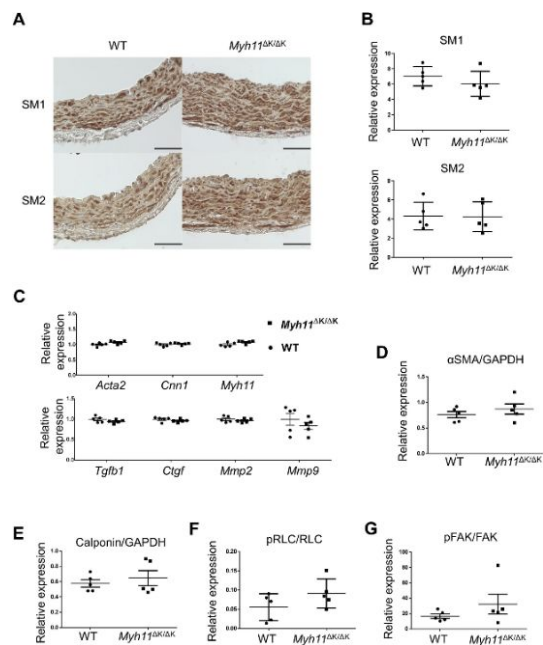


図 7. *Myh11*^{ΔK/ΔK}+大動脈におけるタンパク質の発現とリン酸化

免疫染色(A: SM1, SM2)、タンパク質発現レベル(B, D, E: SM1, SM2, α SMA, Calponin)、関連遺伝子発現(C)リン酸化の割合(F, G: RLC, FAK)を調べたが WT と比較してすべて差はなかった。

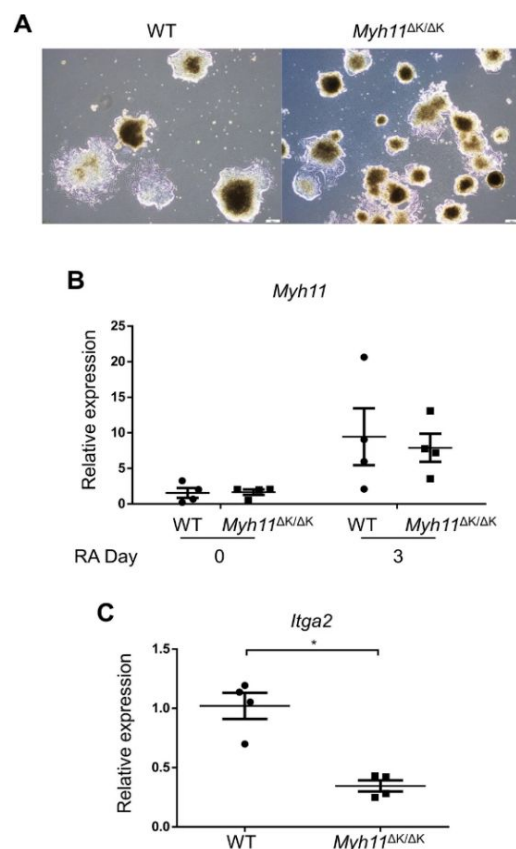


図 8. *Itga2* は、*Myh11*^{ΔK/ΔK}iPSC 由来 SMC 系細胞において減少する

(A) RA による分化 5 日目の iPSC 細胞(WT と *Myh11*^{ΔK/ΔK})の位相差画像。(B) RA 処理 0 及び 3 日目における *Myh11* 遺伝子発現レベルは WT に比べて差がなかった。(C) RA による分化 3 日目の *Itga2* 遺伝子発現レベルは WT と比較して有意に減少した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Keita Negishi, Kenichi Aizawa, Takayuki Shindo, Yuichiro Saito, Toru Suzuki, Kazuomi Kario, Ryoza Nagai, Yasushi Imai
2. 発表標題 A deletion mutation in myosin heavy chain MYH11 reduces the contraction force of the aorta resulting in aortic dissection
3. 学会等名 第83回日本循環器学会学術集会（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	相澤 健一 (Aizawa Kenichi) (70436484)	自治医科大学・医学部・准教授 (32202)	
研究分担者	仲矢 丈雄 (Nakaya Takeo) (80512277)	自治医科大学・医学部・講師 (32202)	
研究分担者	宮川 拓也 (Miyakawa Takuya) (50596559)	東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・特任准教授 (12601)	
研究分担者	田之倉 優 (Tanokura Masaru) (60136786)	東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・特任教授 (12601)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	今井 靖 (Imai Yasushi) (20359631)	自治医科大学・医学部・教授 (32202)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関