

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 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：2015～2017

課題番号：15K10249

研究課題名(和文) 大動脈解離におけるマクロファージ分化制御機構の解明と治療応用への挑戦

研究課題名(英文) Macrophage differentiation in the pathogenesis of aortic dissection

研究代表者

大野 聡子(OHNO, Satoko)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：80569418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：血行動態負荷によって生じた大動脈の微小損傷は、マクロファージStat3活性を亢進したmSocs3-KOで解離に進展した。mSocs3-KOの微小損傷ではマクロファージが炎症性優位に機能分化し、平滑筋は血行動態負荷により増殖応答と組織修復能が増加したが、微小損傷では有意に低下していた。修復能低下のメカニズムとして、増殖応答の阻害因子で細胞老化や組織修復能の低下にも深く関わるlnk4a/Arf発現が亢進していることを発見した。マクロファージ機能分化により炎症が亢進される一方、修復能を持つ平滑筋への機能分化が抑制されることにより解離を発症すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We examined the hypothesis that macrophage Stat3 promotes the aortic dissection (AD) through the differentiation of macrophage and vascular smooth muscle cell (VSMC). We found that macrophage-specific Socs3-KO (mSocs3-KO), in which Stat3 is enhanced specifically in macrophages, developed AD following minor aortic injury by aortic stress. In mSocs3-KO, macrophages predominantly differentiated to proinflammatory phenotype, resulting in the aortic inflammation enhancement. In the wild type, VSMC showed increase in tissue repair function upon aortic stress. In contrast, the tissue reparative phenotype of VSMC was suppressed in mSocs3-KO. As the mechanism of the dysregulation of VSMC, lnk4a/Arf, an inhibitor of proliferation which is also well known as the regulator of tissue repair, was highly expressed at minor injury in mSocs3-KO. These results indicated that development of AD is driven by the imbalance of destruction and repair during the inflammation following the aortic stress.

研究分野：心臓・血管内科

キーワード：大動脈解離 マクロファージ 平滑筋 サイトカイン 増殖応答 炎症 機能分化 組織修復

1. 研究開始当初の背景

大動脈解離は大動脈壁が突然破断する致死的疾患である。治療法は外科的手術に限られ、術後や保存的療法後の慢性期に重篤化することも少なくない。解離では分子病態が不明のため適切な病態モデルがなく、そのことがさらに病態解明を難しくしている。

これまで解離の分子病態解明に取り組む中で、血行動態負荷により大動脈に微小損傷が生じ、野生型では6週目までに治癒するのにに対し、マクロファージ Stat3 活性化を亢進した mSocs3-KO では解離へ進展することを発見した。経時的な遺伝子発現解析によると、血行動態負荷によりまず増殖応答の亢進が見られ、次いで炎症応答の亢進が続いていた。mSocs3-KO ではこれらの変化がより早期に見られた。また、mSocs3-KO では平滑筋に関わる遺伝子発現の抑制が見られた。細胞の機能分化に着目したところ、mSocs3-KO ではマクロファージが炎症性優位に分化しており、炎症の亢進による解離発症を示唆した。しかし、解離における増殖応答や平滑筋の機能分化の意義は不明である。

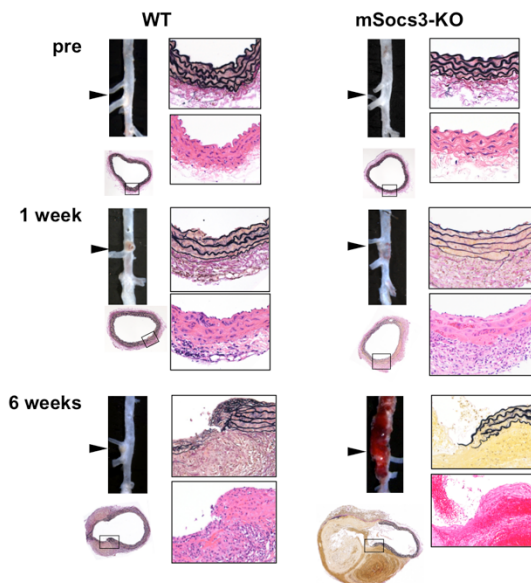


図 1. 血行動態負荷で大動脈に微小損傷を生じた(1week)。野生型では治癒し、mSocs3-KO では解離に進展した(6weeks)。

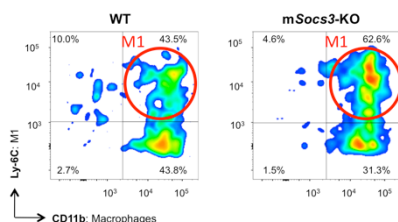


図 2. 微小損傷におけるマクロファージの機能分化 mSocs3-KO では炎症性優位に分化していた。

2. 研究の目的

申請者らは、マクロファージ Stat3 が大動脈壁の炎症と修復の不均衡を来し、解離に至るとの仮説に基づき研究を重ねてきた(H22-23 科研費 若手研究 B, H24-27 科研費 若手研究 B)。これまでの研究でマクロファージ Stat3 がマクロファージを炎症性への機能分化を誘導し、炎症を亢進させることを明らかにした。一方で、マクロファージ Stat3 が解離病態に修復能低下をもたらすかどうかは明らかでなかった。

平滑筋は大動脈を構成する主たる細胞で、刺激に対し反応性に合成型平滑筋へ分化して組織修復能を発揮すること (*Histochem Cell Biol.* 2016)や、遺伝性解離の多くでは平滑筋の遺伝子異常があること (*Circulation* 2016) が知られており、平滑筋機能は解離病態に影響すると考えられる。また、我々の研究でも解離発症前に平滑筋に関連する遺伝子発現が抑制されており、なんらかの機能分化が起こっていることが示唆された。

以上の知見より、マクロファージ Stat3 亢進はマクロファージの炎症性分化を含めた炎症応答の亢進だけでなく、平滑筋を介した大動脈の修復能を抑制し解離に至るとの仮説を着想した。本研究では、マクロファージ Stat3 が平滑筋の機能分化・組織修復能低下を来し、炎症と修復の不均衡が微小損傷を解離へ進展させることを明らかにする。

3. 研究の方法

マウス血行動態負荷モデル

マクロファージ特異的にIL-6下流の Stat3 活性化が亢進するマクロファージ特異的 Socs3 ノックアウト (mSocs3-KO)を用いた。

腎動脈以下に0.5MのCaCl₂を塗布して大動脈硬化を惹起し、浸透圧ポンプでAng II 1 γ を持続投与する血行動態負荷モデル (*Scientific Reports* 2014) を作成して野生型と mSocs3-KO を比較した。

ヒト解離組織

解離患者の手術の際に切除した解離組織を用い、免疫染色とイメージングサイトメトリーによる解析を行った。

	解離モデル	ヒト解離組織
観察項目	肉眼像 組織像 細胞内シグナル 細胞の機能分化 遺伝子発現	組織像 細胞内シグナル

表 1. 本研究の観察項目

4. 研究成果

マウス血行動態負荷モデル

血行動態負荷により野生型、mSocs3-KO とも 1 週間で大動脈に微小損傷を生じ、野生型では 6 週間までに治癒するが mSocs3-KO では解離へと進展する。微小損傷までに起こる細胞の機能分化、分子変化に着目して解析を行った。収縮型平滑筋マーカー SM2、合成型平滑筋マーカー SMemb を用いて平滑筋の機能分化状態について調べた。野生型では、血行動態負荷から微小損傷へ病態の進行と並行して SM2 が漸減し、SMemb が漸増した。LOX、pSmad2 などの線維化マーカーも微小損傷で増加しており、平滑筋による組織修復能を示していると考えられた。一方、mSocs3-KO では微小損傷前に SMemb が増加したが微小損傷では低下しており、修復能の低下が示唆された。

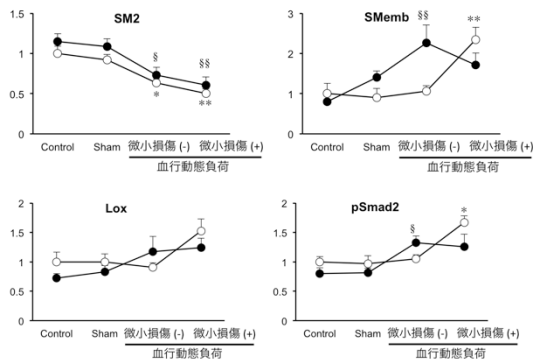


図 3. 平滑筋の機能分化と修復能

mSocs3-KO では血行動態負荷で平滑筋の機能分化と修復能が促進されたが、微小損傷の時点では抑制されていた。

増殖応答の経時的変化を BrdU 取り込みを用いて蛍光免疫染色で観察した。野生型は中膜の増殖応答が微小損傷で最も増加していたのに対し、mSocs3-KO では微小損傷前に増殖応答が最大となり、微小損傷ではほぼ見られなくなっていた。細胞増殖を制御する遺伝子発現について経時的に解析したところ、野生型では細胞増殖を促進するサイクリン依存性キナーゼ (Cdk)、G1 サイクリン、G2 サイクリンが微小損傷を生じてから発現亢進しており、抑制因子である

Cdk インヒビター (CKI)の発現は明らかではなかった。一方で mSocs3-KO では血行動態負荷によって微小損傷の前から Cdk、G1 サイクリン、G2 サイクリンが発現亢進しており、微小損傷では CKI である Ink4a/Arf が亢進していた。

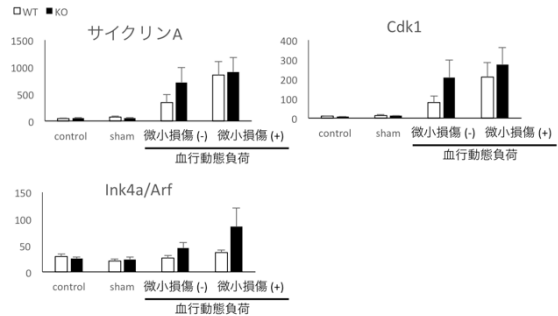


図 4. 増殖応答関連遺伝子

mSocs3-KO では増殖促進に働く遺伝子がより早期に発現したが、微小損傷では Ink4a/Arf の発現亢進により増殖応答が抑制されていた。

ヒト解離組織

1 症例のヒト解離組織をエンタリー、解離部、血腫先端部に分け、マクロファージ、活性化 Stat3 を蛍光二重染色した。さらに内膜 (Intima)、内側中膜 (Inner media)、外側中膜 (Outer media)、外膜 (Adventitia) 毎にイメージングサイトメトリーで解析した。マクロファージ Stat3 はエンタリーと解離部の外側中膜で強く見られたが、血腫先端部ではごくわずかであった。しかし、外膜では血腫先端部のマクロファージ Stat3 活性化は解離部よりも亢進していた。

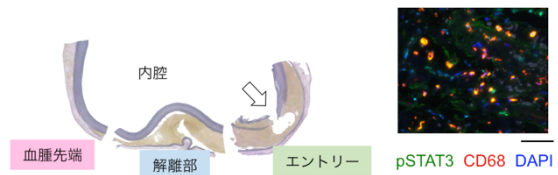


図 5. ヒト解離組織

解離血管をエンタリー、解離部、血腫先端部に分け、免疫蛍光染色を行った。

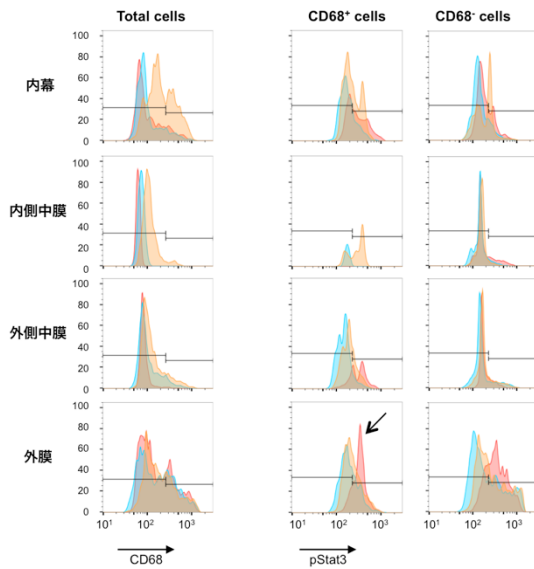


図 6. ヒト解離組織

解離進展部である血腫先端では外膜でマクロファージ Stat3 活性化が見られ、多部位よりも亢進していた。

まとめ

mSocs3-KO では、血行動態負荷による微小損傷前から増殖応答が見られ、修復能を持つ合成型平滑筋への機能分化が見られた。しかしそれらの変化は修復能を発揮すべき微小損傷の時点ではむしろ抑制されており、Ink4a/Arf の発現が亢進していた。Ink4a/Arf は増殖抑制のみでなく、修復能や細胞の機能分化にも深く関わることが知られている。マクロファージ Stat3 活性化によりマクロファージ機能分化を含む過剰な炎症が起こり、より早期に修復能が発揮されるが、反応性に Ink4a/Arf の発現が誘導されることで適切な修復能が維持されず、解離に至ると考えられた。

ヒト解離においても解離が進展している血腫先端部は外膜マクロファージ Stat3 活性化が見られ、解離の進展を促進している可能性があった。

臨床的には突然発症すると考えられている解離であるが、実際には多段階の分子的变化を経て発症に至ることが明らかとなった。これらの分子変化は、解離の予防法開発や増悪抑制療法の標的として応用できる可能性があり、内科的治療法開発が期待できる。

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 5 件)

1. Ohno-Urabe S, Aoki H, Nishihara M, Furusho A, Hirakata S, Nishida N, Ito S, Hayashi M, Yasukawa H, Imaizumi T, Akashi H, Tanaka H, Fukumoto Y. Role of macrophage socs3 in the pathogenesis of aortic dissection. *J Am Heart Assoc.* 2018;7:e007389 査読有
2. Ohno T, Aoki H, Ohno S, Nishihara M, Furusho A, Hiromatsu S, Akashi H, Fukumoto Y, Tanaka H. Cytokine profile of human abdominal aortic aneurysm: Involvement of jak/stat pathway. *Ann Vasc Dis.* 2018;11:84-90 査読有
3. Furusho A, Aoki H, Ohno-Urabe S, Nishihara M, Hirakata S, Nishida N, Ito S, Hayashi M, Imaizumi T, Hiromatsu S, Akashi H, Tanaka H, Fukumoto Y. Involvement of b cells, immunoglobulins, and syk in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm. *J Am Heart Assoc.* 2018;7:e007750 査読有
4. Nishihara M, Aoki H, Ohno S, Furusho A, Hirakata S, Nishida N, Ito S, Hayashi M, Imaizumi T, Fukumoto Y. The role of il-6 in pathogenesis of abdominal aortic aneurysm in mice. *PLoS One.* 2017;12:e0185923 査読有
5. Nakao T, Horie T, Baba O, Nishiga M, Nishino T, Izuhara M, Kuwabara Y, Nishi H, Usami S, Nakazeki F, Ide Y, Koyama S, Kimura M, Sowa N, Ohno S, Aoki H, Hasegawa K, Sakamoto K, Minatoya K, Kimura T, Ono K. Genetic ablation of microRNA-33 attenuates inflammation and abdominal aortic aneurysm formation via several anti-inflammatory pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017;37:2161-2170 査読有

[学会発表](計 8 件)

1. Satoko Ohno, Hiroki Aoki, Michihide Nishihara, Aya Furusho, Saki Hirakata, Norifumi Nishida, Sohei Ito, Makiko Hayashi, Yoshihiro Fukumoto: "Macrophage STAT3

- Exacerbates Aortic Dissection through Dysregulated Differentiation of Macrophages and Smooth Muscle Cells” 第 82 回日本循環器学会学術集会 2018 年
2. Satoko Ohno, Hiroki Aoki, Michihide Nishihara, Aya Furusho, Saki Hirakata, Norifumi Nishida, Sohei Ito, Makiko Hayashi, Hidetoshi Akashi, Hiroyuki Tanaka, Yoshihiro Fukumoto: “STAT3 Determines Differentiation of Macrophages and Progression of Aortic Dissection” 第 81 回日本循環器学会学術集会 2017 年
 3. Satoko Ohno, Hiroki Aoki, Michihide Nishihara, Aya Furusho, Saki Hirakata, Norifumi Nishida, Sohei Ito, Makiko Hayashi, Hiroyuki Tanaka, Yoshihiro Fukumoto: “Macrophage Socs3 is the Determinant for the Development of Aortic Dissection” AHA2016
 4. Satoko Ohno, Hiroki Aoki, Michihide Nishihara, Aya Furusho, Saki Hirakata, Norifumi Nishida, Sohei Ito, Makiko Hayashi, Hiroyuki Tanaka, Yoshihiro Fukumoto: “Macrophage STAT3 activation promotes aortic dissection via imbalance of tissue destruction and protection” ESC Congress 2016
 5. Satoko Ohno, Hiroki Aoki, Michihide Nishihara, Aya Furusho, Saki Hirakata, Norifumi Nishida, Sohei Ito, Makiko Hayashi, Yoshihiro Fukumoto: “Macrophage STAT3 Activation Causes Imbalance of Tissue Destruction and Protection to Promote Aortic Dissection” 第 80 回日本循環器学会学術集会 2016 年
 6. Satoko Ohno, Hiroki Aoki, Michihide Nishihara, Aya Furusho, Saki Hirakata, Norifumi Nishida, Sohei Ito, Makiko Hayashi, Hiroyuki Tanaka, Yoshihiro Fukumoto: “The Role of Macrophage STAT3 Signaling in Pathogenesis of Aortic Dissection” AHA 2015
 7. Satoko Ohno, Hiroki Aoki, Michihide Nishihara, Aya Furusho, Saki Hirakata, Norifumi Nishida, Sohei Ito, Makiko Hayashi,

Hiroyuki Tanaka, Yoshihiro Fukumoto: “The role of macrophage STAT3 signaling in pathogenesis of aortic dissection” ESC Congress 2015

8. Satoko Ohno, Hiroki Aoki, Michihide Nishihara, Aya Furusho, Saki Hirakata, Norifumi Nishida, Sohei Ito, Makiko Hayashi, Yoshihiro Fukumoto: “Molecular Pathogenesis of Aortic Dissection: Macrophage-mediated Changes in Vascular Smooth Muscle-specific Gene Expression” 第 79 回日本循環器学会学術集会 2015 年

[図書] (計 1 件)

1. Hiroki Aoki, Satoko Ohno, Aya Furusho, Michihide Nishihara, Norifumi Nishida, Saki Hirakata, Koichi Yoshimura : Mouse Model of Abdominal Aortic Aneurysm Induced by CaCl₂. *in* Mouse Models of Vascular Diseases. ed. Masataka Sata, Springer Japan 2016: 211–226 (Tokyo)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大野 聡子 (Satoko OHNO)
久留米大学・医学部・助教
研究者番号: 80569418

(2) 研究分担者

青木 浩樹 (Hiroki AOKI)
久留米大学・付置研究所・教授
研究者番号: 60322244

田中 啓之 (Hiroyuki TANAKA)
久留米大学・医学部・教授
研究者番号: 70197466