

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19434

研究課題名(和文)大動脈解離における増殖応答の意義解明

研究課題名(英文)The role of proliferative reaction in molecular pathogenesis of aortic dissection

研究代表者

林 真貴子(Hayashi, Makiko)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：70725027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ラパマイシンを予防投与するとマウス解離モデルの解離発症は完全に抑制された。DNAマイクロアレイの結果、解離発症前のマウス大動脈組織では増殖応答が亢進し、ラパマイシンによって特異的に抑制されることが明らかになった。蛍光免疫染色では平滑筋細胞、線維芽細胞、マクロファージで増殖応答が亢進していた。蛋白定量ではラパマイシン投与後のマウス大動脈組織で分化型平滑筋細胞のマーカーであるSM2の発現が亢進していた。さらに解離発症後にラパマイシンを投与すると解離進展が有意に抑制された。以上の結果から、mTORが増殖応答を介して解離発症を促進し、また解離進展においても重要な役割を果たすことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Preventive administration of rapamycin completely inhibited aortic dissection (AD) development in mouse AD model. DNA microarray revealed the proliferative reaction in mouse aortic tissue before AD development, and rapamycin selectively suppressed the cell proliferation. Immunostaining revealed the proliferation of smooth muscle cells (SMCs), fibroblasts, and monocytes in aortic tissue. Protein assay revealed that rapamycin induced the expression of SM2 known as a marker of differentiated SMCs. In addition, treatment with rapamycin after AD development effectively suppressed the progression of AD in mouse AD model. We concluded that mTOR promotes AD development via cell proliferation, and also plays an important role in AD progression.

研究分野：大動脈疾患

キーワード：大動脈解離 mTOR 増殖応答 平滑筋細胞

1. 研究開始当初の背景

大動脈解離は中高年に突然発症し、急性期から慢性期にわたって生命を脅かす重篤な疾患である。その分子病態には未だ謎が多く、積極的治療法の選択肢は限られており、発症を予測し得る診断法も確立していない。新たな診断・治療法開発のためにも病態解明が急がれる。

申請者らは、マウス解離モデルによる分子病態解析を進めており (Ohno, AHA Scientific Sessions 2015, 他)、コラーゲン架橋酵素阻害薬 BAPN とアンジオテンシン II を同時投与する解離モデルを開発した (BAPN+AngII モデル、Circulation 2012 変法、図 1)。このモデルでは解離刺激から約 2 週間で大動脈解離を発症する。申請者はこの解離モデルのトランスクリプトーム解析により、炎症応答より前に増殖応答が亢進することを発見したヒト解離でも炎症応答、増殖応答が報告されているが、その意義は不明である (Müller ら, Eur J Vasc Endovasc Surg 2000)。

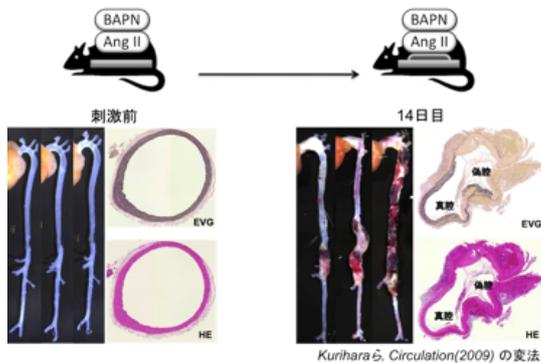


図 1. BAPN+AngII モデル

2. 研究の目的

BAPN+AngII モデルに作用機序の異なる細胞増殖阻害薬ゲフィチニブ (チロシンキナーゼ阻害薬) とラパマイシン (PI3K/mTOR 経路阻害薬) を投与したところ、両薬剤とも BAPN+AngII 刺激による増殖応答 (サイクリン D の誘導) を抑制するにも関わらず、ラパマイシンでのみ解離

発症が完全に抑制されゲフィチニブは何ら効果を示さなかった。増殖応答阻害薬は種類により標的細胞が異なるため、増殖阻害により起こる生体応答も異なる。申請者が得た知見からは、ある細胞の増殖は解離を引き起こし、別の細胞の増殖は解離に関与しないことが示唆される。申請者は、解離に関与する増殖細胞を絞り込むことができれば、より有効に解離増悪を阻止する戦略を立てることが可能になると着想した。本研究では増殖阻害薬の標的細胞の違いを手掛かりとして、解離病態における細胞増殖の意義を明らかにする。

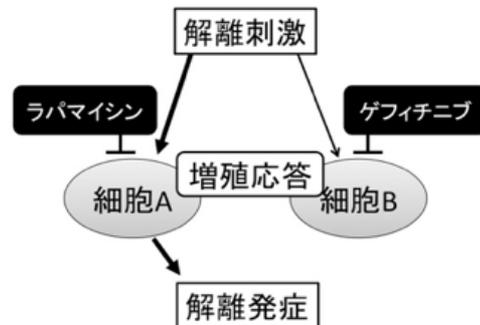


図 2. 本研究の仮説

3. 研究の方法

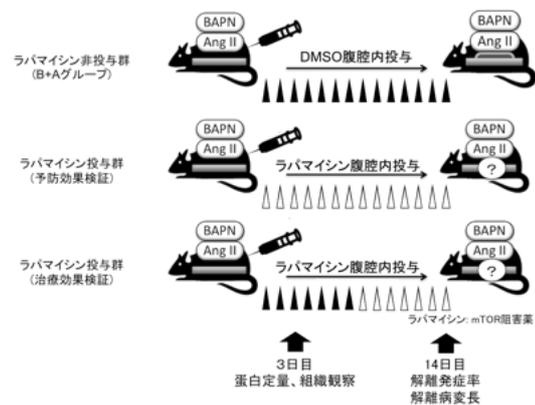


図 3. 本研究の実験系

解離発症と増殖応答

BAPN+AngII モデルに対して増殖応答阻害薬として mTOR 経路阻害薬であるラパマイシンを投与し、14 日目の解離発症率を評価した。また、解離発症前に当たる 3 日目に大動脈を摘出し、解離に先立って起こる変化について検討を行った。具体的には、免疫組織染色、

ウェスタンブロット法、トランスクリプトームを行い、増殖、炎症、血管平滑筋など解離病態にかかわる種々の分子、遺伝子の変化を評価した。

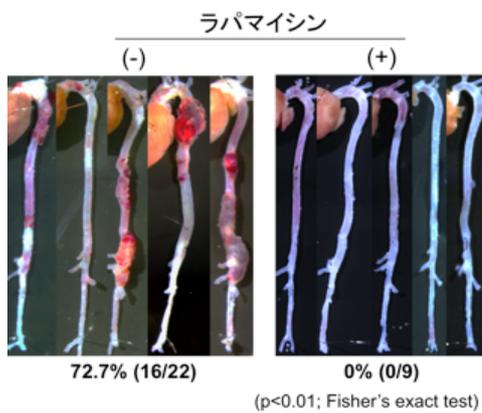
解離進展と増殖応答

BAPN+AngII モデルを用い、解離を発症し始める7日目からラパマイシンを投与し、14日目に予後規定因子である破裂（破裂による死亡率）、進展（病変長）について検討を行った。

4. 研究成果

解離発症前のラパマイシンの効果

BAPN+AngII モデルでは14日目で8-9割に解離を発症するが、BAPN+AngII 刺激直後からラパマイシンを連日投与したところ、解離発症は完全に抑制された（図4）。



解離発症前のマウス大動脈組織では、中膜外側～外膜において増殖マーカーである Ki67

図4. ラパマイシンはマウス解離発症を完全に抑制する。

の陽性細胞の増加を認めるが、ラパマイシンはこれを抑制し、G1 サイクリンの定量評価においてその有意性が示された（図5）

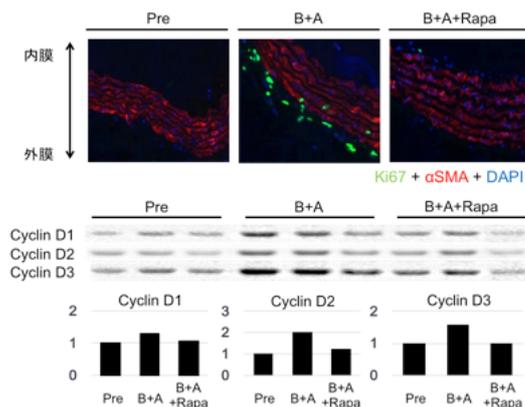


図5. BAPN+AngII 刺激により増殖応答は亢進し、ラパマイシンにより抑制される。

mTOR は増殖応答の他にも炎症応答、細胞成長や代謝など様々な機能を制御することから、解離病態における mTOR の制御機構を紐解くためマウス大動脈組織を用いてトランスクリプトーム解析を行った。その結果、BAPN+AngII 刺激により炎症応答、増殖応答や平滑筋細胞に関わる遺伝子群の発現増加を認めたが、ラパマイシンは増殖応答関連遺伝子群のみを特異的に抑制した。（図6）

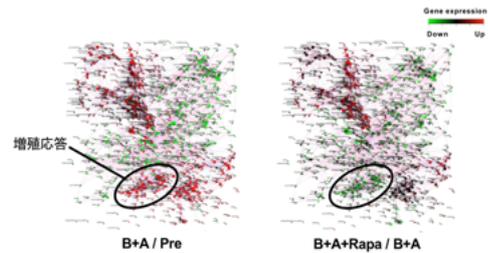


図6. ラパマイシンはBAPN+AngII 刺激による増殖応答を特異的に抑制する

mTOR を介する増殖応答にかかわる細胞を同定するため Ki67 と各種細胞マーカーを用いた蛍光免疫染色を行ったところ、BAPN+AngII 刺激により平滑筋細胞、線維芽細胞、マクロファージの増殖応答が亢進し、ラパマイシンはこれを抑制した。（図7）

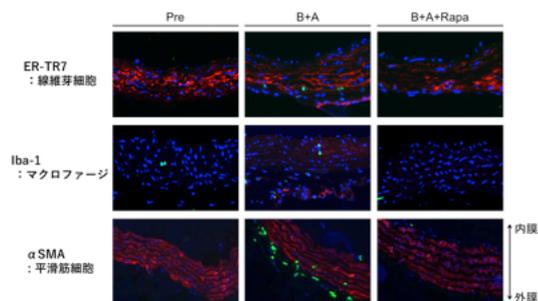


図7. ラパマイシンは平滑筋細胞、線維芽細胞、マクロファージの増殖応答を抑制する。

解離発症後のラパマイシンの効果

BAPN+AngII モデルでは7日目で小解離が確認されるようになるが、7日目からラパマイシンを連日投与したところ14日目の解離発症率は有意に抑制され（図8）、また病変長による解離進展評価においても有意に解離の進展を抑制した（図9）。

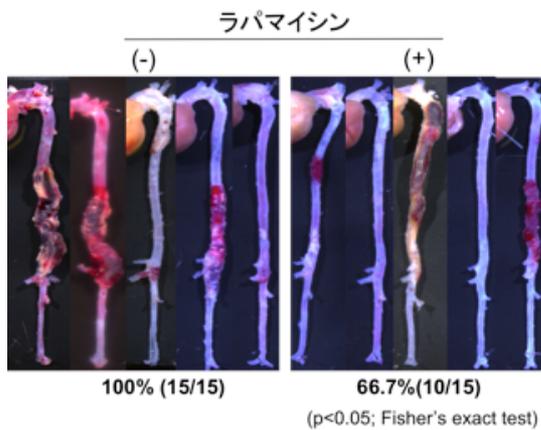


図8. ラパマイシンは解離増悪を抑制する。

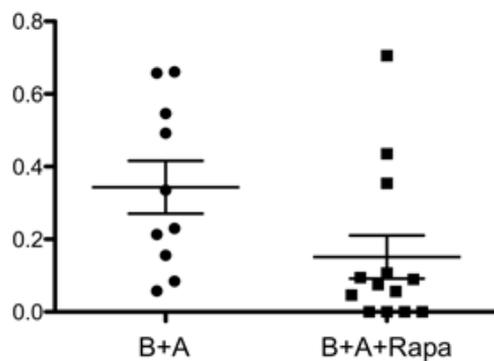


図9. ラパマイシンは解離進展を抑制する。

まとめ

mTOR がマウス解離モデルにおいて解離発症を促進することを発見し、mTOR が解離発症前のマウス大動脈組織において増殖応答を促進していることが明らかになった。さらに mTOR は炎症応答と独立して増殖応答を制御しており、その舞台が平滑筋細胞、線維芽細胞、マクロファージであることを明らかにした。現時点では、増殖応答の結果どのような現象が惹起され、解離発症につながるのかはまだ明らかではない。現在進行中の検討では TGF- β シグナルの制御因子である活性型 Smad2 の発現がラパマイシンにより促進されることが明らかになっており、増殖応答との関係を紐解くことにより解離病態を明らかにすべく、検討を継続している。

また、本研究では実臨床に即した検討として

解離発症後のマウスモデルに対するラパマイシンの効果を検証しているが、解離病変長、解離発症率において有意な抑制効果が明らかになった。このことから解離の予後規定因子である再解離や進展の抑制が期待でき、薬剤溶出性ステントグラフトの開発や、手術適応とならない症例への治療などへの応用が期待される。

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 3 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 (査読あり)
2. 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 (査読あり)
3. 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 (査読あり)

[学会発表] (計 19 件)

1. 第 1 回日本循環器学会基礎研究フォーラム (2018 年 1 月 6-7 日: 品川)
Makiko Hayashi, Hiroki Aoki, Satoko

Ohno, Michihide Nishihara, Aya Furusho, Saki Hirakata, Norifumi Nishida, Sohei Ito, Yohei Hashimoto, Yoshihiro Fukumoto: mTOR regulates development and progression of aortic dissection

2. 第 123 回日本循環器学会九州地方会 (2017 年 12 月 2 日 : 久留米)

林真貴子、青木浩樹、大野聡子、西原通秀、平方佐季、古荘文、西田憲史、伊東壮平、橋本洋平、眞島涼平、福本義弘 : 大動脈解離の病態解明-mTOR 経路を介する発症メカニズム- (最優秀賞受賞)

3. The American Heart Association, The 90th Scientific Sessions (AHA2017), Anaheim, USA, November 11-15, 2017

Hayashi M, Aoki H, Ohno S, Nishihara M, Furusho A, Hirakata S, Nishida N, Ito S, Fukumoto Y: mTOR promotes aortic dissection through cell proliferation

4. 第 81 回日本循環器学会学術集会 (2017 年 3 月 17~19 日 : 金沢)

Hayashi M, Aoki H, Fukumoto Y, Ohno S, Nishihara M, Hirakata S, Furusho A, Nishida N, Ito S: Central role of mTOR pathway in molecular pathogenesis of aortic dissection

5. 第 80 回日本循環器学会学術集会 (2016 年 3 月 18~20 日 : 仙台)

M. Hayashi, H. Aoki, M. Nishihara, S. Ohno, A. Furusho, S. Hirakata, N. Nishida, S. Ito, Y. Fukumoto: Central Role of Phosphoinositide/mTOR Pathway in Molecular Pathogenesis of Aortic Dissection

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

○研究会

1. 第 24 回九州血液血管研究会 (2017 年 12 月 2 日 : 福岡)

林 真貴子: 大動脈解離の病態解明 -mTOR 経路を介する発症メカニズム-

2. 大動脈分子病態研究会 (2017 年 8 月 10 日 : 久留米)

林 真貴子: 大動脈解離における mTOR の役割

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 真貴子 (HAYASHI, Makiko)

久留米大学、医学部、助教

研究者番号 : 70725027

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし