

令和 2 年 5 月 10 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10765

研究課題名(和文)急性大動脈解離の病態におけるPCSK9の役割

研究課題名(英文)The role of PCSK9 in the pathology of acute aortic dissection

研究代表者

飯田 泰功(Iida, Yasunori)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任助教

研究者番号：50408134

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): ヒト大動脈解離の血管壁組織の病理学、組織学的検討を行い、特に中膜でPCSK9が過剰に発現していることを確認した。さらに、PCSK9の分泌が、中膜平滑筋細胞の中でも特に合成型平滑筋細胞由来であることを発見し、報告した。これは国内外で初の知見である。また、マウスの大動脈解離モデルは、当初一般的であったが、ベースとなる脂質異常症マウスがApoEノックアウトであり、人ではType III脂質異常症で、かなり稀な病型であった。そこで、Type IIa(ヒトにおける最も一般的な脂質異常症)となるマウスを作成し、このマウスに昨年度と同様の実験的操作を行い、大動脈解離を誘発させた。この知見も国内外初であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今まで大動脈解離は動脈硬化が原因と言われ続けてきたが、虚血性心疾患や、閉塞性動脈硬化症など、血管が「狭く」なる(狭窄)を引き起こす原因も動脈硬化と言われており、血管が「裂ける」疾患と病因が同じであることはおかしいと考えてきた。この研究を通して、大動脈解離と「炎症」との関係が明らかとなり、炎症が動脈壁の特に中膜に及んでいることが分かった。動脈硬化は主に内膜に病変を認めることから考えると、この研究成果は今後動脈解離の研究において有意義なものとなると考えられた。

研究成果の概要(英文): The pathological and histological examination of the vascular wall tissue of human aortic dissection was performed, and it was confirmed that PCSK9 was overexpressed especially in the media. Furthermore, we discovered and reported that PCSK9 secretion was derived from synthetic smooth muscle cells among medial smooth muscle cells. This is the first knowledge in Japan and abroad.

The mouse aortic dissection model was initially general, but the underlying dyslipidemic mouse had ApoE knockout, and this is the type III dyslipidemia in humans, which was fairly rare disease type. Therefore, we created a mouse with Type IIa (the most common dyslipidemia in humans) and performed the same experimental manipulation as last year to induce aortic dissection. This knowledge was also the first in Japan and abroad.

研究分野：大動脈解離

キーワード：大動脈解離 炎症 脂質異常症 PCSK9

1. 研究開始当初の背景

急性大動脈解離(Acute aortic dissection: AAD)の好発年齢は50~70歳で、男女比は2:1、剖検報によれば1/205症例である。外膜・中膜・内膜の3層構造から成る大動脈のうち、“何らかの起因”によって内膜に生じた亀裂から中膜に血液が流入し、層構造が長軸方向に分断される(解離)する疾患である。多くは突然発症し、また致死的事であることが少なくない。しかしながら、詳細な“起因”は明らかにされておらず、外科手術が唯一の根治治療である。さらなる問題点は、当疾患の病態解明に取り組む基礎研究者が極めて少ないことである。

AADの発症には、血管壁強度の破綻は古くから説かれ、血圧管理の重要性は確かなものである。しかし、申請者は豊富な手術経験や術後の病理観察眼から、大動脈瘤のような著しい構造破綻が一見認められないAADの血管壁も、これまでと異なる視点や観察手法を用いることによって、見過ごしている形態異常が発見できるのではないかと考えていた。病理組織解析の多くは、標本作製過程で脱脂するため、詳細な脂質分子の局在を観察することは困難である。現況では、そのような脂質分子の局在を可視化する技術は質量顕微鏡法しかないと考えられる。

2012年から、質量顕微鏡を利用し、大動脈瘤壁をはじめ、複数の血管疾患の脂質分子構成の変化を解析している分担者の田中宏樹と共同研究を始めた。AADが、ヒトAAD組織標本から解離に至っていない部位であっても、炎症に関与する脂質分子の蓄積が顕著であることが分かりつつあった。つまり、AADの血管壁局所で、脂質代謝異常が存在することが示唆された。さらに、より明確であることは、コレステロールエステルの蓄積が顕著であるほど、他の炎症に関わる脂質分子の蓄積は顕著であり、分布は著しく変化している。既存の報告もあるが、コレステロール代謝異常は、AADの病態の進展に重要な因子であることが脂質分子構成の解析からも明らかとなってきた。

現在、臨床においてはコレステロール代謝改善薬として、HMG-CoA還元酵素阻害薬(スタチン)が広く知られているが、より強力な分子標的治療が、国内外に周知されつつあった。PCSK9(前駆蛋白質転換酵素サブチリシン/ケキシン9型)は主に肝細胞より分泌される蛋白質であり、肝細胞表面のLDL受容体数を調節することにより、LDL-Cのクリアランスに生理的な役割を果たしている。PCSK9は主に肝細胞で合成され、その後肝細胞表面に移動し、循環血中に放出されて肝細胞表面のLDL受容体に結合する。このPCSK9がLDL受容体に結合すると、LDL受容体は分解される。PCSK9が過剰になると血中のLDL-Cは代謝されずコレステロール代謝異常を引き起こす。PCSK9阻害薬はこの分子の作用を直接的に阻害し、強力にコレステロール代謝異常を改善する。

申請者らは、肝細胞だけでなく血管壁でもPCSK9が発現し、局所のLDL受容体量を調整していることを見出し、既に、AAD壁では脂質代謝異常の見られる部位に、PCSK9が過剰に発現していることを確認した。さらに、PCSK9阻害剤は、腸管吸収、心機能、敗血症の改善に効果が報告されていることから、申請者はコレステロール代謝異常に加えて、抗炎症作用や血管筋収縮の改善なども期待でき、AADの病態に能動的に作用しうる分子として着目していた。すなわち、解離発症前に、血管壁の性状は脂質分子の分布変化によって脆弱しつつあると推察した。

2. 研究の目的

申請者は、AADの非解離部位では、一見すると構造破綻のみ見られない血管壁ではあるが、見過ごされている形態異常があると考えていた。つまり、解離前病変の存在である。これまでの病理学的観察手法では、脂質分子の局在を同定することは困難であり、現況は質量顕微鏡法しか可視化できない。

申請者は、過去にAAD壁のコレステロール蓄積の顕著な部位では、他の脂質分子も過剰に蓄積していることを確認していた。近年、コレステロール代謝制御に重要な分子であるPCSK9が国内外で周知されつつあり、AADの血管壁にも顕著な発現を認め、病態に能動的に関与する可能性を示唆した。本研究では、AADの病態におけるPCSK9を介した局所の脂質代謝制御機構について明らかにする。

3. 研究の方法

唯一の脂質分子イメージングシステムである質量顕微鏡を利用し、AADに特徴的な脂質分子組成をヒトAAD組織解析から見出す。(平成29年度)そして、近年新たな脂質代謝異常改善薬として注目されているPCSK9阻害剤の有用性をモデル動物に投与して評価する。(平成30年度以降)分担者の施設に、質量顕微鏡は設置され、常時利用しており、専門スタッフの常駐によりメンテナンスされている。研究計画を遂行するための研究体制は、2012年より共同で研究が継続し、さらにバイオイメージングや血管生物学に熟知した協力者が加わり、研究環境は整備されている。

平成29年度の計画：質量顕微鏡によるAADにおける特徴的な脂質分子局在の同定

質量顕微鏡は、脂質分子の局在を分子種レベルで観察することが可能な唯一のイメージング

システムである(Tanaka H, 2013, 2015 PLoS ONE)。これまで、AAD の組織解析を報告した例はない。申請者は、手術時に採取した大動脈組織を利用する。

通常の人工血管置換術で切除する検体を利用するため、患者身体への不利益は無い。当施設にて質量顕微鏡用に凍結切片を作製し、解析は分担者の浜松医科大学(田中宏樹)で行われる。当施設に凍結切片作製のクライオスタットは設置されている。分担者の田中は、質量顕微鏡を利用し2012年より、12本の英文原著論文を報告している。機器の管理・解析手法に問題はない。

AAD 壁の解離部位だけではなく、わずかに採取される非解離部位にも焦点を絞って解析する。非解離部位は、解離の前兆となる血管壁を反映している可能性があると考えているためである。各血管壁を、動脈硬化の病理組織分類に沿って比較し、各々のAAD壁の脂質分子変化の特徴を見出す。

平成30年度以降の計画：AAD壁におけるPCSK9を介した脂質代謝の変化

30年度以降に、AADとPCSK9を介した脂質代謝異常の因果関係を解析する。AAD血管壁の性状悪化にコレステロールを含めた脂質代謝異常が、PCSK9を介して進展することを検証し、PCSK9を阻害することによってAADの発症・進展を抑制できることをモデル動物で評価する。具体的に下記の項目について検討を行う。

- (1) ヒトAAD組織を利用し、PCSK9発現の局在と定量：組織分布と責任細胞の同定
- (2) モデル動物を利用し、脂質代謝異常とPCSK9発現の経時変化を観察
- (3) モデル動物に対するPCSK9阻害剤の有用性を評価

(1) PCSK9がAADの組織で高発現していることは確認した。しかし、PCSK9がAADで生じている血管壁局所の脂質代謝異常に関与しているかは不明である。質量顕微鏡で可視化した局在とPCSK9の局在・発現量から両者の関係を明らかにし、蛍光二重染色によりPCSK9の高発現する細胞を同定する。

(2) 次に、確立されたAADモデルマウスを作製し、脂質代謝の変化とPCSK9の発現を経時的に解析する。モデル動物に関しては、申請者が米国留学(スタンフォード大学血管外科、Ronald L Dalman教授)時に、作製方法を習得している。

病理組織解析だけでなく、質量顕微鏡によるマウス血管の解析も申請者、分担者ともに確立しており、解析手法に問題はない。

(3) 既に、PCSK9阻害剤は臨床で脂質異常症の治療薬として使用され、安全性は担保されているが、血管壁局所に及ぼす作用は不明である。前述したAADモデルマウスにPCSK9阻害剤を投与し、AADの発症率、動脈瘤破裂率(死亡率)を求めめるだけでなく、同様な病理組織解析、質量顕微鏡による解析を行う。

4. 研究成果

平成29年度、平成30年度の研究では、ヒトAADにおける血管壁組織に免疫組織学的染色、免疫蛍光染色を施行し、大動脈壁の特に中膜でPCSK9が過剰に発現していることを確認した。さらに、PCSK9の分泌が、中膜の平滑筋細胞の中でも特に合成型(synthetic phenotype)平滑筋細胞由来であることを発見し、その結果を論文に投稿し、平成30年Annals of Vascular Surgeryに掲載された。これは国内外で初の知見である。

論文：Iida Y, Tanaka H, Sano H, et al. Ectopic expression of PCSK9 by smooth muscle cells contributes to aortic dissection. *Ann Vasc Surg* 2018;48:195-203. PMID: 29197601.

また、本研究で用いていたマウス大動脈解離モデルは、当初一般的ではあったが、ベースとなる脂質異常症マウスがApoEノックアウトマウスであり、人ではType III脂質異常症ということで、かなり稀な病型であった。そこで、Type IIa(ヒトにおける最も一般的な脂質異常症のタイプ)となるマウスを作成し、このマウスに昨年度と同様の実験的操作を行い、大動脈解離を誘発させることができた。この知見も国内外初であった。この実験モデルを用いることで、よりヒトに近いモデルでの検討が可能となり、今回、炎症と、大動脈解離に関する研究をさせていただいた結果、得ることができた新しい知見であった。

論文：Tanaka H, Iida Y, Iwaki T, et al. Elevated plasma levels of LDL cholesterol promote dissecting thoracic aortic aneurysms in Angiotensin II-induced mice. *Ann Vasc Surg*. 2018;48:204-213.. PMID: 29197606.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Iida Y, Sawa S, Shimizu H.	4. 巻 19
2. 論文標題 Optimal Time for Pharmacological Treatment of Abdominal Aortic Aneurysm.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Curr Drug Targets.	6. 最初と最後の頁 1297-1301
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2174/1389450119666171227225008.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tanaka H, Iida Y, Iwaki T, Suzuki Y, Sano H, Miyajima C, Zaima N, Sasaki T, Sumioka A, Hakamata S, Shimizu H, Umemura K, Urano T.	4. 巻 48
2. 論文標題 Elevated Plasma Levels of LDL Cholesterol Promote Dissecting Thoracic Aortic Aneurysms in Angiotensin II-Induced Mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Ann Vasc Surg.	6. 最初と最後の頁 204-213
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.avsg.2017.10.006.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Xu B, Xuan H, Iida Y, Miyata M, Dalman RL.	4. 巻 19
2. 論文標題 Pathogenic and Therapeutic Significance of Angiotensin II Type I Receptor in Abdominal Aortic Aneurysms.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Curr Drug Targets.	6. 最初と最後の頁 1318-1326
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2174/1389450119666180122155642.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Tanaka H, Inuzuka K, Iida Y, Shimizu H, Unno N, Urano T.	4. 巻 67
2. 論文標題 Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 Is Associated with Degenerating Adipocytes in Abdominal Aortic Aneurysm.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Oleo Sci.	6. 最初と最後の頁 1355-1360
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5650/jos.ess18131.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Iida Y, Tanaka H, Sano H, Suzuki Y, Shimizu H, Urano T.	4. 巻 48
2. 論文標題 Ectopic Expression of PCSK9 by Smooth Muscle Cells Contributes to Aortic Dissection.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Ann Vasc Surg	6. 最初と最後の頁 195-203
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.avsg.2017.10.005.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Iida Y, Tanaka H, Sawa S, Shimizu H
2. 発表標題 High Plasma Levels of Low-density Lipoprotein-Cholesterol Accelerate Dissecting Aortic Aneurysms in Angiotensin II-induced Mice
3. 学会等名 Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Iida Y, Tanaka H, Urano T, Sawa S, Shimizu H
2. 発表標題 Plasminogen activator inhibitor type 1 promote experimental aortic dissection in mice.
3. 学会等名 International Meeting for Aortic Disease (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yasunori Iida, Hiroki Tanaka, Hideto Sano, Yuko Suzuki, Hideyuki Shimizu, Tetsumei Urano
2. 発表標題 Ectopic expression of proproteinconvertase subtilisin/kexin type 9 by smooth muscular cells contributes to aortic dissection
3. 学会等名 Atherosclerosis, thrombosis and vascular biology (国際学会)
4. 発表年 2017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	田中 宏樹 (Tanaka Hiroki) (50456563)	浜松医科大学・医学部・特任研究員 (13802)	