

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15841

研究課題名（和文）高安動脈炎とクローン病との合併を引き起こす病態の解明と治療応用を目指した研究

研究課題名（英文）Research aimed at elucidating the pathophysiology that causes the complication of Takayasu's arteritis and Crohn's disease and applying it to treatment

研究代表者

田村 夏子（Tamura, Natsuko）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：70815597

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では高安動脈炎患者のゲノムワイド関連解析で明らかになった変異型MLX遺伝子のノックインマウスを作成し、野生型マウスとの比較により病態解明を目指した。CRISPR/Cas9システムを用いてノックインマウスを作成した。HE染色では刺激を行っていない変異型MLXノックインマウスの血管断面積は同週令の野生型マウスと比較して有意に増大していた。大動脈壁は肥厚しており、リンパ球の浸潤や弾性繊維の断裂を認め、血管周囲のリンパ節腫大を認めた。また、大動脈周囲の褐色脂肪組織の増大、大動脈弁組織の肥大、小腸パイエル板の肥厚、大腸平滑筋の腫大という特徴がみられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高安動脈炎は原因不明の大型血管に発症する血管炎で、主に若年から中年の女性に多い本疾患はアジア人に多いという特徴もあることから、遺伝性疾患が疑われてきた。近年日本で行われたゲノムワイド関連解析で見出された疾患関連遺伝子である、変異型MLX遺伝子を持つマウスを作成し野生型マウスと比較したところ、様々な特徴を捉えることができた。今回の研究成果を足掛かりにしてさらに詳細な病態解明が可能になると考えている。

研究成果の概要（英文）：In this study, we created knock-in mice of the mutant MLX gene revealed by genome-wide association study of patients with Takayasu's arteritis, and aimed to elucidate the pathophysiology by comparing with wild-type mice. Knock-in mice were generated using the CRISPR / Cas9 system. The vascular cross-sectional area of mutant MLX knock-in mice not stimulated by HE staining was significantly increased as compared with wild-type mice of the same week age. The aortic wall was thickened, infiltration of lymphocytes and rupture of elastic fibers were observed, and perivascular lymphadenopathy was observed. It was also characterized by an increase in brown adipose tissue around the aorta, an enlargement of the aortic valve tissue, a thickening of the Peyer's patch of the small intestine, and an enlargement of the smooth muscle of the large intestine.

研究分野：高安動脈炎

キーワード：高安動脈炎

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高安動脈炎は全身性の大型血管炎である。若年から中年の女性に多く、アジア人に多いことから遺伝性の疾患であることが推測されるが、その原因の多くは解明されていない。2013年に日本の高安動脈炎患者においてゲノムワイド関連解析 (GWAS) が行われ、6番染色体の *HLA-B* 領域と5番染色体の *IL12B* 遺伝子、17番染色体の *MLX* (Max-like protein X) 遺伝子が疾患関連遺伝子として見出された (Terao et al. 2013)。

また、私たちの研究で *in situ hybridization* を用いて *MLX* 遺伝子の分布を検索したところ、*MLX* の mRNA は大動脈弁組織や大動脈周囲の褐色脂肪組織に多く分布していた。褐色脂肪組織は寒冷時の体温維持に必須の脂肪組織であり、高齢者より若年者、男性より女性に多く、頸部・鎖骨上・上縦隔に多く分布していることが報告されており (Cypess et al. 2009)、高安動脈炎における特徴、すなわち若年女性に患者が多いことと頸部から上縦隔に病変が生じやすいことと合致する。以上の観点から私たちは血管周囲の褐色脂肪組織における異常が本疾患の発症に関与している可能性があるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

疾患モデルマウスを作成し野生型との比較から病態解明を目指す

3. 研究の方法

以下の方法で疾患モデルマウスを作成し、各モデルマウスと野生型マウスを比較する。

CRISPR/Cas9 システムを用いて変異型 *MLX* 遺伝子ノックインマウスを作成する

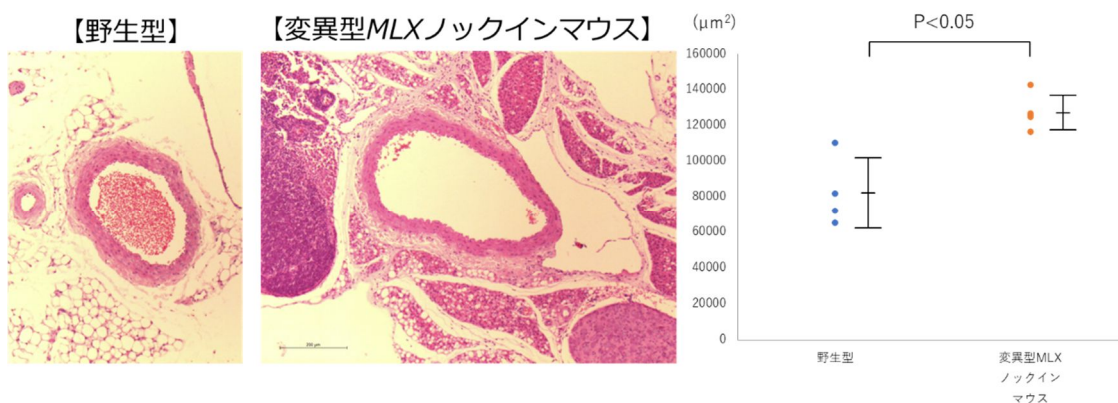
褐色脂肪組織に特異的なタンパクである UCP-1 (uncoupling protein 1) を標的とし、野生型マウスに自己免疫性褐色脂肪織炎を発症させる

既に確立している乳酸菌細胞壁抽出物腹腔注射による大動脈炎マウスを作成する

4. 研究成果

CRISPR/Cas9 システムを用いて変異型 *MLX* 遺伝子ノックインマウス

繁殖させた *MLX* ノックインマウスについて、約 13 週令で大動脈・心臓・小腸・空腸の組織を採取しホルマリン固定後 HE 染色を行った。血液は ENTA・Na 入りエッペンチューブに集め、遠心後上清を冷凍保存した。刺激を行っていない変異型 *MLX* ノックインマウスの血管断面積は同週令の野生型 Balb/c マウスと比較して有意に増大していた (図: WT vs MLXKI: mean 82225 μm^2 vs 127342 μm^2 : $p < 0.05$)。HE 染色では大動脈壁は肥厚しており、リンパ球の浸潤や弾性繊維の断裂を認め、血管周囲のリンパ節腫大を認めた。その他の特徴として、13 週令のメスの変異型 *MLX* ノックインマウスは同週令のメスの野生型マウスと比較して有意に体重が減少していた (WT vs MLX-KI: mean 23 g vs 19 g: $p < 0.01$)。その他には、大動脈周囲の褐色脂肪組織の増大、大動脈弁組織の肥大、小腸バイエル板の肥厚、大腸平滑筋の腫大という身体的特徴がみられた。一方、寿命や繁殖に大きな影響はなかった。



褐色脂肪組織に特異的なタンパクである UCP-1 (uncoupling protein 1) を標的とした自己免疫性褐色脂肪織炎マウス

褐色脂肪組織特異的なタンパクである UCP-1 ペプチドとアジュバントの混合物を 8-10 週令の野生型 BALB/c マウスに皮下注射し 4-5 週後に大動脈・心臓・小腸・大腸・血液の組織を採取した。(以下、自己免疫性褐色脂肪織炎モデルマウスと呼ぶ。) 同週令の刺激を行っていない野生型 BALB/c マウスについても大動脈・心臓・小腸・大腸を採取した。どちらのマウスも採取した組織を直ちにホルマリン固定し HE 染色で染色した。血液は ENTA・Na 入りエッペンチューブに集

め、遠心後上清を冷凍保存した。大動脈は短軸で切片し、断面積を imageJ で測定し比較した。自己免疫性褐色脂肪織炎モデルマウスの大動脈は刺激をしていない野生型マウスの大動脈と比較して、短軸で血管断面積が有意に増大していた (WT vs WT UCP1(+): mean 82225 μm^2 vs 158336 μm^2 : $p < 0.05$)。また、自己免疫性褐色脂肪織炎モデルマウスでは、大動脈周囲の褐色脂肪組織の増大、血管壁肥厚、リンパ球の浸潤という特徴がみられた。

乳酸菌細胞壁抽出物腹腔注射による大動脈炎マウス

野生型マウスと比較して有意に血管断面積が増大した (WT vs WT LCWE(+): mean 82225 μm^2 vs 151658 μm^2 : $p < 0.05$)。しかし、上述した自己免疫性褐色脂肪織炎モデルマウスや変異型 MLX ノックインマウスと比較して、血管周囲は白色脂肪が多くみられ、大動脈壁へのリンパ球浸潤や血管周囲のリンパ節腫大は少なかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tamura Natsuko, Maejima Yasuhiro, Matsumura Takayoshi, Vega Rick B., Amiya Eisuke, Ito Yusuke, Shiheido-Watanabe Yuka, Ashikaga Takashi, Komuro Issei, Kelly Daniel P., Hirao Kenzo, Isobe Mitsuaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Single-Nucleotide Polymorphism of the MLX Gene Is Associated With Takayasu Arteritis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Circulation: Genomic and Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/CIRCGEN.118.002296	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔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 田村 夏子
2. 発表標題 Apolipoprotein A-1 is a candidate of novel biomarkers of Takayasu Arteritis
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 2018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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------