

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08484

研究課題名(和文) マルファン症候群の大動脈瘤進展における炎症・代謝シグナルの病態生理学的意義の解明

研究課題名(英文) Pathophysiological role of inflammatory and metabolic signals during aortic aneurysm formation in Marfan syndrome

研究代表者

武田 憲文 (TAKEDA, NORIFUMI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60436483

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：マルファン症候群(MFS)は、若年で致死的な大動脈解離を発症する。MFSではトランスフォーミング増殖因子(TGF- β)シグナルが活性化し、重症例ほど大動脈外壁への炎症細胞の浸潤が多いが、その発症・進展における炎症細胞の役割は明らかではない。本課題では、マクロファージにおけるTGF- β シグナルに着目し、マクロファージ特異的にTGF- β シグナルを欠落させたマルファンモデルマウスを作成したところ、動脈外膜側へのマクロファージの浸潤は少なくなり、動脈瘤形成は有意に抑制された。炎症細胞におけるTGF- β シグナル抑制は、遺伝性大動脈瘤における治療標的となる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マルファン症候群では、大動脈瘤に対する降圧薬治療(ロサルタンなど)や自己弁温存大動脈基部置換術などの発達によりその予後は改善傾向にあるが、病態特異的な治療法がなく、依然として若年で致死的な大動脈解離に至る患者も少なくない。本課題において、炎症細胞におけるTGF- β シグナル抑制がその治療標的となる可能性が示唆され、治療法が開発されることも期待できる。

研究成果の概要(英文)：Increased transforming growth factor- β (TGF- β) signaling contributes to the pathophysiology of aortic aneurysm in Marfan syndrome (MFS). Recent reports indicate that a small but significant number of inflammatory cells are infiltrated into the aorta. However, little is known about the contribution of myeloid cells to aortic aneurysmal formation. In this study, we ablated the TGF- β type II receptor gene *Tgfb2* in myeloid cells of *Fbn1*^{C1039G/+} MFS mice (*Fbn1*^{C1039G/+}; *Tgfb2*^{MyeKO}). Aneurysmal formation with fragmentation and disarray of medial elastic fibers observed in MFS mice was significantly ameliorated in *Fbn1*^{C1039G/+}; *Tgfb2*^{MyeKO} mice. In the aorta of *Fbn1*^{C1039G/+}; *Tgfb2*^{MyeKO} mice, and the number of infiltrated F4/80-positive macrophages was significantly reduced. In vitro, TGF- β enhanced the migration capacity of RAW264.7 macrophages. TGF- β signaling in myeloid cells promotes aortic aneurysmal formation and its inhibition might be a novel therapeutic target in MFS.

研究分野：循環器内科学

キーワード：マルファン症候群 動脈瘤 マクロファージ TGF- β シグナル

1. 研究開始当初の背景

マルファン症候群 (MFS) は、20-30 歳代で致死的な大動脈解離を発症する遺伝性難治疾患である。外科的治療の発達でその生命予後は改善傾向にあるが、病態の理解が十分でないために疾患特異的で効果的な治療方法を提供できていない。約 90% の MFS 患者で、弾性線維・フィブリリン 1 をコードする *FBN1* 遺伝子に病的変異がある

フィブリリン 1 は、トランスフォーミング増殖因子 (TGF) を不活化状態 (潜在型複合体) で細胞外基質内に蓄えておく役割も担っており、MFS ではフィブリリン 1 の構造・機能破綻のために、組織脆弱性と TGF シグナルの恒常的活性化を来していると考えられている。また、外科検体の検討から、重症例ほど大動脈外壁への炎症細胞の浸潤が多く、病態の進展に大きく関与していることが示唆されている。致死的な若年性動脈瘤・解離の抑圧のためには、動脈瘤進展過程に直接的に関与する遺伝子群または増悪因子の同定と分子標的治療薬の開発への展開が必要である。

2. 研究の目的

MFS の動脈瘤では、TGF シグナル経路が活性化しているが、従来の検討では中膜平滑筋層に着目した研究が多かった。本課題では、大動脈外壁への炎症細胞の浸潤に着目し、大動脈瘤の発症・進展における炎症細胞の役割、特にマクロファージにおける TGF シグナルの意義について解析する。

3. 研究の方法

(1) マクロファージでの TGF シグナル不活性化が MFS マウスに与える影響

MFS の動脈瘤進展における、炎症細胞 TGF シグナルの役割について検証するため、ヒト遺伝子異常を反映した *Fbn1* ノックインマウス (*Fbn1*^{C1039G/+}) とマクロファージ特異的 2 型 TGF 受容体欠損マウス (*LysMCre; Tgfbr2*^{fl/fl}) を交配し、MFS のマクロファージで TGF シグナルを欠落させたマウス (*Fbn1*^{C1039G/+}; *LysMCre; Tgfbr2*^{fl/fl}) の表現型を解析した。

大動脈瘤形成に与える影響：経時的心エコー検査を行い、30 週齢までの動脈壁径 (大動脈基部径) を比較した。

大動脈壁の性状 (変性) に与える影響：Elastica van Gieson (EVG) 染色し、弾性線維の断裂数を比較した。

マクロファージ浸潤に与える影響：抗 F4/80 抗体を用いてマクロファージを免疫染色し、その浸潤数を比較した。

TGF シグナル伝達経路下流 (canonical 経路と non-canonical 経路) に与える影響：抗リン酸化 Smad2/3 抗体、抗リン酸化 ERK1/2 抗体で免疫染色し、その陽性細胞数を比較した。

(2) TGF がマクロファージの in vitro 遊走能に与える影響

TGF がマクロファージの遊走能に与える影響を調べるため、RAW264.7 細胞 (マクロファージ細胞株) を用いたスクラッチアッセイ (培養細胞に P200 ピペットチップでひっかき傷をつけて細胞間に溝を作成し、その後の細胞遊走によって空隙が埋まっていくアッセイ系) を行った。

4. 研究成果

(1) マクロファージでの TGF シグナル不活性化が MFS モデルマウスに与える影響

大動脈瘤形成に与える影響

Fbn1^{C1039G/+}、*Fbn1*^{C1039G/+}; *LysMCre; Tgfbr2*^{fl/fl} マウスともに、野生型と比較して 8 週齢から大動脈瘤を形成するが、*Fbn1*^{C1039G/+}; *LysMCre; Tgfbr2*^{fl/fl} マウスの動脈瘤形成速度は緩徐であり、12 週以降で *Fbn1*^{C1039G/+} マウスの動脈瘤径よりも有意に縮小していた。この傾向に性差はなかった。

大動脈壁の性状 (変性) に与える影響

30 週齢のマウス動脈壁を EVG 染色した。*Fbn1*^{C1039G/+} マウスでは、弾性線維の断裂数が著増し変性が強かった。一方、*Fbn1*^{C1039G/+}; *LysMCre; Tgfbr2*^{fl/fl} マウスでもこの傾向はあるものの、*Fbn1*^{C1039G/+} マウスの変性程度よりも有意に軽減していた。

マクロファージ浸潤に与える影響

動脈壁を抗 F4/80 抗体を用いて免疫染色した。*Fbn1*^{C1039G/+} マウスでは、主に大動脈外膜側に多数のマクロファージ浸潤像を認めた。*Fbn1*^{C1039G/+}; *LysMCre; Tgfbr2*^{fl/fl} マウスでもこの傾向はあるものの、*Fbn1*^{C1039G/+} マウスでの浸潤程度よりも有意に軽減していた。

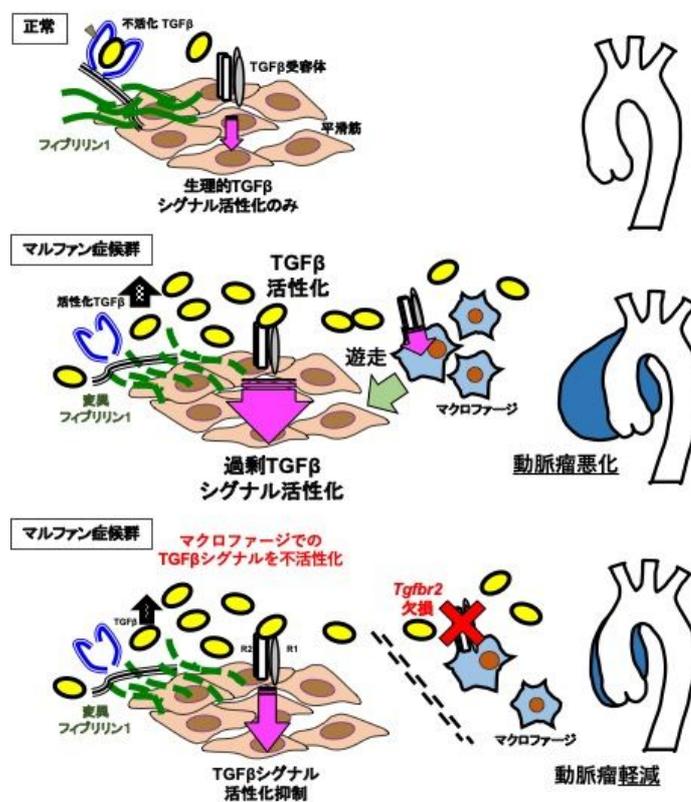
TGF シグナル伝達経路下流 (canonical 経路と non-canonical 経路) に与える影響

TGF シグナル経路の下流には、canonical (古典的) 経路と non-canonical (非古典的) 経路があり、MFS ではいずれの経路も活性化され、その指標としてリン酸化 Smad2/3 やリン酸化 ERK1/2 などが用いられる。動脈壁を抗リン酸化 Smad2/3 抗体、抗リン酸化 ERK1/2 抗体で免疫染色したところ、*Fbn1*^{C1039G/+} マウスでは、リン酸化 Smad2/3 陽性細胞、リン酸化 ERK1/2 陽性細胞ともに著増していた。一方、*Fbn1*^{C1039G/+}; *LysMCre; Tgfbr2*^{fl/fl} マウスでもこの傾向はあるものの、*Fbn1*^{C1039G/+} マウスの活性化程度よりも有意に軽減していた。

(2) TGFβ がマクロファージの in vitro 遊走能に与える影響

MFS では、フィブリリン1の機能・構造異常から細胞外での活性化型 TGFβ の利用度（遊離）が増しており、これはマクロファージの浸潤・活性化にも影響している可能性があると考えた。TGFβ がマクロファージ遊走能に与える影響を調べるため、RAW264.7 細胞を用いたスクラッチアッセイを行ったところ、TGFβ（5ng/mL, 24 時間）は RAW264.7 細胞の増殖能には影響を与えなかったが、その遊走能を有意に上昇させた。

今回の検討では、MFS の動脈壁に浸潤するマクロファージで TGFβ シグナルを不活性化させたところ、動脈瘤形成速度を有意に抑制することができた。従来、動脈壁で活性化した TGFβ は主に中膜平滑筋細胞（または線維芽細胞）に作用すると考えられてきた。一方で、重症例ほど大動脈外壁への炎症細胞の浸潤が多く、今回の検討では、TGFβ がこの炎症細胞にも作用し病態に影響している可能性を疑った。*Fbn1^{C1039G/+}; LysMCre; Tgfb2^{fl/fl}* マウスでは、マクロファージの浸潤が減少し、TGFβ シグナル活性化と動脈瘤形成とも有意に抑制された。これらから、動脈壁に浸潤したマクロファージは、動脈瘤進展に強く関与していることが示唆された（図）。活性化 TGFβ はマクロファージの in vitro 遊走能に作用することが判明し、動脈壁でもその遊走・浸潤能に影響した可能性があるが、今回の検討では、その他の作用（サイトカイン産生など）に与える影響までは検討できなかった点は今後の課題としたい。



図：研究概要。マルファン症候群では、動脈壁でのTGFβシグナルが活性化している（中段）。今回の検討で、マクロファージでのTGFβシグナルを不活性化したところ、動脈壁へのマクロファージの浸潤が減少し、動脈瘤形成が抑制された（最下段）。

MFS では、大動脈瘤に対する降圧薬治療（ロサルタンなど）や自己弁温存大動脈基部置換術などの発達によりその予後は改善傾向にあるが、病態特異的な治療法がなく、依然として若年で致死的な大動脈解離に至る患者も少なくない。本課題において、炎症細胞における TGFβ シグナル抑制がその治療標的となる可能性が示唆され、今後の治療法開発への発展が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計20件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hara Hironori, Maemura Sonoko, Fujiwara Takayuki, Takeda Norifumi, Ishii Satoshi, Yagi Hiroki, Suzuki Takaaki, Harada Mutsuo, Toko Haruhiro, Kanaya Tsubasa, Ijichi Hideaki, Moses Harold L., Takimoto Eiki, Morita Hiroyuki, Akazawa Hiroshi, Komuro Issei	4. 巻 15
2. 論文標題 Inhibition of transforming growth factor- signaling in myeloid cells ameliorates aortic aneurysmal formation in Marfan syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0239908
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0239908	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 Shitara Rieko, Iriyama Takayuki, Sayama Seisuke, Takeda Norifumi, Nagamatsu Takeshi, Osuga Yutaka, Fujii Tomoyuki	4. 巻 60
2. 論文標題 Postpartum Stanford type B aortic dissection in a woman with Loeys-Dietz syndrome who underwent a prophylactic aortic root replacement before conception: A case report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology	6. 最初と最後の頁 145 ~ 147
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tjog.2020.10.005	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 -
1. 著者名 Kamon T, Kaneko H, Kiriyama H, Itoh H, Fujiu K, Kumazawa R, Morita K, Michihata N, Jo T, Miura M, Koderia S, Uehara M, Ando J, Inoue T, Kinoshita O, Yamauchi H, Mori Y, Nakao T, Daimon M, Takeda N, Morita H, Ono M, Yasunaga H, Komuro I	4. 巻 2
2. 論文標題 Transcatheter Aortic Valve Implantation and Surgical Aortic Valve Replacement for Aortic Stenosis in Japan Analysis of a Nationwide Inpatient Database	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Circulation Reports	6. 最初と最後の頁 753 ~ 758
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circrep.CR-20-0116	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 八木宏樹、武田憲文、赤澤宏	4. 巻 60
2. 論文標題 遺伝性大動脈瘤の分子メカニズム	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 脈管学	6. 最初と最後の頁 25 ~ 34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 武田憲文	4. 巻 87
2. 論文標題 大動脈瘤の発生機序をマルファン症候群から理解する	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 循環器内科	6. 最初と最後の頁 617 ~ 623
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 武田憲文	4. 巻 71
2. 論文標題 マルファン症候群	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生体の科学 (特集: 難病研究の進歩)	6. 最初と最後の頁 486 ~ 487
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 八木宏樹、武田憲文	4. 巻 77
2. 論文標題 大動脈疾患 up-to-date 近年急増する大動脈疾患の最新知見	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医学と薬学	6. 最初と最後の頁 1623 ~ 1634
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 武田憲文	4. 巻 63
2. 論文標題 大動脈弁輪拡張症	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 今日の治療指針2021年版	6. 最初と最後の頁 445 ~ 446
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Takeda Norifumi、Komuro Issei	4. 巻 74
2. 論文標題 Genetic basis of hereditary thoracic aortic aneurysms and dissections	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cardiology	6. 最初と最後の頁 136 ~ 143
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jjcc.2019.03.014	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 Fujiwara Takayuki、Takeda Norifumi、Ishii Satoshi、Morita Hiroyuki、Komuro Issei	4. 巻 1
2. 論文標題 Unique Mechanism by Which TGFBR1 Variants Cause 2 Distinct System Diseases Loeys-Dietz Syndrome and Multiple Self-Healing Squamous Epithelioma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Circulation Reports	6. 最初と最後の頁 487 ~ 492
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circrep.CR-19-0098	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 -

1. 著者名 Ouchi Haruki、Nishi Hiroshi、Nakamura Motonobu、Hirakawa Yosuke、Tanaka Tetsuhiro、Takeda Norifumi、Akai Takafumi、Ohashi Yuichi、Hoshina Katsuyuki、Takayama Toshio、Nangaku Masaomi	4. 巻 4
2. 論文標題 Vascular Ehlers-Danlos Syndrome Diagnosed in a Patient Initiating Hemodialysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Kidney International Reports	6. 最初と最後の頁 1646 ~ 1648
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ekir.2019.07.020	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 武田憲文	4. 巻 36
2. 論文標題 マルファン症候群などの遺伝性大動脈疾患のゲノム診療	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medical Practice	6. 最初と最後の頁 441 ~ 443
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 武田憲文	4. 巻 268
2. 論文標題 遺伝性胸部大動脈瘤・解離症	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 789～794
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 武田憲文	4. 巻 40
2. 論文標題 疾患Review：マルファン症候群	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 SRL宝函	6. 最初と最後の頁 21～30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 武田憲文	4. 巻 6(3)
2. 論文標題 血管型エーラス・ダンロス症候群	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 別冊日本臨床領域別症候群シリーズ No.6. 循環器症候群 (第3版)	6. 最初と最後の頁 358～363
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 八木宏樹、赤澤宏、武田憲文	4. 巻 6(3)
2. 論文標題 Marfan症候群	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 別冊日本臨床領域別症候群シリーズ No.6. 循環器症候群 (第3版)	6. 最初と最後の頁 346～351
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 武田憲文	4. 巻 -
2. 論文標題 遺伝性胸部大動脈瘤・解離症	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 別冊・医学のあゆみ：遺伝性心血管疾患のすべて	6. 最初と最後の頁 105～110
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 八木宏樹、武田憲文、赤澤宏	4. 巻 -
2. 論文標題 マルファン症候群の病態生理と精密医療	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 実験医学別冊：循環器学と精密医療	6. 最初と最後の頁 100～109
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Yagi Hiroki, Takeda Norifumi, Akazawa Hiroshi	4. 巻 60
2. 論文標題 Pathophysiology of Hereditary Thoracic Aneurysms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Japanese College of Angiology	6. 最初と最後の頁 25～34
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7133/jca.19-00030	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 八木宏樹、武田憲文	4. 巻 -
2. 論文標題 Marfan症候群における大動脈瘤形成機序	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 新しい臨床を開拓するための分子循環器病学	6. 最初と最後の頁 190～195
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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7件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 張香理、犬塚亮、武田憲文、石浦浩之、戸田達史、織田克利
2. 発表標題 MYH11遺伝子に病的バリエーションをもつ親の子どもに対する発症前診断の経験
3. 学会等名 第44回日本遺伝カウンセリング学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 17.Hiroki Yagi, Hiroshi Akazawa, Qing Liu, Akiko Saga-Kamo, Chizuru Yabumoto, Masahiko Umei, Hiroshi Matsunaga, Hiroshi Kadowaki, Ryo Matsuoka, Norifumi Takeda, Issei Komuro
2. 発表標題 Xanthine oxidoreductase in adventitial macrophages exacerbates aortic aneurysm progression by amplifying ROS generation in a mouse model of Marfan syndrome
3. 学会等名 第84回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 武田憲文
2. 発表標題 循環器診療におけるゲノム診療：遺伝性大動脈疾患の遺伝子解析とその有用性
3. 学会等名 第256回日本循環器学会関東甲信越地方会. 教育セッションII（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 武田憲文
2. 発表標題 マルファン症候群など遺伝性大動脈疾患の外来診療
3. 学会等名 大動脈疾患Web Seminar（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武田憲文
2. 発表標題 マルファン症候群の妊娠リスク管理
3. 学会等名 第30回日本心エコー図学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 帳香里、朝海廣子、犬塚亮、武田憲文
2. 発表標題 マルファン症候群をもつ子どもや親への支援：認定遺伝カウンセラーが見るマルファン外来の現状と課題
3. 学会等名 第55回日本小児循環器学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 口優樹、松林嘉孝、加藤壮、大島寧、武田憲文、犬塚亮、安藤政彦、田中栄
2. 発表標題 マルファン症候群症候群症例の身体的特徴および側弯度重症化に関連する因子の検討
3. 学会等名 第53回日本側彎症学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>マルファン外来：研究・社会活動 http://square.umin.ac.jp/marfan/news_publications.html</p>

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