

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08521

研究課題名(和文)大動脈瘤化の分子機序の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism of aortic aneurysm development

研究代表者

鶴田 敏博(Tsuruda, Toshihiro)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：10389570

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)：本研究は、骨粗しょう症と大動脈瘤の発症に共通の分子基盤があると考え、骨代謝因子から大動脈瘤の内科的治療法を模索する、分野横断的な研究であった。ヒト腹部大動脈瘤中膜におけるオステオプロテグリン発現レベルの低下を認めため、遺伝的に同分子が欠損するマウスを用いて動脈瘤モデルの作成を試みた。同マウスは対照群と比較して破裂死する個体が多くみられ、大動脈中膜・外膜壁厚が薄く、エラスチン線維の断裂が観察された。希少疾患である「若年性パージェット病」の血管病変から大動脈瘤化の分子機序を解明したが、これらの得られた情報が高齢者に多い大動脈瘤の診断や治療へ応用することできるかが今後の課題である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨と血管をつなぐ病態研究が精力的に行われている。オステオプロテグリン(OPG)遺伝子の欠損(機能低下)は若年性パージェット病の原因遺伝子であるが、OPGは骨リモデリングの中心的な担い手であり、骨粗しょう症や慢性関節リウマチなどの骨疾患に関与する。さらに、がん、免疫、代謝にも影響することが明らかにされつつある。本研究では大動脈瘤化におけるOPGの役割を明らかにして、骨と血管の両者の機能を増強させ得る新規の治療法を模索し、健康長寿期間の延伸を目指す基盤研究である。

研究成果の概要(英文)：This study aimed at evaluating the association between bone and abdominal aortic aneurysm using human aorta and mouse model. We focused on the receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG). We found that OPG immunoreactivity was decreased in the medial layer of abdominal aortic aneurysm. Based on the finding, we administered the angiotensin II to wild-type (WT) and OPG knockout mice, and we found that OPG knockout mice exhibited the increased incidence of aortic rupture and dissection, compared with WT mice. The morphological changes were associated with the decreased medial and adventitial thickness, and increased the number of elastin fragmentation. On the other hand, recombinant OPG administration rescued the detrimental effects in these mice. This study suggests an important role for RANKL/OPG to preserve the aortic structure.

研究分野：循環器内科学

キーワード：動脈瘤 骨代謝因子 加齢 大動脈

## 1. 研究開始当初の背景

大動脈は内膜、中膜および外膜の三層から成る。腹部大動脈瘤は大動脈径が3 cm (正常の1.5倍)以上に拡張する、「血管拡張性リモデリング」の病型である。なぜ、大動脈が瘤化するのか、原因はよく分かっていない。組織学上、中膜の菲薄化や弾性線維の断片化が観察される。また、大動脈瘤の外膜にはマクロファージやリンパ球など炎症細胞の浸潤が観察され、免疫応答の関与が示唆される。我々は、外膜へ浸潤する「マスト細胞」の関与 (Tsuruda T. *Circ Res.* 2008) や、マスト細胞 - マクロファージ間のクロストークによる外膜の炎症機転 (Tsuruda T. *Arterioscler, Thromb, Vasc Biol.* 2012) の重要性について報告した。その後、手術を拒否したひとりの腹部大動脈瘤患者を7年間、<sup>18</sup>F-fluorodeoxyglucose (FDG)-PET-CTで血管壁の炎症を追跡する機会を得た。大動脈瘤部へ<sup>18</sup>F-FDG集積が亢進するのは、瘤径が拡大し破裂死に至る最後の2年であった (Tsuruda T. *Medicine.* 2016)。当患者より得た経験から、外膜の炎症は瘤拡大 - 破裂に関わる重要な因子であるが、大動脈が瘤化し始める初期因子 (イニシエーション) ではないことが推察された。

## 2. 研究の目的

どのような機序で大動脈は瘤化し始めるのだろうか？ この疑問を明らかにするために、2つの研究課題を企画した。第1の研究課題は、手術中に複数箇所より採取したヒト腹部大動脈瘤壁内のOPG発現・局在性を調べ、大動脈の瘤化の過程におけるOPGの役割を考察した。第2の研究課題では、動脈硬化のない若年期に動脈が瘤化する疾患を検索し、その分子機序を探ることであった。「若年性パージェット病」は骨代謝回転の超亢進により、乳幼児期から骨変形・骨折を生じる常染色体劣性の遺伝性疾患である。*Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11B (TNFRSF11B)*がコードするOPG遺伝子の欠損 (変異) が原因である (Whyte MP. 2002)。OPGはRANKLの「おとり受容体」として真の受容体RANKへの結合を遮断し、破骨細胞への分化を調節する (Simonet WS. 1997)。OPGは全身組織に広く発現し (Yasuda H. 1998; Zhang J. 2002)、血中OPG濃度は心不全や動脈硬化性疾患で上昇する (Ueland T. 2005; Lee CJ. 2015)。これは、OPGが心血管組織の構造や機能にも関与することを強く示唆する。同患者は骨病変以外に、血管の石灰化、巨大な動脈瘤、高血圧、心不全などを発症し、早死する (Polyzos SA. 2018; Baud'huin M. 2013)。OPG遺伝子欠損マウスの表現型は、若年性パージェット病の病態と似る。我々はOPG遺伝子欠損マウスが若年期より、骨は脆弱、血圧が高値、そして加齢とともに心不全を呈することを報告した (Tsuruda T. *Cardiovasc Res.* 2016)。本研究では、OPG遺伝子欠損マウスの大動脈の構造を精査し、瘤化との関連性を調べた。

## 3. 研究の方法

- 1) ヒト腹部大動脈瘤壁を用いてOPG免疫活性の局在について検討した。
- 2) OPG欠損マウスと野生型 (WT) マウスにアンジオテンシン II を28日間投与して、大動脈瘤形成の頻度、および組織学的・分子生物学的評価を行った。

## 4. 研究成果

動脈硬化の乏しいヒト大動脈壁におけるOPG免疫活性の主座は中膜の平滑筋細胞であったが、中膜が菲薄化し平滑筋細胞が消失した腹部大動脈瘤壁では同部位にOPG免疫活性は観察されず、一方で動脈硬化プラークのマクロファージにその免疫活性を認めた。さらにOPG免疫活性の局在部位はプロテオグリカン (アルシャン青染色) の局在部位と一致した。この観察結果よりOPGは血管壁で多面的な作用を有する可能性が示唆された。それゆえ、我々は動脈硬化プラークを呈さない動脈瘤モデルを利用し、動脈瘤形成におけるOPGの役割について調査することとした。8週齢の野生型 (WT) およびOPG欠損 (OPGKO) マウスにアンジオテンシン II (Ang II) (1,000 ng/kg/min) を28日間投与するとOPGKOマウスで破裂死する個体が多く ( $X^2=8.024$ ,  $P=0.005$ , OPGKO 10/47 vs. WT 0/33) 腎動脈分岐上部の大動脈径が拡大することを観察した ( $P=0.00024$ )。血管形態の組織評価を行ったところ、OPGKOマウスはWTマウスと比べて胸部大動脈、腎動脈上部の大動脈の中膜と外膜壁厚が薄く、断裂したエラスチン線維が多く観察された。われわれは石灰沈着が血圧上昇によるエラスチンの断裂を助長すると考えたが、アリザリンやコッサ染色で血管壁の石灰沈着を観察できなかった。大動脈解離・破裂の過程に介在する分子を探索するため、DNAアレイを行ったところ、ペリオスチン遺伝子レベルがAng II-OPGKOマウスで上昇することを見出した。ペリオスチンは細胞表面の受容体で、インテグリンのリガンドとして機能し、腹部大動脈瘤壁で発現が亢進することが報告される。さらにRANKLはペリオスチン発現を誘導することから、OPGが欠損するとRANKL生物活性がペリオスチンを介して細胞外マトリックス代謝に影響した可能性がある。一方でリコンビナントOPGをAng II-OPGKOマウスに投与すると死亡率 ( $X^2=43.5$ ,  $P<0.0001$ ) 大動脈破裂 ( $X^2=3.07$ ,  $P=0.08$ ) 大動脈解離 ( $X^2=29.8$ ,  $P<0.0001$ ) 腎動脈分岐上部の大動脈径 ( $P<0.001$ ) が減少したことは興味深い。また、可溶性RANKL濃度やペ

リオスチン発現が低下し、エラスチン線維断裂が減少した。これらより骨代謝調節因子として発見された RANKL/RANK/OPG システムが血管壁の構築にも影響している可能性が示唆された。

本研究は、骨粗しょう症と大動脈瘤の発症に共通の分子基盤があると考え、骨代謝因子から大動脈瘤の内科的治療法を模索する、分野横断的な研究であった。希少疾患である「若年性パージエット病」の血管病変から大動脈瘤化の分子機序を解明したが、これらの得られた情報が高齢者に多い大動脈瘤の診断や治療へ応用することができるかが今後の課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tsuruda T, Yoshikawa N, Kai M, Yamaguchi M, Toida R, Kodama T, Kajihara K, Kawabata T, Nakamura T, Sakata K, Hatakeyama K, Gi T, Asada Y, Tono T, Kitamura K, Ikeda R	4. 巻 60
2. 論文標題 The Cytokine Expression in Patients with Cardiac Complication after Immune Checkpoint Inhibitor Therapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 423-429
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2169/internalmedicine.5317-20	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 Tsuruda T, Sato Y, Tomita M, Tanaka H, Hatakeyama K, Otsu M, Kawano A, Nagatomo K, Yoshikawa N, Ikeda R, Asada Y, Kaikita K	4. 巻 9
2. 論文標題 Aberrant expression of cardiac troponin-T in lung cancer tissues in association with pathological severity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontier Cardiovascular Medicine	6. 最初と最後の頁 833649
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcvm.2022.833649	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 Tsuruda T, Yamashita A, Otsu M, Koide M, Nakamichi Y, Sekita-Hatakeyama Y, Hatakeyama K, Funamoto T, Chosa E, Asada Y, Udagawa N, Kato J, Kitamura K	4. 巻 11
2. 論文標題 Angiotensin II induces aortic rupture and dissection in osteoprotegerin-deficient mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the American Heart Association	6. 最初と最後の頁 e025336
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/JAHA.122.025336	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 鶴田敏博、小出雅則、中道裕子、中村美どり、宇田川信之、北村和雄
2. 発表標題 心血管保護因子としてのオステオプロテゲリン
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tsuruda T, Yamashita A, Hatakeyama K, Asada Y, Kitamura K
2. 発表標題 Osteoprotegerin is co-localized with versican, and plays a role in maintaining the structural integrity in aorta
3. 学会等名 American Heart Association. Scientific Sessions 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 鶴田敏博、北村和雄	4. 発行年 2020年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 3
3. 書名 循環器疾患 最新の治療2020-2021	

〔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	畠山 金太 (Hatakeyama Kinta) (60325735)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・病院・部長  (84404)	
研究分担者	山下 篤 (Yamashita Atsushi) (90372797)	宮崎大学・医学部・准教授  (17601)	
研究分担者	澤口 朗 (Sawaguchi Akira) (30336292)	宮崎大学・医学部・教授  (17601)	

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