

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18197

研究課題名（和文）大動脈解離におけるチロシンキナーゼSykによる生体防御機構の解明と治療応用

研究課題名（英文）Elucidation of biological defense mechanism by tyrosine kinase Syk in aortic dissection and therapeutic application

研究代表者

橋本 洋平（Hashimoto, Yohei）

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：10811086

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：大動脈解離病態では平滑筋細胞と炎症細胞が、組織破壊と生体防御に関与する。我々はマウス解離モデルにおける炎症応答制御分子Sykの役割を検討した。解離組織では炎症細胞と平滑筋細胞でSyk活性を認めた。特異的Syk阻害薬をマウス解離モデルに投与すると解離は重篤化し死亡率が増加した。遺伝子発現および炎症性サイトカイン解析から、Syk阻害薬は全身的な免疫応答を抑制するが大動脈局所の制御性T細胞を抑制し炎症応答を促進することが示唆された。Sykは全身と局所の炎症応答を協調させ大動脈を保護する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大動脈解離は中高年に好発する致死的な急性大動脈症候群の1つである。人口の高齢化に伴い増加しているが、発症機序や分子病態に謎が多く新たな診断・治療・予防法の開発の妨げとなっている。本研究の結果から、Syk阻害が解離の増悪と死亡率増加を助長することが明らかになった。Syk活性が大動脈解離病態において免疫関連分子を制御し大動脈組織保護の中心的役割を果たすことが示唆され、解離病態解明に繋がる新たな知見となった。また、偶発的ではあるが、Syk阻害薬が免疫寛容の主体である制御性T細胞を抑制していることも示唆し他分野への応用に繋がる知見を得た。

研究成果の概要（英文）：In pathogenesis of aortic dissection (AD), smooth muscle and inflammatory cells participate in tissue destruction and defense. We found that Syk was activated in inflammatory and smooth muscle cells in AD. Administration of fostamatinib, a specific Syk inhibitor, resulted in worsening of AD with increase in mortality. Analyses of transcriptome and inflammatory cytokines indicated that fostamatinib suppressed systemic inflammatory response, but augmented local inflammatory response with suppression of regulatory T cell in the aorta. Syk may coordinate the systemic and local inflammatory responses to protect aorta from AD.

研究分野：循環器

キーワード：Syk 大動脈解離 マクロファージ 平滑筋 spleen tyrosine kinase

1. 研究開始当初の背景

大動脈解離は、大動脈中膜の亀裂で生じた偽腔が急速に拡大する致命的な疾患である。近位部解離に対する緊急手術以外に積極的な治療はなく、救命し得ても5年以内に半数が瘤化、末梢虚血、再解離など重篤な合併症を起こす。働き盛りの50代以上で好発するため社会的影響が大きく人口高齢化に伴い発症が増加している。診断・治療・予防法の開発のために病態解明が急務である。近年の研究では、炎症性サイトカインで活性化したマクロファージおよび好中球から分泌されるマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)が大動脈壁の細胞外マトリックス(ECM)を破壊することで解離が起こるとされている。我々は、解離は微小血管傷害を前駆病変として進展することを見出し、マクロファージの炎症シグナル分子 Stat3 の活性化が解離を増悪させるのに対して、平滑筋細胞の Stat3 活性化は解離を抑制することを発見した。これは破壊と修復という炎症の二面性を反映すると考えられる。さらに大動脈瘤では Syk が活性化し瘤形成を促進することを発見した。Syk は非受容体型チロシンキナーゼであり炎症応答を制御するとの報告があり、近年では平滑筋細胞でも Syk が増殖、遊走、血管傷害応答に関わるとの報告もあるが、解離病態における Syk の役割は不明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は解離病態において Syk を中心とする組織保護機構を解明することである。

3. 研究の方法

我々は、コラーゲン架橋酵素阻害薬 アミノプロピオニトリルとアンジオテンシン (BAPN + Ang) を浸透圧ポンプを用いて持続投与することにより、2週間の経過で発症進展の予測が可能な再現性の高い解離モデルを開発した。このモデルでは BAPN+AngII 開始後14日で約80%のマウスで大動脈解離を生じた。同モデルを用いて Syk 阻害薬である fostamatinib の投与群、非投与群における2週間後の重症度、死亡率の検証を行った(図1)。また、大動脈組織に対して Syk の活性部位や程度を確認するために、免疫組織化学染色、蛍光免疫二重染色を行った。さらに、我々は解離マウスモデルにおける大動脈解離発症前の大動脈組織に対しトランスクリプトーム分析とサイトカイン分析を行った。

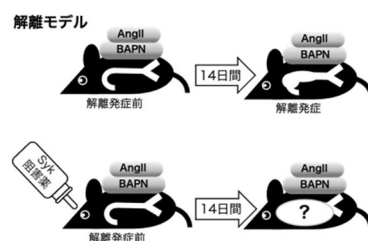


図1 .Syk 阻害薬による大動脈解離の重症度、死亡率の検証

4. 研究成果

免疫組織化学染色では、活性化(リン酸化) Syk (pSyk) は正常なマウス大動脈壁では認められず、解離発生後の大動脈壁で観察された。pSyk と平滑筋アクチンに対する蛍光二重免疫染色では、浸潤炎症細胞および平滑筋細胞で Syk 活性化が認められた(図2)。ウェスタンブロット解析では、BAPN+AngII 投与3日目(解離発症前)に Syk 活性化がみられ、その後一時的に Syk 活性が低下した後、14日目(大動脈解離発生後)に再活性化が認められた(図3)。Syk 活性化の意義を評価するため、BAPN+AngII 投与1週間前および投与中に特異的 Syk 抑制薬 fostamatinib をマウスに経口投与した。大動脈破裂死亡について生存曲線解析を行ったところ、コントロール群(0.0%, n=12)と比較して fostamatinib 投与群(41.7%, n=12)では有意に悪化した(P<0.05)。病変長で評価した解離重篤度は、コントロール群(3.80±0.86mm, n=12)に対して fostamatinib 群(8.87±1.69mm, n=12)では有意に増悪していた(P<0.05)(図4)。ウェスタンブロット解析では、Syk は BAPN+Ang の注入により活性化され、fostamatinib により抑制された(図5)。BAPN+Ang の注入は、炎症反応の重要な調節因子である Stat3 の活性化も引き起こし、これも fostamatinib によって抑制された(図6)。トランスクリプトーム分析では、fostamatinib が免疫、防御、炎症応答の正負双方の制御因子の発現変化を抑制することが示された(表1)。また、fostamatinib により制御性T細胞(Treg細胞)の細胞マーカーである FOXP3 が抑制されることが分かった(図7)。BioPlex によるサイトカインの評価では Treg 細胞のエフェクター分子である血清 IL-10 も抑制された(図8)。これらの発見は、Syk 活性が大動脈解離病態において大動脈組織保護的に作用している可能性を示唆した。また、Syk 阻害薬である fostamatinib により制御性T細胞(Treg細胞)の抑制を示唆する所見を得ており、免疫制御という新たな分野への展望

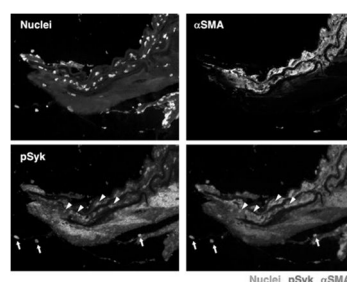


図2. 蛍光二重免疫染色



図3 解離モデルマウスの大動脈組織蛋白のウェスタンブロット

も示された。

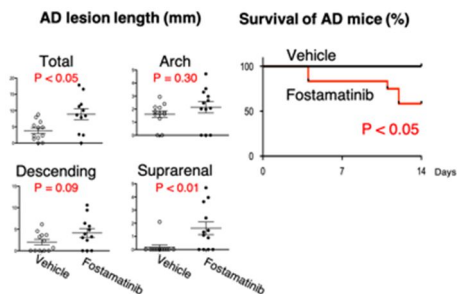


図 4 . 解離病変長と生存直線

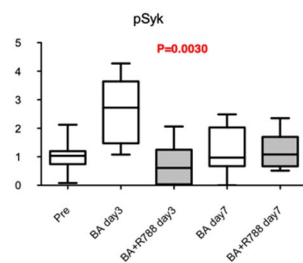


図 5 . fostamatinib 投与による pSyk の抑制

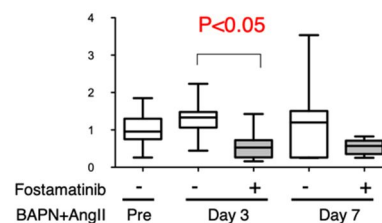


図 6 . fostamatinib 投与による pStat3 の抑制

Enrichment Score:10.873248131380839
GO:0006955--immune response
GO:0006952--defense response
GO:0045087--innate immune response
Enrichment Score:7.481060455584649
GO:0006952--defense response
GO:0006954--inflammatory response
GO:0080134--regulation of response to stress
Enrichment Score:5.472052458181703
GO:0002682--regulation of immune system process
GO:0006955--immune response
GO:0045321--leukocyte activation

Enrichment Score:4.646043252485904
GO:0098552--side of membrane
GO:0009897--external side of plasma membrane
GO:0009986--cell surface
Enrichment Score:3.83960107879205
GO:0031349--positive regulation of defense response
GO:0045089--positive regulation of innate immune response
Enrichment Score:3.8296510947846203
GO:0002683--negative regulation of immune system process
GO:0051241--negative regulation of multicellular organismal process
GO:0030099--myeloid cell differentiation
GO:0051093--negative regulation of developmental process

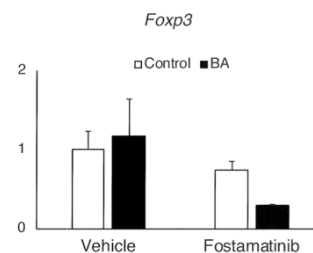


図 7 . fostamatinib 投与による Fxp3 の抑制

表 1 . 解離病態における fostamatinib によって抑制される遺伝子のトランスクリプトーム分析

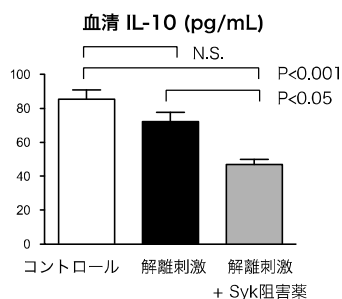


図 8 . fostamatinib 投与による IL-10 の抑制

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hashimoto Y, Aoki H, Majima R, Hayashi M, Nishida N, Ito S, Furusho A, Hirakata S, Ohno-Urabe S, Fukumoto Y
2. 発表標題 Syk activation is a defense mechanism in murine model of aortic dissection
3. 学会等名 European Society of Cardiology Congress2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hashimoto Y, Aoki H, Majima R, Hayashi M, Nishida N, Ito S, Furusho A, Hirakata S, Ohno-Urabe S, Fukumoto Y
2. 発表標題 Syk activates the protective mechanism of aorta in the mouse model of aortic dissection
3. 学会等名 European Society of Cardiology Congress2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hashimoto Y, Aoki H, Majima R, Hayashi M, Nishida N, Ito S, Furusho A, Hirakata S, Ohno-Urabe S, Fukumoto Y
2. 発表標題 Syk Activation is a Defense Mechanism of Aortic Wall against Aortic Dissection
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

〔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
---------	---------