

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03766

研究課題名（和文）大動脈瘤の退縮治癒を促進する力学刺激-免疫連関制御療法の創成

研究課題名（英文）Development of a novel therapy targeting the interaction between mechanical stress and immune-inflammatory responses for regression of aortic aneurysms

研究代表者

吉村 耕一（Yoshimura, Koichi）

山口大学・大学院医学系研究科・准教授（特命）

研究者番号：00322248

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：大動脈瘤は破裂により突然死を来す疾患である。治療法は外科的治療に限られているため、病態解明に基づく新規治療法の開発が待ち望まれている。本研究において、過度な力学的刺激がマクロファージの免疫・炎症応答を増長することが明らかになった。さらに、シグナル分子mitogen-activated protein kinase 9 (MAPK9)の薬物的抑制によって、力学的刺激により増長されるマクロファージの免疫・炎症応答が阻止され、さらに力学的刺激下で誘発される大動脈瘤モデル動物の病変の進行が軽減された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究における発見から、大動脈瘤病変部特有の力学刺激と免疫・炎症応答系との連関が制御可能であることと、その制御が新規治療法に繋がる可能性があることが示された。病変部特有の力学刺激と免疫・炎症応答系との連関を標的とすれば、全身の免疫系には影響しない、副作用の少ない治療法が期待できる。さらに、広く慢性炎症性疾患に対する新たな作用機序の抗炎症薬の提供にも繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Aortic aneurysms are life-threatening diseases due to aortic rupture. Since therapeutic options are limited, development of novel pharmacotherapy has been needed. In this study, we found that excessive level of mechanical stress on macrophages accelerated immune-inflammatory responses. Further, our data suggested that pharmacologic inhibition of mitogen-activated protein kinase 9 (MAPK9) reduced inflammatory responses in macrophages and also slowed disease progression, under mechanical stress conditions.

研究分野：心臓血管外科学

キーワード：大動脈瘤 力学刺激

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、加齢とともに増加するがん、肺気腫、動脈硬化、肥満、アルツハイマー病などの種々の疾患の発症・進行に慢性炎症が関与していることが指摘され、これら加齢関連疾患の基盤病態として慢性炎症が注目されている(引用文献)。高齢者死亡原因の上位にランクされる大動脈瘤も、慢性炎症による不可逆的な組織破壊の進行から破綻に至る疾患である。破裂リスクの高い大径の大動脈瘤は人工血管置換手術またはステントグラフト内挿術によって治療されるが、内科的治療では根治はおろか進行防止さえ困難なのが現状である。大動脈瘤を含む慢性炎症疾患患者の予後と QOL を向上するためには、新たな視点での慢性炎症の病態理解と治療戦略開発が必須である(引用文献)。

(2) 高血圧が大動脈瘤発症の最大のリスク因子であり、ステントグラフトによる力学刺激遮断が治療として有効なことから、力学刺激応答が疾患発症・進行の鍵である可能性は高い。研究代表者は、過度な力学刺激が細胞内シグナル系を介して炎症シグナルに変換されること(引用文献)さらに炎症シグナルが基質分解・炎症系を正に、基質合成・修復系を負に制御して組織破壊を促進することを見出した(引用文献)。特にマクロファージにおけるシグナル系が、炎症を遷延化させて瘤病変を進行させる鍵であった(引用文献)。

(3) 免疫系には、過剰な炎症にならずに適切に修復に向かうよう、活性化機構とともに抑制機構も備わっている。マクロファージが炎症促進型から組織治癒型、さらには炎症収束型へと形質転換する機序もその一つである(引用文献)。しかし慢性炎症では、免疫応答によって引き起こされた炎症が収束せず遷延している。そのため免疫系を抑制する治療戦略が望まれるが、免疫抑制には副作用のリスクが伴う。実際、抗 Interleukin-1 β 抗体薬の臨床試験で心血管イベントの抑制効果が確認されたが、同時に致死的感染症の発生が増加した(引用文献)。本研究で開発する力学刺激と免疫系の連関を制御する戦略は、病変部特有の刺激応答を標的とするため、理論上全身の免疫系に影響することなく、有効な抗炎症効果を得ることを可能にできる。

(4) 最近、組織治癒型マクロファージへの形質転換が傷害組織の修復に重要であることが報告された(引用文献)。この報告によって、本研究の力学刺激-免疫連関制御療法は、単なる抗炎症治療ではなく、組織治癒型マクロファージを誘導して積極的に修復治癒・組織再生を促進する、実現可能な治療戦略であると裏付けられた。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、大動脈瘤における慢性炎症の分子病態を解明し、新たな治療法の開発を目指すものである。本研究の目的は、異常な力学刺激と免疫細胞マクロファージとの連関が大動脈瘤組織における慢性炎症と進行性組織破壊及び修復不全を推進する鍵であることを実証することである。より具体的には、過度な力学刺激がマクロファージのシグナル分子 mitogen-activated protein kinase 9 (MAPK9) 活性化を介して、炎症を遷延化すると同時に修復を抑制していることを実証する。また、不可逆的に組織破壊が進行する大動脈瘤に対する組織再生治療法として、力学刺激と免疫系マクロファージとの連関を制御する薬物療法を開発する。より具体的には、大動脈瘤の組織再生を促進する治療法として、マクロファージ選択的に MAPK9 を特異的に阻害する薬剤を開発する。

(2) 本研究の核心をなす「問い」は、「大動脈瘤の炎症はなぜ遷延し続け、なぜ修復治癒に転換しないのか」と、「どんな非侵襲的治療戦略が、修復治癒・組織再生の促進を可能にするか」である。本研究では、これらの「問い」を究明し、大動脈瘤を含む慢性炎症疾患克服の一助となる新たな治療戦略を提示することによって、学術領域並びに社会に貢献する。

3. 研究の方法

(1) ヒト病変組織におけるマクロファージと MAPK9 シグナル系を解析するために、手術症例から大動脈瘤病変組織を入手し、マクロファージ浸潤程度並びに MAPK9 活性等をウエスタンブロット法と免疫組織染色等により解析した。

(2) マクロファージへの過度な力学刺激が炎症系分子を亢進することを明らかにするために、野生型雄マウス腹腔由来のマクロファージを採取し、炎症促進型マクロファージに誘導するために Lipopolysaccharide (LPS) を添加した。MAPK9 をリン酸化型 MAPK9 蛋白発現として、さらに炎症分子の Nitric Oxide Synthase 2 (NOS2) 蛋白発現をウエスタンブロットで定量解析した。内部標準として Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いた。

(3) 血圧上昇に伴う大動脈壁への力学刺激応答が炎症系・基質分解系分子の発現を亢進することを生体内で明らかにするために、野生型雄マウスにアンジオテンシン Ⅱ を持続投与することで誘発される大動脈瘤モデルを作成した(引用文献)。さらに、MAPK9 を特異的に抑制するために、MAPK9 遺伝子欠損マウスを用いてアンジオテンシン Ⅱ 持続投与による瘤モデルを作成して実験を行った。

(4) マクロファージ選択的 MAPK9 特異的阻害剤を開発するために、Clift らの方法(引用文献)に準じて、抗体含有微小粒子製剤を試作した。より具体的には、抗体の種類や担体微小粒子の粒子径等の各種作製条件を変え、培養マクロファージ細胞実験系において MAPK9 抑制効果並びに抗炎症効果を指標として、製剤の作製条件の最適化を試みた。

(5) 上の(3)と同様、血圧上昇に伴う大動脈壁への力学刺激応答を再現するために、野生型雄マウスにアンジオテンシン Ⅱ を持続投与することで誘発される大動脈瘤モデルを作成した。さらに、MAPK9 を薬物療法によって抑制するために、瘤モデルマウスに対して MAPK9 阻害活性を有する低分子化合物を持続投与する実験を行った。

4. 研究成果

(1) 手術症例から得られたヒト大動脈瘤病変組織を解析した結果、対照の大動脈組織に比べて、MAPK9 活性化マクロファージの集積が亢進していることが確認された。

(2) マウス腹腔由来の培養マクロファージは、LPS 刺激後に NOS2 等の炎症系蛋白の発現を亢進させ炎症促進型を呈した。過度な周期的進展刺激は、LPS 刺激後の NOS2 蛋白発現亢進を顕著に増長した。すなわち、培養マクロファージにおいて過度な伸展刺激に応答して炎症系分子を亢進することが確認された。

(3) アンジオテンシン持続投与で誘発される大動脈瘤疾患モデルマウスでは、過度な力学刺激により病変組織において MAPK9 活性化とマクロファージ集積がみられることが確認された。さらに、MAPK9 発現を抑制したモデルマウスでは、瘤の病変発症が軽減されることが確認された。

(4) マクロファージ選択的 MAPK9 特異的阻害剤として、抗体含有微小粒子製剤を試作し、培養マクロファージ細胞実験系において抗体の種類や担体微小粒子の粒子径等の各種作製条件の最適化を試みた。しかし、MAPK9 阻害活性を有する低分子化合物の効果を上回る作製条件を見出すには至らなかった。

(5) 上の(4)の結果から、疾患モデルマウス実験系における検証実験では、代替的に、MAPK9 阻害活性を有する低分子化合物を用いることとした。その結果、マウス大動脈瘤モデルの病変進行が、その MAPK9 阻害剤によって阻止されることと、組織の治癒傾向が認められることが確認された。

(6) 本研究の結果から、マクロファージ細胞への過度な力学刺激はシグナル分子 MAPK9 を活性化し、マウス大動脈瘤組織においては炎症を遷延化すると同時に修復を抑制していることが示唆された。

<引用文献>

Shaw AC, Goldstein DR, Montgomery RR. Age-dependent dysregulation of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 13(12):875-87, 2013.

Yoshimura K, Morikage N, Nishino-Fujimoto S, Furutani A, Shirasawa B, Hamano K. Current Status and Perspectives on Pharmacologic Therapy for Abdominal Aortic Aneurysm. *Curr Drug Targets* 19(11): 1265-1275, 2018.

Sakalihasan N, Michel JB, Katsargyris A, Kuivaniemi H, Defraigne JO, Nchimi A, Powell JT, Yoshimura K, Hultgren R. Abdominal aortic aneurysms. *Nature Reviews Disease Primers* 4, Article number 34, 2018.

Yamashita O, Yoshimura K, Nagasawa A, Ueda K, Morikage N, Ikeda Y, Hamano K. Periostin Links Mechanical Strain to Inflammation in Abdominal Aortic Aneurysm. *PLoS ONE*. 8(11): e79753, 2013.

Yoshimura K, Aoki H, Ikeda Y, Fujii K, Akiyama N, Furutani A, Hoshii Y, Tanaka N, Ricci R, Ishihara T, Esato K, Hamano K, Matsuzaki M. Regression of abdominal aortic aneurysm by inhibition of c-Jun N-terminal kinase. *Nature Medicine* 11: 1330-1338, 2005.

Harada T, Yoshimura K, Yamashita O, Ueda K, Morikage N, Sawada Y, Hamano K. Focal

Adhesion Kinase Promotes the Progression of Aortic Aneurysm by Modulating Macrophage Behavior. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 37(1): 156-165, 2017.

Wynn TA, Vannella KM. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity* 44(3): 450-462, 2016.

Ridker PM, Everett BM, Thuren T, et al. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med.* 377(12):1119-1131, 2017.

Bouchery T, Harris NL. Specific repair by discerning macrophages. *Science* 356(6342):1014, 2017

Clift D, McEwan WA, Labzin LI, et al. A Method for the Acute and Rapid Degradation of Endogenous Proteins. *Cell* 171(7):1692-1706.e18, 2017.

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 Lucia Musumeci, Wolf Eilenberg, Joel Pincemail, Koichi Yoshimura, Natzi Sakalihasan	4. 巻 10(12)
2. 論文標題 Towards Precritical Medical Therapy of the Abdominal Aortic Aneurysm	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 3066
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biomedicines10123066	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3件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Koichi Yoshimura
2. 発表標題 Mechanistic link between mechanical stress and inflammation in abdominal aortic aneurysm
3. 学会等名 第48回日本血管外科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Koichi Yoshimura
2. 発表標題 Role of mechanosensing signaling pathways during progression of aortic aneurysms
3. 学会等名 70th ESCVS Congress & 7th IMAD Meeting（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Koichi Yoshimura
2. 発表標題 Current status and perspectives on pharmacologic therapy for abdominal aortic aneurysm
3. 学会等名 70th ESCVS Congress & 7th IMAD Meeting（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 吉村耕一, 青木浩樹	4. 発行年 2021年
2. 出版社 株式会社エル・アイ・シー	5. 総ページ数 594
3. 書名 第6節 マウス大動脈瘤モデル. モデル動物の作製と利用 - 循環器疾患2021 <上巻>	

〔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	原田 剛佑 (Harada Takasuke) (60650322)	山口大学・医学部附属病院・助教 (15501)	

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