

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月29日現在

機関番号：15501
 研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21390362
 研究課題名（和文）メカニカルストレスセンサーを分子標的とした大動脈瘤新規治療法の開発
 研究課題名（英文）Novel therapy for aortic aneurysms by targeting a mechanical stress sensor
 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

研究成果の概要（和文）：大動脈瘤病態の特徴は慢性炎症である。従来から、メカニカルストレスが大動脈瘤病態に重要であることは示唆されてきたが、その分子機序は不明のままであった。本研究において、大動脈瘤壁のマクロファージがメカニカルストレス刺激に応答して炎症シグナルを活性化し、炎症性サイトカインの分泌を亢進することが明らかとなった。また、メカニカルストレスと炎症応答を繋ぐセンサー分子として、ASC が重要な役割を果たす可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Abdominal aortic aneurysm (AAA) is characterized by chronic inflammation. Although a mechanical stress may contribute to pathogenesis of AAA, the mechanism that connects mechanical stress to inflammation is not yet understood. In this study, we demonstrated that the mechanical stress caused the activation of inflammatory signaling molecule and the release of inflammatory cytokine in macrophages. In addition, our data suggested that ASC might be critical for the linkage between mechanical stress and inflammatory response.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2010年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2011年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
年度			
年度			
総計	13,500,000	4,050,000	17,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：大動脈瘤，メカニカルストレス，炎症

1. 研究開始当初の背景

(1) 大動脈瘤は、破裂により突然死に至る重要な血管外科疾患であり、高齢者男性の死亡原因の上位にランクされている。ステントグラフト治療を含む外科手術成績の向上に

もかかわらず、依然として治療に難渋する症例は少なくない。さらに、手術適応外の小径瘤では有効な治療手段が無いのも現状である。大動脈瘤克服のためには分子病態の解明とそれに基づく新規治療法の確立が急務で

ある。

(2) 従来、大動脈瘤は慢性炎症と細胞死を伴う不可逆的な進行性の組織破壊病変であり、薬物治療は不可能と信じられていた。しかし研究代表者らは、細胞内ストレス応答分子 c-Jun N-terminal kinase (JNK) を阻害する薬物療法により大動脈瘤の退縮治癒が可能であることを、世界で初めて実証した (Yoshimura, Nature Medicine 2005, 特開 2007- 51086, WO 2006/022281 A1)。JNK は有効な大動脈瘤治療標的分子であるが、多様な役割を有しており、免疫応答にも関わるため、JNK 阻害剤の臨床応用においては慎重を要すると推測された。したがって、より大動脈瘤病態に特異的な治療標的の同定が必要と考えられた。

(3) ステントグラフト治療後に瘤が退縮治癒する事実から、メカニカルストレス応答は大動脈瘤病態における重要な因子に違いなく、メカニカルストレスに対する刺激応答の抑制が大動脈瘤治療に有効である可能性は極めて高い。しかしながら、これまで大動脈瘤におけるメカニカルストレス応答の分子機序は全く不明であった。

(4) 研究代表者らは、メカニカルストレスによって誘導されるマクロファージの炎症応答 (IL-1 β 分泌) が、Caspase-1 阻害により抑制できることを発見し (未発表データ)、Caspase-1 活性化に必須のアダプター分子 ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing CARD) に着目した。

(5) ASC は、連携研究者の谷口らによって発見された分子であり、Caspase-1 活性化のアダプター分子として NALP ファミリー分子と共にインフラマソーム複合体形成に必須である。この ASC/Caspase-1 は、主に IL-1 β の分泌を介して炎症促進に働くが、一方で細胞死を誘導する場合もある (Taniguchi, Semin Immunopathol 2007, Mariathasan, Nat Rev Immunol 2007)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ASC/Caspase-1 がメカニカルストレスセンサーとして大動脈瘤病態を制御する鍵分子であり、大動脈瘤治療の分子標的となりうることを示すことである。

具体的な目標としては、(1) 培養実験系において、ASC/Caspase-1 がメカニカルストレスセンサーとして働き、炎症応答に関わることを実証することと、(2) 大動脈瘤モデル動物を用いて、ASC/Caspase-1 に対する分子標的治療の効果を検証することが、挙げられた。

これらが達成できれば、大動脈瘤壁へのメ

カニカルストレスによって炎症が惹起され、さらに遷延化するために、大動脈瘤が進展するという病態仮説を実証することができると考えられた。また、その病態機序に基づく新たな大動脈瘤治療法を開発することに繋がる。さらに、本研究は、ASC/Caspase-1 がメカニカルストレスを感知して炎症シグナルに変換する分子センサーであることを、実験的に証明するものであり、新たな自然科学の発見にも繋がるかと期待された。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞実験：野生型マウスならびに ASC ノックアウトマウスにチオグリコレートを腹腔内注射し、刺激後の腹腔内マクロファージを採取し、ゼラチン処理した伸展刺激用シリコンチャンバー上で培養した。LPS 添加の前処置を 24 時間行った後に、ストレッチ社製伸展刺激装置を用いて、一軸方向の周期性伸展刺激を加えた。

刺激後の培地と細胞ライセートを回収して、サンプルとした。サンプル培地中に分泌された IL-1 β は、マウス IL-1 β ELISA Kit (Endogen) を用いて、定量解析した。細胞ライセート中の JNK 活性化は、活性化型 (リン酸化型) JNK 抗体 (Promega) を用いたウェスタンブロット法で定量的に検出した。

(2) マウス実験：マウス大動脈瘤モデルとして、塩化カルシウム刺激モデル (Yoshimura, Nature Medicine 2005) を用い、野生型マウスと ASC ノックアウトマウスにおける瘤形成の程度を比較した。

すなわち、ペントバルビタールナトリウムによる麻酔下に 7 週齢の雄マウスを開腹し、露出した腹部大動脈を 0.5M 塩化カルシウム溶液で 15 分間刺激した。その後閉腹し、生存させ、カルシウム刺激後 6 週目に、犠牲死させた。還流固定後に腹部大動脈を摘出し、大動脈最大横径 (瘤径) を計測した。

4. 研究成果

(1) 伸展刺激 (30 往復/秒、伸展率 10%、24 時間) により、野生型マウス由来の培養マクロファージでは、JNK の顕著な活性化が認められた。同時に、培地中への炎症性サイトカイン IL-1 β 分泌も、伸展刺激後に有意に増加していた。

これに対し、ASC ノックアウトマウス由来の培養マクロファージでは、野生型マクロファージで見られたような JNK 活性化ならびに IL-1 β 分泌亢進は認められなかった。

これらの結果から、マクロファージは周期性伸展刺激を ASC 依存性に感知し、それによって、炎症性シグナル分子 JNK を活性化し、炎症性サイトカイン IL-1 β の分泌を亢進して、炎症応答を惹起すると考えられた。

(2) 野生型マウスでは処置後6週目で瘤径が有意に拡大し、組織学的には炎症細胞の浸潤と弾性線維の破壊が認められた。一方、ASCノックアウトマウスでは処置後6週目の瘤径平均値が野生型マウスに比べ10%程度低値であったが、統計学的な有意差は認められなかった。

(3) 本研究における培養細胞実験から、大動脈瘤壁に浸潤してきたマクロファージがメカニカルストレス刺激に対し炎症応答をきたすことで、瘤壁の炎症をさらに増幅している可能性が示された。また、培養細胞実験では、メカニカルストレスに対するマクロファージの炎症応答はASC依存性であり、ASCが治療標的になり得ることが示唆された。しかしながら、塩化カルシウム刺激大動脈瘤モデルを用いた動物実験では、ASC抑制による瘤形成阻害効果は認められなかった。

これらの結果から、大動脈瘤壁においてメカニカルストレスを炎症応答に変換する鍵分子がASC以外に存在する可能性が想定される一方、今回使用したモデルの瘤形成がメカニカルストレスの影響を反映し難いものであった可能性も否定できない。今後、研究代表者らは、メカニカルストレスを炎症応答に変換する新たな鍵分子の探索を開始するとともに、ASCが治療標的になりうるか否かを別のマウス大動脈瘤モデルで検討する計画である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計12件)

1. 吉村耕一, 木村泰三, 青木浩樹. 大動脈瘤とテネイシン C. 呼吸と循環 59(11), 1107-1113, 2011. 査読無
2. Yoshimura K, Ikeda Y, Aoki H. Innocent Bystander? : Intraluminal Thrombus in Abdominal Aortic Aneurysm. *Atherosclerosis* 218(2): 285-286, 2011. 査読有
3. Kimura T, Yoshimura K, Aoki H, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Ikeda Y, Morikage N, Endo H, Hamano K, Imaizumi T, Hiroe M, Aonuma K, Matsuzaki M. Tenascin-C is expressed in abdominal aortic aneurysm tissue with active degradation process. *Pathol Int.* 61: 559-564, 2011. 査読有
4. 青木浩樹, 吉村耕一. 慢性炎症と大動脈瘤. 呼吸と循環 59(9), 883-889, 2011. 査読無
5. 吉村耕一, 長澤綾子, 山下 修, 濱野公

一. 大動脈瘤の分子病態. 最新医学 66(7), 1628-1633, 2011. 査読無

6. 青木浩樹, 吉村耕一. 大動脈瘤—慢性炎症のモデル疾患. 医学のあゆみ 236(4), 271-277, 2011. 査読無
7. 吉村耕一, 森景則保, 青木浩樹. 大動脈瘤/大動脈解離の薬物療法. *Vascular Lab.* 7(6): 48-52, 2010. 査読無
8. 吉村耕一. 大動脈瘤の非手術治療は可能か. *Heart View.* 14(9): 94-97, 2010. 査読無
9. 吉村耕一, 青木浩樹, 濱野公一, 松崎益徳. 1) JNK活性化と大動脈疾患. 特集「大動脈疾患—大動脈解離と胸腹部大動脈瘤: 診断と治療の進歩」*日本内科学会雑誌* 99(2): 19-26, 2010. 査読無
10. Onoda M, Yoshimura K, Aoki H, Ikeda Y, Morikage N, Furutani A, Matsuzaki M, Hamano K. Lysyl oxidase resolves inflammation by reducing monocyte chemoattractant protein-1 in abdominal aortic aneurysm. *Atherosclerosis.* 208(2): 366-369, 2010. 査読有
11. 吉村耕一, 青木浩樹, 小櫃由樹生, 重松宏, 松崎益徳. 特集「大動脈瘤の分子細胞生物学」1. 臨床と基礎の接点. *血管医学.* 10(3): 13-19, 2009. 査読無
12. 吉村耕一, 青木浩樹, 木村泰三, 松崎益徳. INTERFACE 基礎 動脈瘤の病態生理. *International Review of Thrombosis.* 4(2): 90-95, 2009. 査読無

[学会発表] (計4件)

1. Yoshimura K, Involvement of JNK2 in Mechanosensing and Proinflammatory Signaling during Development of Aortic Aneurysm. The Scientific Conference "Abdominal Aortic Aneurysm: Epidemiology, Genetics, and Pathophysiology. Oct 20-22, 2011. Danville, PA, U.S.A.
2. Yoshimura K, Molecular Pathogenesis of AAA. Invited lecture. 2nd International Meeting on Aortic Disease -New insights into an old problem-. Sep 30-Oct 2, 2010. Liege, Belgium.
3. Aoki H, Kimura T, Yoshimura K, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Aonuma K, Hiroe M, Imaizumi Y, Matsuzaki M. Tenascin C Protects Aortic Tissue From Multiple Insults Against The Development of Aortic Aneurysm. 49th American Society for Cell Biology Annual Meeting. Dec 5-9, 2009, San Diego, CA, U.S.A.
4. Yoshimura K, Aoki H, Furutani A, Matsuzaki M, Hamano K. Critical role of

JNK2 for development of abdominal aortic aneurysm in a murine model. Best Scientific Paper Award. The 6th Korea-Japan Joint Meeting for Vascular Surgery. Oct 14, 2009, Busan, Korea.

[図書] (計3件)

1. 吉村耕一, 青木浩樹. エル・アイ・シー. 第3節大動脈瘤モデル. 疾患モデルの作製と利用—循環器疾患 (北 徹ら編集). 2010. p149-160.
2. 青木浩樹, 吉村耕一. 南山堂. 大動脈瘤研究の現状と課題. 循環器疾患のサイエンス (小室一成編). 2010. p171-180.
3. Yoshimura K, Aoki H, Ikeda Y, Furutani A, Hamano K, Matsuzaki M. Springer Japan. Regression of Abdominal Aortic Aneurysms through Pharmacologic Therapy. In "Advances in Understanding Aortic Diseases" (ed. by Kazui T and Takamoto S.). 2009. p43-49.

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

青木 浩樹 (AOKI HIROKI)

久留米大学・循環器病研究所・准教授

研究者番号 : 60322244

池田 安宏 (IKEDA YASUHIRO)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号 : 00260349

(3) 連携研究者

高橋 将文 (TAKAHASHI MASAFUMI)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 40296108

谷口 俊一郎 (TANIGUCHI SHUN'ICHIRO)

信州大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号 : 60117166