

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25年5月19日現在

機関番号：15501
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22659232
 研究課題名（和文） Shaggy aorta 症候群への挑戦：病態解明と治療法開発への応用
 研究課題名（英文） Pathogenesis of shaggy aorta syndrome

 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）：Shaggy aorta 症候群は、大動脈の高度の粥状硬化に由来する微細なコレステリン結晶が末梢動脈を閉塞し、臓器障害を呈する疾患である。その病態機序の知見は乏しく、病因・病態を解明して治療法が確立することが求められている。本研究におけるヒト大動脈組織ならびに培養マクロファージを用いた検討から、Shaggy aorta 症候群におけるコレステリン結晶過剰形成の分子機序に、ASC/Caspase-1 インフラマソームが関わる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Shaggy aorta syndrome is a difficult-to-treat disease causing peripheral, renal and visceral ischemia caused by multiple cholesterol emboli from the aorta. The mechanisms underlying the development of shaggy aorta remain largely unknown. In this study, we examined the role of ASC/Caspase-1 in the development of shaggy aorta with cholesterol crystals.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	900,000	0	900,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	570,000	3,370,000

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

1. 研究開始当初の背景

（1）Shaggy aorta の名称は、大動脈の硬化性変化に伴ってコレステリン結晶に富んだ粥種が高度に形成され、毛羽立ち状に観察される事に由来する（Hollier, Ann Vasc Surg, 1991）。コレステリン結晶は、手術、血管内治療、抗凝固線溶療法等を誘因としてしばしば飛散し、腎、皮膚、消化管、心、脳等に広

範で重篤な塞栓症を来す。再発を繰返す場合には、病変大動脈切除人工血管置換術等により塞栓源または塞栓経路の外科的遮断を試みる場合があるが（秋山, 吉村ら, 日血外会誌, 2006）、その有効性は限られ、概ね予後は不良である。食生活の欧米化と人口の高齢化に加え、血管内治療機会の増加に伴い、今後 Shaggy aorta 症候群の急増は必至と予測さ

れるため、病態機序の解明とその知見に基づく画期的な治療法の開発が急務である。

(2) Shaggy aorta の病態解明と新規治療法開発には、その特徴であるコレステリン結晶過剰形成の分子機序解明が重要と考え、痛風発作において尿酸結晶が炎症を惹起する際の鍵であるインフラマソームに着目した (Martinon, Nature, 2006)。ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) は、NALP (NACHT-LRR- and pyrin domain-containing protein) 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の分子であり、Caspase-1 活性化のアダプター分子として働く。Caspase-1 活性化は、Interleukin-1 β (IL-1 β) サイトカイン分泌を介して炎症を促進するとともに (Mariathasan, Nat Rev Immunol 2007)、SREBP2 (sterol regulatory element-binding protein 2) 転写因子活性化によりコレステロールの合成と取込みの両方を増加することが知られている (Gurcel, Cell 2006)。これらの事実から、コレステリン結晶刺激を ASC/Caspase-1 インフラマソームが感知し活性化することによって、炎症促進と同時にコレステロール増加を来とし、過剰なコレステリン結晶形成に至るとする仮説を立てた。

2. 研究の目的

Shaggy aorta 症候群は、確立した治療法が無い予後不良な疾患であり、その病態機序の知見は極めて乏しい。本研究の目的は、Shaggy aorta 症候群の分子病態機序を ASC/Caspase-1 インフラマソームに着目して解明し、それに基づく新たな治療法開発に繋げることである。

3. 研究の方法

(1) ヒト大動脈組織の観察：動脈硬化性大動脈のヒトサンプルを手術時に患者の同意を得て収集した。サンプルは、蛋白解析用に凍結保存し、同時に病理学的解析ならびに免疫組織学的解析のためホルマリン固定し組織切片を作製した。

(2) 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、培養マクロファージ実験系を確立した。また、ASC ノックアウトマウス由来のマクロファージ培養のみならず、ASC 低分子干渉 RNA (siRNA) あるいは Caspase-1 阻害剤による ASC/Caspase-1 インフラマソームの抑制を行った。これらによる ASC/Caspase-1 インフラマソーム抑制培養マクロファージならびに対照マクロファージを用いて、各種刺激に対する炎症応答を解析した。

(3) モデルマウスを用いた実験：マウス腹部大動脈局所をミネラル結晶 (塩化カルシウムまたはリン酸カルシウム) で刺激し、慢性炎症を惹起するモデルを確立した。刺激後 6 週目に犠牲死させ、大動脈を摘出し解析した。マウス大動脈病変における ASC/Caspase-1 インフラマソームの役割を解明するために、野生型マウスと ASC ノックアウトマウスを比較解析した。

4. 研究成果

(1) Shaggy aorta 症候群の摘出大動脈壁サンプルでは、不整形の粥状硬化巣が集簇している部分と潰瘍様の部分とが不規則に分布していた。その病理組織では、大動脈内腔にコレステリン結晶に富んだ粥状硬化巣が不均一に進展し、コレステリン結晶の形成端に一致して顕著な炎症細胞浸潤が確認された。

(2) 周期性伸展刺激により培養マクロファージからの炎症サイトカイン IL-1 β の分泌が亢進した。この伸展刺激後の IL-1 β 分泌亢進は、ASC ノックアウトマウス由来マクロファージにおいては認められなかった。同様に ASC siRNA あるいは Caspase-1 阻害剤投与によっても、伸展刺激後の IL-1 β 分泌亢進は消失した。

(3) 塩化カルシウム結晶刺激およびリン酸カルシウム結晶刺激のいずれの場合も、処置後 6 週目に、野生型マウスの大動脈壁への著明な炎症細胞の浸潤が認められた。一方の ASC ノックアウトマウスにおいても、これらミネラル結晶刺激に対して大動脈壁への炎症細胞浸潤が観察された。現在さらなる解析を実施中である。

(4) 本研究におけるヒト組織の観察研究と培養細胞実験の結果は、大動脈組織中の微小結晶 (コレステリン等) が刺激となって ASC/Caspase-1 インフラマソームを活性化し、炎症細胞浸潤を局所で促進して、Shaggy aorta 症候群の病態に関与するという仮説に矛盾しなかった。この仮説を実証するためのマウス実験は継続中であるが、本研究期間中にわれわれの仮説を指示する結果が他の研究グループから別のモデルマウスを用いて報告されている (Duell et al, Nature. 464(7293):1357-61, 2010)。

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 15 件)

①. Nagasawa A, Yoshimura K, Suzuki R,

- Mikamo A, Yamashita O, Ikeda Y, Tsuchida M, Hamano K. Important Role of the Angiotensin II Pathway in Producing Matrix Metalloproteinase-9 in Human Thoracic Aortic Aneurysms. *Journal of Surgical Research*. 183(1): 472-7, 2013. 査読有
DOI:10.1016/j.jss.2012.12.012.
- ②. Yoshimura K, Aoki H. Recent Advances in Pharmacotherapy Development for Abdominal Aortic Aneurysm. *International Journal of Vascular Medicine*. 2012: 648167, 2012. 査読有
DOI:10.1155/2012/648167
- ③. Tazume H, Miyata K, Tian Z, Endo M, Horiguchi H, Takahashi O, Horio E, Tsukano H, Kadomatsu T, Nakashima Y, Kunitomo R, Kaneko Y, Moriyama S, Sakaguchi H, Okamoto K, Hara M, Yoshinaga T, Yoshimura K, Aoki H, Araki K, Hao H, Kawasuji M, Oike Y. Macrophage-derived Angiopoietin-like Protein 2 Accelerates the Development of Abdominal Aortic Aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 32(6): 1400-1409, 2012. 査読有
DOI:10.1161/ATVBAHA.112.247866.
- ④. Tsuruda T, Hatakeyama K, Nagamachi S, Sekita Y, Sakamoto S, Endo GJ, Nishimura M, Matsuyama M, Yoshimura K, Sato Y, Onitsuka T, Imamura T, Asada Y, Kitamura K. Inhibition of Development of Abdominal Aortic Aneurysm by Glycolysis Restriction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 32(6): 1410-1417, 2012. 査読有
DOI:10.1161/ATVBAHA.111.237065.
- ⑤. Miyazaki Y, Ikeda Y, Shiraiishi K, Nishino S, Aoyama H, Yoshimura K, Hoshijima M, Kasahara H, Aoki H, Matsuzaki M. Heart Failure-Inducible Gene Therapy Targeting Protein Phosphatase 1 Prevents Progressive Left Ventricular Remodeling. *PLoS ONE* 7(4): e35875, 2012. 査読有
DOI:10.1371/journal.pone.0035875.
- ⑥. Yoshimura, K., Ueno, M., Lee, S., Nakamura, Y., Sato, A., Yoshimura, K., Kishima, H., Yoshimine, T. and Yamashita, T. C-Jun N-terminal kinase induces axonal degeneration and limits motor recovery after spinal cord injury in mice. *Neurosci. Res*. 71(3): 266-277, 2011. 査読有
DOI: 10.1016/j.neures.2011.07.1830.
- ⑦. Yoshimura K, Ikeda Y, Aoki H. Innocent Bystander?: Intraluminal Thrombus in Abdominal Aortic Aneurysm. *Atherosclerosis*. 218(2): 285-286, 2011. 査読有
DOI:10.1016/j.atherosclerosis.2011.06.027.
- ⑧. 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
DOI:10.1111/j.1440-1827.2011.02699.x
- ⑨. 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
- ⑩. 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
- ⑪. Kaneko H, Anzai T, Morisawa M, Kohno T, Nagai T, Anzai A, Takahashi T, Shimoda M, Sasaki A, Maekawa Y, Yoshimura K, Aoki H, Tsubota K, Yoshikawa T, Okada Y, Ogawa S, Fukuda K. Resveratrol Prevents the Development of Abdominal Aortic Aneurysm through Attenuation of Inflammation, Oxidative Stress, and Neovascularization. *Atherosclerosis*. 217(2): 350-357, 2011. 査読有
DOI:10.1016/j.atherosclerosis.2011.03.042.
- ⑫. Kaneko H, Anzai T, Takahashi T, Kohno T, Shimoda M, Sasaki A, Shimizu H, Nagai T, Maekawa Y, Yoshimura K, Aoki H, Yoshikawa T, Okada Y, Yozu R, Ogawa S, Fukuda K. Role of vascular endothelial growth factor-A in development of abdominal aortic aneurysm. *Cardiovasc Res*. 91(2): 358-367, 2011. 査読有
DOI: 10.1093/cvr/cvr080.
- ⑬. 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
- ⑭. 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
- ⑮. 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
- [学会発表] (計12件)
- ①. Yoshimura K. Molecular Pathogenesis

- of Abdominal Aortic Aneurysm. Seminar in Karolinska institutet. Feb 21, 2013. Stockholm, Sweden.
- ②. Yoshimura K. Role of Signaling Pathways in Aortic Aneurysms. 3rd International Meeting on Aortic Diseases -New insights into an old problem-. Oct 4-6, 2012. Liege, Belgium.
 - ③. Nagasawa A, Yoshimura K, Yamashita O, Tsuchida M, Hamano K. Angiotensin II pathway is critical for MMP-9 production in human thoracic aortic aneurysms. 3rd International Meeting on Aortic Diseases -New insights into an old problem-. Oct 4-6, 2012. Liege, Belgium.
 - ④. 長澤綾子, 吉村耕一, 山下 修, 濱野公一. 大動脈瘤・解離における JNK2 の役割. 第 5 回大動脈瘤分子病態研究会. 2012 年 8 月 30 日, 久留米 久留米大学.
 - ⑤. Nakashima T, Umemoto S, Yoshimura K, Matsuda S, Fukai T, Matsuzaki M. Angiotensin II Upregulates Oxidative Stress through Toll-like Receptor 4 by Inhibiting ecSOD and ATP7A. 第 76 回日本循環器学会. 2012 年 3 月 16-18 日, 福岡 福岡国際会議場.
 - ⑥. 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.
 - ⑦. Nagasawa A, Yoshimura K, Aoki H, Hamano K. Statins reduce NF- κ B Activation and Chemokine Secretion in Human Abdominal Aortic Aneurysm Wall. The Scientific Conference "Abdominal Aortic Aneurysm: Epidemiology, Genetics, and Pathophysiology. Oct 20-22, 2011. Danville, PA, U. S. A.
 - ⑧. Matsuda S, Umemoto S, Yoshino H, Nakashima T, Ito S, Yoshimura K, Murata, T, Matsuzaki M. ATII may Activate MCP-1 through the Increase in TLR4-Mediated Oxidative Stress and Induce Cardiac Hypertrophy and Dysfunction. 第 75 回日本循環器学会. 2011 年 8 月 3-4 日, 横浜 パシフィコ横浜.
 - ⑨. Ohno S, Aoki H, Nishihara M, Miyamoto T, Yasukawa H, Aoyagi S, Yoshimura K, Hamano K, Shigematsu H, Imaizumi T. JAK/STAT Pathway is Highly Active and Regulates a Subset of Chemokines in Human Abdominal Aortic Aneurysm. 第 75 回日本循環器学会. 2011 年 8 月 3-4 日, 横浜 パシフィコ横浜.
 - ⑩. Nakashima T, Umemoto S, Matsuda S, Okamoto T, Murata T, Yoshimura K, Fukai T, Matsuzaki M. Toll-like receptor signal adaptor protein MyD88 is important in regulating NADPH oxidase-generated oxidative stress and vascular remodeling. 第 43 回日本動脈硬化学会. 2011 年 7 月 15-16 日, 札幌 ロイトン札幌.
 - ⑪. Aoki H, Kimura T, Yoshimura K, Imanaka K, Yoshida T, Aonuma K, Hiroe M, Imaizumi Y, Matsuzaki M. Molecular network for the homeostasis of aortic tissue. 第 18 回日本血管生物医学会. 2010 年 12 月 1-2 日, 大阪 梅田スカイビル.
 - ⑫. 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.
- [図書] (計 2 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.
- [その他]
ホームページ等
<http://ds.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~surg-1/>
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・教授
研究者番号: 60322244