

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790737

研究課題名(和文)大動脈瘤発症の新規機序の解明 - 炎症性サイトカイン・シグナル経路の関与 -

研究課題名(英文) Novel mechanism of aortic aneurysm/dissection involving regulation of inflammatory cytokines

研究代表者

孫 輔卿 (Son, Bokyung)

東京大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：20625256

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：我々はkruppel-like factor 6 (KLF6) のノックアウトマウスにおいて、塩化カルシウム刺激とアンジオテンシン 持続投与により大動脈瘤・解離が著明に進行していることに注目し、この新たな大動脈瘤・解離のモデルを用いて、慢性炎症を主な原因としての病態の機序解明を試みた。その結果、大動脈瘤・解離形成において IL-6/STAT3 経路による慢性炎症には GM-CSF が重要な役割を果たすことが明らかになった。さらに GM-CSF の発現および分泌は KLF6 により制御されて、この経路が破綻すると IL-6 を介する炎症反応が惹起され、大動脈瘤・解離形成が進行する新たな機序を見出した。

研究成果の概要(英文)： Aortic dissection is a fatal disease caused by catastrophic separation of the aortic wall. The underlying mechanisms of the condition remain unclear. Here we show that granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) is a triggering mechanism for this condition.

Perturbation of the GM-CSF response with highly increased levels of this cytokine were seen in a murine model of aortic dissection that we developed using transcription factor Kruppel-like factor 6 (KLF6)-myeloid-specific conditional deficient mice with aortic inflammation. Mechanistically, KLF6 regulated both expression and secretion of GM-CSF.

Intriguingly, administration of neutralizing antibody against GM-CSF prevented the condition in these mice. Conversely, administration of GM-CSF in combination with aortic inflammation to wild-type mice was sufficient to induce aortic dissection suggesting GM-CSF is a key regulatory molecule causative of aortic dissection.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：大動脈瘤・解離 慢性炎症 GM-CSF KLF6

1. 研究開始当初の背景

〔1〕大動脈瘤・解離は大動脈の局所的な拡張が持続進行し、遂には破裂にいたる疾患である。最近では炎症細胞の持続的浸潤から中膜のエラスチンやコラーゲン線維の破壊が生じる慢性炎症がその主な病態と考えられ注目されている。しかしながらその機序は未だに不明な点が多い。

〔2〕遺伝子異常を基にした大動脈瘤であるマルファン症候群においてはリン酸化シグナルの活性化が瘤の発症に重要な役割を果たすことが報告されたが、動脈硬化、老化を基盤とした実際の大動脈瘤・解離におけるリン酸化シグナルの役割についてはほとんど検討されてないのが現状である。

2. 研究の目的

アンジオテンシン (AngII)により誘導される大動脈瘤・解離において我々の予備検討では炎症性サイトカインの中、IL-6が上昇しその下流のリン酸化シグナルであるGp130/STAT3がマクロファージ特異的に活性化されていることが分かった。これらの結果から大動脈瘤・解離は慢性炎症により進行する病態であり、IL-6が最も重要なメディエータであることが考えられる。さらに興味深いことはAT1受容体拮抗薬(ARB)による大動脈瘤の抑制がIL-6およびGp130/STAT3の活性化の抑制することによる効果であることだった。本研究では慢性炎症にかかわるIL-6/Gp130/STAT3のシグナル経路の制御機序を明らかにすることで大動脈瘤・解離の形成を抑制する新規治療法の開発につなげることを目的とする。

3. 研究の方法

〔1〕慢性炎症による大動脈瘤・解離の動物モデルの確立 - 大動脈瘤・解離の発症における慢性炎症の分子機序を明らかにするため、炎症反応により誘導される大動脈瘤・解離のモデルを確立した。具体的にはAngII依存性であり免疫反応に重要な転写因子であるkruppel-like factor 6 (KLF6)のノックアウトマウスを用いて、塩化カルシウム刺激とアンジオテンシン 持続投与により大動脈瘤・解離を誘導した。

〔2〕IL-6受容体の中和抗体が慢性炎症および大動脈瘤発症および進行に及ぼす影響の検討 - 新たに確立した大動脈瘤・解離のモデルを用いて、IL-6およびGp130/STAT3シグナ

ル経路の重要性を検討するため、IL-6受容体の中和抗体(MR16-1、15mg/kg)を用いてIL-6の作用をブロックすることで、大動脈瘤・解離の形成および進行に差異があるかを検討した。

4. 研究成果

〔1〕KLF6ノックアウトマウスを用いた新たな大動脈瘤・解離のモデルの確立 - 我々はKLF6のノックアウトマウスにおいて、塩化カルシウム刺激とAngII持続投与により誘導される大動脈瘤・解離が野生型に比べて著明に進行していることを明らかにした。この新たな大動脈瘤・解離のモデルにおいてはマクロファージの蓄積がその形成の主な原因であり、MMP9の増加による細胞外マトリックスの分解、IL-6およびその下流であるSOCS3、iNOS、STAT3の発現増加が顕著であった。これらの結果からKLF6はIL-6を介した炎症反応を制御する上流の転写因子であり、KLF6の欠損は炎症反応を惹起し、大動脈瘤・解離を形成することが分かった。

〔2〕マクロファージを主体とする炎症反応および大動脈瘤・解離 - マクロファージが大動脈瘤・解離に重要であることを確かめるために、clodronate-liposomeを用いてマクロファージを除去した条件下で大動脈瘤・解離の形成をコントロール群(PBS-liposome)と比べた結果、瘤・解離の形成が抑えられたことからマクロファージを主体とする炎症反応が大動脈瘤・解離の形成に重要であることを示唆した。さらにマクロファージ特異的なKLF6ノックアウトマウス(KLF6^{fl/fl};LysM Cre)において、全身のKLF6ノックアウトマウスと同様に大動脈瘤・解離の形成が対象群(KLF6^{fl/fl})に比べて顕著であることからマクロファージにおけるKLF6の重要性を確かめた(図1)。

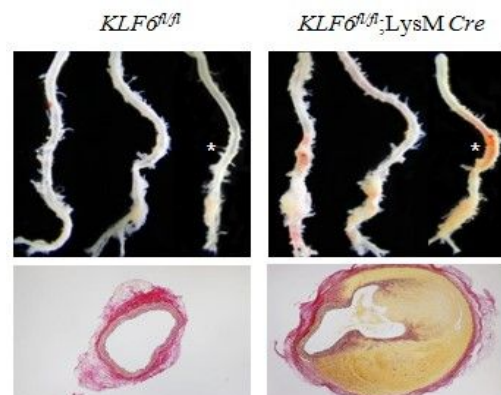


図1 炎症による大動脈瘤・解離形成

〔3〕マクロファージの GM-CSF の発現および分泌の上昇 - マクロファージにおいて KLF6 による炎症反応の制御機序を明らかにするために、IL-6/STAT3 シグナル経路にかかわる 84 個の遺伝子の発現を網羅的に調べた。その結果、granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) の炎症性サイトカインが大動脈瘤・解離を誘導したマウスの骨髄由来のマクロファージで最も発現の差が顕著であった。さらに培養液中の GM-CSF 分泌や大動脈瘤・解離のマウスの血中 GM-CSF の濃度も著明に上昇していることからマクロファージの GM-CSF の発現及び分泌の上昇が IL-6/STAT3 シグナル経路を活性化させ、炎症反応を惹起する作用があることが明らかになった。さらに KLF6 は直接 GM-CSF のプロモーター領域に結合し、転写因子として発現を抑制する transcriptional repressor として作用していることも分かった。

〔4〕GM-CSF 中和抗体および IL-6 中和抗体の投与による大動脈解離・解離の抑制 - マクロファージ特異的な KLF6 ノックアウトマウスにおいて塩化カルシウム刺激と AngII 持続投与により誘導される大動脈瘤・解離の形成が GM-CSF の中和抗体の投与により抑制できることから大動脈瘤・解離形成に GM-CSF が重要であることは明確になった。さらに GM-CSF 中和抗体の投与により血中 IL-6 の濃度や大動脈の IL-6 および STAT3 の発現が抑制されることから GM-CSF により IL-6/STAT3 の経路が制御されていることも確認した(図 2)。また、IL-6 受容体の中和抗体である MR16-1 の投与により大動脈瘤・解離の形成が抑制されることで IL-6 経路の重要性も新たな動物モデルで確かめた。

〔5〕recombinant GM-CSF の投与による大動脈瘤・解離の形成 - 野性型マウスにおいても塩化カルシウム刺激と AngII 持続投与とともに recombinant GM-CSF を投与すると大動脈瘤・解離が形成され、結果的に大動脈破裂による死亡率が高くなることが分かった。この結果から GM-CSF が大動脈瘤・解離において必須であることが証明された。しかし GM-CSF が大動脈瘤・解離の形成に十分であるかについては、GM-CSF 単独の投与では大動脈瘤・解離の形成は認められなかったことから GM-CSF の上昇が必須ではあるけど、十分ではないことが分かった。

〔6〕急性大動脈解離患者の血中 GM-CSF の上昇 - 急性大動脈解離の患者さんの血中 GM-CSF を調べた結果、冠動脈疾患や健康者に比べ高い数値であることが分かった。さらに、解離が認められた大動脈病変において GM-CSF の発現が局所で上昇していることも明らかになった。これらの結果から動物モデルで検証したメカニズムが実際臨床の場でも応用できる結果であることが確認できた。

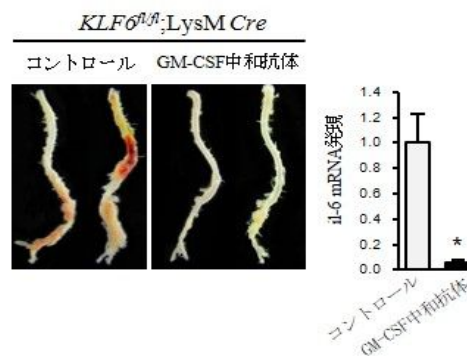


図2. GM-CSF 中和抗体による IL-6 および大動脈瘤・解離の抑制

まとめると大動脈瘤・解離形成において IL-6/STAT3 経路による慢性炎症には GM-CSF が重要な役割を果たす。さらに GM-CSF の発現および分泌は KLF6 により制御されて、この経路が破綻することでマクロファージを主体とする IL-6 を介する炎症反応が惹起され、大動脈瘤・解離形成につながる新たな機序が明らかになった (Son BK, et al., Granulocyte macrophage colony-stimulating factor is required for aortic dissection, *Circulation* 投稿中)。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

- 第 78 回 日本循環器学会総会 2014.3.21-23、東京
- (1) Son BK, Suzuki T, Sawaki D, Aizawa K, Zhan H, Ishida J, Matsumura T, Friedman S.L., Nagai R, Komuro I: Novel mechanism of aortic dissection involving regulation of dendritic cells and macrophage by granulocyte/macrophage colony stimulating factor

- (2) Zhan H, Suzuki T, Aizawa K, Sawaki D, Ishida J, **Son BK**, Manabe I, Miyagawa K, Nagai R, Komuro I: Doxorubicin-induced Cardiotoxicity is Regulated by Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) in Cardiac Fibroblasts
2. 第 77 回 日本循環器学会総会 2013.3.15-17、横浜
- (1) **Son BK**, Suzuki T, Sawaki D, Aizawa K, Zhan H, Ishida J, Matsumura T, Komuro I, Nagai R:KLF6 modulates aortic aneurysm formation by regulating both of inflammatory and TGFbeta signaling pathways
- (2) Zhan H, Suzuki T, Aizawa K, Sawaki D, Ishida J, **Son BK**, Miyagawa K, Komuro I, Nagai R: Doxorubicin-induced Cardio-toxicity is Mediated by Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) in Cardiac Fibroblasts
3. American Heart Association (AHA) 2012.11.4-6, Los Angelis, California
Son BK, Suzuki T, Sawaki D, Aizawa K, Zhan H, Ishida J, Matsumura T, Nagai R: KLF6 modulates aortic aneurysm formation by balancing between inflammatory and TGFβ signaling pathways.

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
 出願状況(計 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織
 (1)研究代表者
 孫 輔卿 (Son, Bokyung)
 東京大学・医学部附属病院・特任研究員
 研究者番号：20625256

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：