

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462165

研究課題名(和文)大動脈疾患における弾性線維形成異常の臨床的解析

研究課題名(英文)Clinical analysis of the elastic desmoplasia abnormality in the aortic disease

研究代表者

鈴木 伸一 (SUZUKI, Shinichi)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：90285130

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではプロスタグランジンE受容体EP4シグナルを抑制することで大動脈瘤の進行を抑制する初めての薬物治療の開発を目的とした。手術による大動脈瘤手術の組織を用いて、EP4シグナル発現と弾性線維の劣化が、大動脈瘤部分でより強く発生しているのを確認した。大動脈瘤壁細胞をPGE₂、EP4アンタゴニストなどで刺激した実験結果からPGE₂-EP4シグナルの動脈瘤化への関与が示唆された。また大動脈瘤患者の血漿中で分泌がみられたタンパクが、ステントグラフト治療で大動脈瘤の縮小があった症例で有意に減少した。大動脈疾患のバイオマーカーの候補となりうると考え、特許申請中である。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the study is to produce the first drug which is able to inhibit aneurysmal formation. In human tissue samples obtained from AAA(abdominal aortic aneurysm) surgery, we found that EP4 expression and elastic fiber degradation were both enhanced in the aneurysmal area relative to that in the normal area. When human AAA smooth muscle cells (hAAASMCs) were stimulated by PGE₂, antagonist EP4, or PGE₂+antagonist EP4, IL-6, MMP or other protease were detected from hAAASMCs, which suggested signal of PGE₂-EP4 might play a role to aneurysmal formation. Value of a protein which has been found in blood was decreased after endovascular therapy and reduced size of AAA in AAA patients. The protein might be one of biomarker of aortic aneurysm. We already applied for a patent of the biomarker.

研究分野：医歯薬学

キーワード：オーダーメイド医療

1. 研究開始当初の背景

申請する研究のテーマは、大動脈が瘤化する病態、また大動脈壁が解離する病態に対する、大動脈壁に存在する弾性線維形成異常のメカニズムを解析し、その発生に対する予防法・治療法の開発を目指すものとした。

近年の高齢化に伴い動脈硬化性疾患が増加し、心臓血管外科領域の大動脈関連の手術数は年々増加している。大動脈は瘤化しても基本的には無症状で発見は困難であるが、破裂により生命を脅かす緊急事態になって初めて明らかになることが多く、また急性大動脈解離の発生は生命を脅かす病態であり、実際多くの命を奪っている。このため動脈瘤および大動脈解離のメカニズムを解析し、発症前の予測・予防およびこの治療は、社会的な急務である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、1) 大動脈瘤化および大動脈解離を発生した大動脈壁における弾性線維の形成状態の確認。2) 弾性線維形成に関わるEP4、リシルオキシダゼの蛋白発現の検討。3) これらより大動脈瘤化や大動脈解離のメカニズムの解析と、発症前に発症リスクを予測するシステムを確立することである。4) さらに発症リスクに基づいた予防的・治療的な対策の確立(オーダーメイド医療)を目指したいと考えている。

大動脈が瘤化する病態、また大動脈壁が解離する病態に対する、大動脈壁に存在する弾性線維形成異常のメカニズムを解析し、その発生に対する予防法・治療法の開発を目指す。

大動脈疾患は年々増加の一途をたどっており、この疾患に早期発見と予防的治療方法が確立されることで、医学的に大きな波及効果が期待される。

3. 研究の方法

本研究では手術治療により摘出された大動脈壁をサンプルとし、EP4シグナルが弾性線維形成の制御に及ぼす役割について報告(Plos One; May2012, vol 7, e36724)した。今後は更に大動脈組織からの分泌蛋白を質的分析で網羅的に解析し、後天性血管病変の分子機構を解明し、新しい治療を開発することを目的とする。

また患者血液サンプルを用いて疾患特異的な蛋白を検証し、疾患のバイオマーカーを検索する。

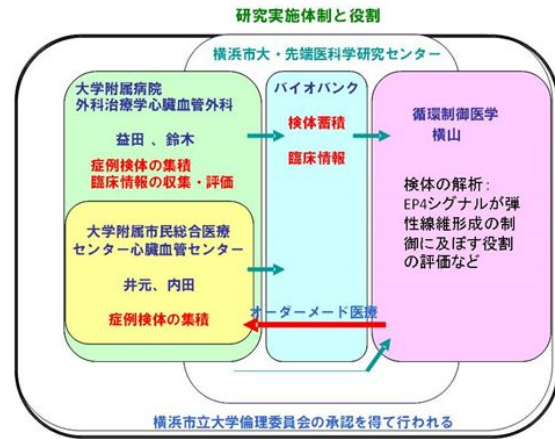
平成25年度から27年度を通じて

(1) 症例集積を横浜市立大学附属病院および横浜市立大学附属市民総合医療センター心臓血管センターで継続した。

(2) 研究体制としては上記で集積された全ての症例の臨床情報を外科治療学教室(益田、鈴木)が評価し、それぞれの臨床情報を管理し、集積された検体は循環制御科教室(横山)において検討した。

また平成26年度および平成27年度には、予防を含めた管理・治療方針決定システム確立をめざし(オーダーメイド医療)大動脈の瘤化、大動脈解離のメカニズムとリスク因子などの情報から、瘤化と解離のリスクを予測し発症前予防や治療への展開を探索した。

下図に研究全体の体制とそれぞれの役割および研究の年次推移について示す。

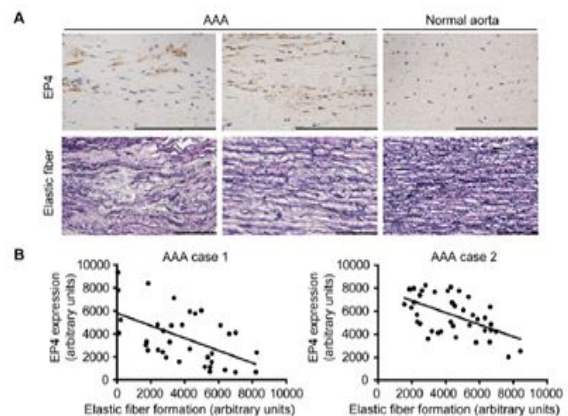


4. 研究成果

大動脈瘤は近年増加しており生命にかかわる疾患である。プロスタグランジンE2 (PGE2)はMMP(matrix metalloproteinase)の発現を活性化し炎症性cytokinaseを分泌させ、大動脈瘤化に関与している可能性がある。したがってPGE2を選択的に阻害することにより、EP4レセプターシグナルや大動脈瘤化を抑制できると仮説をたて、これを検証した。

外科手術で採取した人の大動脈壁を使用してEP4の発現を調べると、大動脈瘤壁では正常径の大動脈壁よりも高値を示しておりEP4発現は、大動脈壁の弾性線維劣化にかかわっていた。(図1、図2参照)

(図1)



(図2)

Table 1. Correlation between elastic fiber formation and EP4 expression in AAA tissues.

| | age | gender | r | number of sampling point | P value |
|---|-----|--------|---------|--------------------------|------------|
| 1 | 76 | M | -0.5386 | 35 | 0.0008*** |
| 2 | 63 | M | -0.5645 | 41 | 0.0001*** |
| 3 | 76 | M | -0.8000 | 25 | <0.0001*** |
| 4 | 80 | M | -0.4607 | 29 | 0.011* |
| 5 | 70 | M | -0.5454 | 39 | 0.0003*** |
| 6 | 76 | M | -0.7571 | 60 | <0.0001*** |
| 7 | 70 | M | -0.4333 | 30 | 0.0168* |
| 8 | 89 | F | -0.5200 | 44 | 0.0003*** |

r: correlation coefficient; n: number of sampling points.
*: $P < 0.05$;
***: $P < 0.001$;
****: $P < 0.0001$.
doi:10.1371/journal.pone.0036724.t001

また、マウスの腹部大動脈に CaCl₂ を添付することにより弾性線維の劣化による大動脈瘤化を誘発できたが、EP4^{+/-} マウスでは、この変化は著明に抑制された。(図3 参照)

(図3)

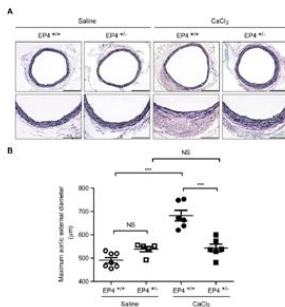


Figure 3. CaCl₂-induced AAA formation is attenuated in EP4^{+/-} mice. A: Representative images of elastic van Gieson-stained tissue of EP4^{+/+} and EP4^{-/-} mice treated with saline or CaCl₂. Lower panels (Scale bar: 100 μm) show higher magnification portions of upper panel images. Scale bar: 200 μm. B: Maximum aortic internal diameter of AAA formation induced by CaCl₂ in EP4^{+/+} and EP4^{+/-} mice treated with saline or CaCl₂ (n = 5-7). ***, P < 0.001; NS, not significant. doi:10.1371/journal.pone.0090244.g003

また、EP4^{+/-} マウスに ApoE^{-/-} を AngII の持続点滴のもとにリンクさせたマウスを作製し、この EP4^{+/-} / ApoE^{-/-} マウスにおいて、この弾性線維の構造破壊と大動脈瘤化は著明に抑制されていることを発見した。しかしながら、AngII の投与がなければ、EP4^{+/+} / ApoE^{-/-} と EP4^{+/-} / ApoE^{-/-} のマウスの間に、著明な差は認めなかった。これらの実験結果から、EP4 の欠損は、大動脈瘤化を抑制することを証明した。(図4 参照)

(図4)

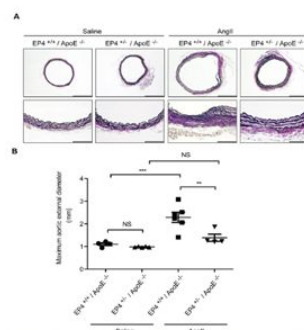


Figure 4. AngII-induced AAA formation is attenuated in EP4^{+/-} ApoE^{-/-} mice. A: Representative images of elastic van Gieson-stained tissue of EP4^{+/+} ApoE^{-/-} and EP4^{+/-} ApoE^{-/-} mice treated with saline or AngII. Lower panels (Scale bar: 100 μm) show higher magnification portions of upper panel images. Scale bar: 200 μm. B: Maximum aortic internal diameter of AAA formation induced by AngII in EP4^{+/+} ApoE^{-/-} and EP4^{+/-} ApoE^{-/-} mice treated with saline or AngII (n = 6-8). ***, P < 0.001; NS, not significant. doi:10.1371/journal.pone.0090244.g004

このように、プロスタグランジン E-EP4 シグナルが大動脈疾患増悪に強く関与している可能性が示された。

またさらに、大動脈瘤患者の血液を用いた検討をすすめてきた。血漿中で分泌がみられた一つのタンパクが、大動脈瘤に対するステントグラフト内挿術留置により大動脈瘤の縮小があった症例では、このタンパク濃度が有意に減少していることが示された。このタンパクは、大動脈疾患の活動性を判定するバイオマーカーの候補となりうると考えられ、現在、特許申請中である。大動脈疾患のバイオマ - カ - は、基本的に無症状である大動脈瘤を発見する手がかりとなり、予防医学の点で多大な貢献をすることが期待される。

今回の研究により、上記のごとく多くの新しい医学情報が得られ、さらに研究は継続中である。

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 1 件)

Okumura S, Fujita T, Cai W, Jin M, Namekata I, Mototani Y, Jin H, Ohnuki Y, Tsuneoka Y, Kurotani R, Suita K, Kawakami Y, Hamaguchi S, Abe T, Kiyonari H, Tsunematsu T, Bai Y, Suzuki S, Hidaka Y, Umemura M, Ichikawa Y, Yokoyama U, Sato M, Ishikawa F, Izumi-Nakaseko H, Adachi-Akahane S, Tanaka H, Ishikawa Y. Epac1-dependent phospholamban phosphorylation mediates the cardiac response to stresses. *Journal of Clinical Investigation*. 124(6):2785-801. doi: 10.1172/JCI64784, 2014. 査読有り

(学会発表)(計 2 件)

Yokoyama U, Ishiwata R, Ichikawa Y, Yasuda S, Goda M, Suzuki S, Masuda M, Ishikawa Y. Inhibition of PGE2-EP4 Signaling as a Potential Future Therapeutic Strategy for Abdominal Aortic Aneurysm. The 80th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. (2016.3.18-20, 仙台国際センター (宮城県仙台市)) (symposiast)

Yokoyama U, Ishiwata R, Arakawa N, Suzuki S, Masuda M, Ishikawa Y. Therapeutic Effect of EP4 Antagonist on Advanced Abdominal Aortic Aneurysm. The 86th Scientific Session, American Heart Association (AHA) (2013.11.16-20, Dallas, USA)

(産業財産権)

出願状況(計 1 件)

名称: 動脈硬化を検出するための血中バイオマーカー

発明者：横山詩子、石川義弘、荒川憲昭、益田宗孝、石上友章、鈴木伸一、大竹則久
権利者：公立大学法人横浜市立大学
種類：特許権
番号：特許願 2016-26494
出願年月日：2016年2月16日
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 伸一 (SUZUKI, Shinichi)
横浜市立大学・医学部・准教授
研究者番号：90285130

(2) 研究分担者

益田宗孝 (MASUDA, Munetaka)
横浜市立大学・医学系研究科・教授
研究者番号：10190365

井元 清隆 (IMOTO, Kiyotaka)
横浜市立大学・市民総合医療センター・教授
研究者番号：40203335

内田 敬二 (UCHIDA, Keiji)
横浜市立大学・市民総合医療センター・准教授
研究者番号：50275062

横山 詩子 (YOKOYAMA, Utako)
横浜市立大学・医学部・講師
研究者番号：70404994