

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：37104

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670621

研究課題名(和文)大動脈解離病態解明への挑戦：ストレス防御の分子機構とその破綻

研究課題名(英文)Deciphering molecular pathogenesis of aortic dissection: the role of stress sensor molecules

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：大動脈解離は、強い痛みとともに大動脈中膜が突然断裂する致死的疾患である。突然死がしばしば経験され、救命し得ても慢性期に大動脈脆弱性による様々な合併症を起こす。遺伝性疾患を除いて原因不明であり分子病態は殆ど解明されておらず、安静・降圧の他に内科的治療法は存在しない。今回の研究から、細胞ストレスセンサーであるMRTF-Aが内皮障害、壁内血腫、解離発症を促進しており、MRTF-A阻害薬で解離発症を阻止できることが示された。

研究成果の概要(英文)：Aortic dissection is a medical emergency, in which patients frequently suffer from a sudden death. Currently, no specific non-surgical therapy is available for aortic dissection, because the etiology and pathogenesis is largely unknown. In this study we demonstrated that MRTF-A, an intracellular stress sensor, translates the mechanical and humoral stress to the tissue destructive response that eventually causes aortic dissection. MRTF-A inhibitor effectively prevented the development of aortic dissection, showing that MRTF-A is a promising therapeutic target.

研究分野：分子循環器学

キーワード：大動脈解離 ストレス応答 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

【臨床的背景】大動脈解離は、強い痛みとともに大動脈中膜が突然断裂する致死の疾患である。本邦における年間約1万例の発症者のうち半数が緊急手術対象となり、なお増加傾向にある。突然死がしばしば経験され、救命し得ても慢性期に大動脈脆弱性による様々な合併症を起こす。遺伝性疾患を除いて原因不明であり分子病態は殆ど解明されておらず、安静・降圧の他に内科的治療法は存在しない。

【学術的背景】解離の原因として Marfan 症候群等の遺伝性疾患があり、基礎的研究から機械的ストレス、炎症性リモデリングの重要性が示されている(J Clin Invest 2009, Circulation 2012)。しかし、解離の原因遺伝子群、機械的ストレス、炎症性リモデリングの相互の関連は明らかにされていない。

【申請者らの知見】代表者の青木は、アンジオテンシン II (AngII) 負荷により、細胞外多機能タンパクのテネイシン C (TNC) が大動脈平滑筋で発現する一方、TNC ノックアウトでは AngII 負荷で解離を起こすことを発見した。TNC は、アクチン線維への機械的ストレスで活性化する転写制御因子 MRTF-A により発現し(Nat Rev Mol Cell Biol 2010)、細胞外マトリックス (ECM) 強化を促進する。申請者らは、ストレスセンサー分子が大動脈解離の病態で重要な役割を果たす可能性に気づき本研究を着想した。

2. 研究の目的

本研究では、大動脈解離におけるストレスセンサー分子の役割に着目した病態解明を目的とした。

3. 研究の方法

マウス大動脈解離モデル: AngII 持続投与 (1 µg/kg/min) により解離感受性を検討した。必要に応じてコラーゲン/エラスチン重合阻害薬 β アミノプロピオニトリル (150 mg/kg/day) 投与で解離感受性を高めた。

ヒト大動脈組織: 人工血管置換術を受ける解離患者および解離の無い大動脈(冠動脈バイパス術等)の組織を、本人の書面による承諾を得て採取し組織学的解析を行なった。

血管平滑筋細胞培養: 野生型または HIC-5 ノックアウト大動脈平滑筋細胞をシリコン膜上で培養し、細胞伸展装置で機械的ストレス応答を解析した。

介入: MRTF-A 阻害薬 CCG-1423 投与、または HIC-5 ノックアウトにより、それぞれの機能を検討した。

形態学的解析: 大動脈径、病変長等、形態学的に解離を計測した。

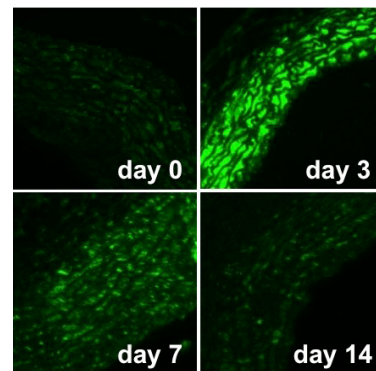
発現解析: DNA マイクロアレイにより MRTF-A と HIC-5 で制御される遺伝子群を解析した。リアルタイム RT-PCR で重要遺伝子発現を定量解析した。MRTF-A、HIC-5、炎症系シグナル分子 (MAP キナーゼ、NFκB、JAK/STAT 系) の発現をウェスタンブロットで、局在を免疫染色とイメージングサイトメーター (ArrayScan XTI) で定量解

析した。

4. 研究成果

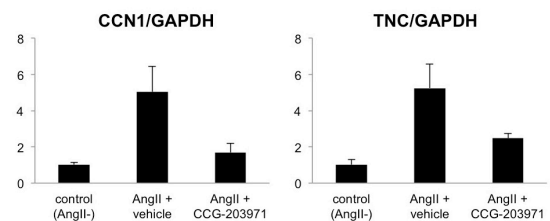
培養血管平滑筋細胞において、野生型と HIC-5 ノックアウトの比較、および野生型における溶媒と MRTF-A 阻害薬投与の比較を行った。介入の効果をトランスクリプトーム解析により検討し、HIC-5 および MRTF-A で制御される遺伝子群を同定した。

マウス解離モデルにおいて AngII 投与後 1 日目から 3 日目にかけて大動脈中膜において MRTF-A の発現量の亢進と平滑筋細胞の核内への集積を認めた。MRTF-A の発現および核内集積に続き 3 日目から 7 日目にかけて、既知の MRTF-A 標的遺伝子である TNC と CCN1 の発現亢進を認めた。MRTF-A の発現亢進および平滑筋細胞核内への集積は 2 週間にはほぼ認められなくなった。



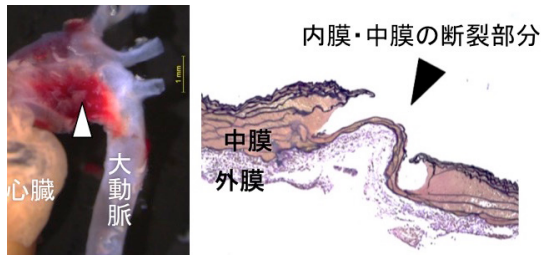
大動脈壁の MRTF-A 発現

刺激前から MRTF-A 阻害薬をマウスに投与したところ、TNC と CCN1 の発現が抑制された。MRTF-A 阻害薬として、従来からある CCG-1423 と新規に開発された CCG-203971 を比較したところ、TNC および CCN1 への抑制効果は CCG-203971 の方が顕著であった。このことから、解離刺激により MRTF-A 活性が亢進すること、および CCG-203971 により MRTF-A が効果的に抑制されることが明らかになった。



MRTF-A 標的遺伝子の発現

マウス解離刺激として AngII を投与した後の組織変化を経時的に観察した。AngII 投与後、3 日目から近位大動脈 (上行、弓部、下行大動脈) に壁内血腫を認め、7 日目にはほぼ全例に壁内血腫の拡大および解離の発症を認めた。



アンジオテンシン II による解離

組織固定前にマウス全身血管をエバンスブルー溶液で灌流することで内皮障害部位を同定した。AngII 投与後 3 日目から近位大動脈に亀裂状の内皮障害を認めた。血腫の多くは内皮障害部位と一致したが、一部、内皮障害が同定されない壁内血腫を認めた。壁内血腫の発症様式は解離病態の重要な一部と考えられ、今後の検討課題とする。



エバンスブルーによる内皮障害検出

MRTF-A 阻害薬 (CCG-203971) 投与に引き続き AngII を持続投与し、解離の発症経過を観察した。解離発症率は、溶媒投与マウスでは 8 匹中 7 匹 (87.5%)、CCG-203971 投与マウスでは 9 匹中 1 匹 (11.1%) に解離の発症を認めた ($P < 0.01$, Fisher's exact test)、CCG-203971 による有意な解離抑制効果が示された。MRTF-A ノックアウトマウス (京都大学 桑原宏一郎博士からの供与) に解離モデルを作成したところ、MRTF-A 阻害薬と同様に解離発症の抑制効果を認めた。

Vehicle



CCG-203971



MRTF-A 阻害薬による解離発症阻止

今回の研究から、MRTF-A がストレスに応じて活性化し、内皮障害、壁内血腫、解離発症を促進していることが示された。今後はストレスセンサー分子の下流で制御される遺伝子群について解

析を進め、解離病態の全貌を明らかにして行く。

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 7 件)

- 1) Yoshimura, K., Nagasawa, A., Kudo, J., Onoda, M., Morikage, N., Furutani, A., Aoki, H., Hamano, K.: Inhibitory effect of statins on inflammation-related pathways in human abdominal aortic aneurysm tissue. *International Journal of Molecular Sciences*, **16**: 11213-11228, 2015. 査読有
- 2) Usui, F., Shirasuna, K., Kimura, H., Tatsumi, K., Kawashima, A., Karasawa, T., Yoshimura, K., Aoki, H., Tsutsui, H., Noda, T., Sagara, J., Taniguchi, S., Takahashi, M.: Inflammasome Activation by Mitochondrial Oxidative Stress in Macrophages Leads to the Development of Angiotensin II-Induced Aortic Aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **35**: 127-136, 2015. 査読有
- 3) Son, B.K., Sawaki, D., Tomida, S., Fujita, D., Aizawa, K., Aoki, H., Akishita, M., Manabe, I., Komuro, I., Friedman, S.L., Nagai, R., Suzuki, T.: Granulocyte macrophage colony-stimulating factor is required for aortic dissection/intramural haematoma. *Nature Communications*, **6**: 6994, 2015. 査読有
- 4) Ishihara, T., Ban-Ishihara, R., Maeda, M., Matsunaga, Y., Ichimura, A., Kyogoku, S., Aoki, H., Katada, S., Nakada, K., Nomura, M., Mizushima, N., Mihara, K., Ishihara, N.: Dynamics of Mitochondrial DNA Nucleoids Regulated by Mitochondrial Fission Is Essential for Maintenance of Homogeneously Active Mitochondria during Neonatal Heart Development. *Molecular and Cellular Biology*, **35**: 211-223, 2015. 査読有
- 5) Yokoyama, U., Minamisawa, S., Shioda, A., Ishiwata, R., Jin, M.H., Masuda, M., Asou, T., Sugimoto, Y., Aoki, H., Nakamura, T., Ishikawa, Y.: Prostaglandin E2 Inhibits Elastogenesis in the Ductus Arteriosus via EP4 Signaling. *Circulation*, **129**: 487-496, 2014. 査読有
- 6) Kimura, T., Shiraishi, K., Furusho, A., Ito, S., Hirakata, S., Nishida, N., Yoshimura, K., Imanaka-Yoshida, K., Yoshida, T., Ikeda, Y., Miyamoto, T., Ueno, T., Hamano, K., Hiroe, M., Aonuma, K., Matsuzaki, M., Imaizumi, T., Aoki, H.: Tenascin C protects aorta from acute dissection in mice. *Scientific Reports*, **4**: 4051, 2014. 査読有
- 7) Kajimoto, H., Kai, H., Aoki, H., Uchiwa, H., Aoki, Y., Yasuoka, S., Anegawa, T., Mishina, Y., Suzuki, A., Fukumoto, Y., Imaizumi, T.: BMP type I receptor inhibition attenuates endothelial dysfunction in mice with chronic kidney disease. *Kidney International*, **87**: 128-136, 2014. 査読有

[学会発表] (計 26 件)

重複情報を避けるため学会名、開催場所、開催年月日を最初に示し、当該学会での発表を列記する。

American Heart Association 2015 Scientific Sessions, Orlando, FL, USA, November 12-16, 2015

1. Saki Hirakata, Hiroki Aoki, Michihide Nishihara, Satoko Ohno, Aya Furusho, Norifumi Nishida, Sohei Ito, Makiko Hayashi, Yoshihiro Fukumoto : Stat3 in vascular smooth muscle cells protects aorta from dissection by reinforcing aortic wall.
2. Satoko Ohno, Hiroki Aoki, Michihide Nishihara, Aya Furusho, Saki Hirakata, Norifumi Nishida, Sohei Ito, Makiko Hayashi, Yoshihiro Fukumoto : The Role of Macrophage STAT3 Signaling in Pathogenesis of Aortic Dissection.
3. Norifumi Nishida, Hiroki Aoki, Satoko Ohno, Michihide Nishihara, Aya Furusho, Saki Hirakata, Makiko Hayashi, Sohei Ito, Hideo Yasukawa, Yoshihiro Fukumoto : Excessive NaCl Intake aggravates Aortic Dissection through IL-17 Pathway

European Society for Cardiology Congress 2015, London, UK, August 29 - September 2, 2015

4. N. Nishida, H. Aoki, S. Ohno, M. Nishihara, A. Furusho, S. Hirakata, M. Hayashi, S. Ito, H. Yasukawa, Y. Fukumoto : Excessive sodium intake worsens aortic dissection via IL-17 pathway. (*Young investigator Award, the Working Group Vascular Biology and Atherosclerosis*)
5. S. Ohno, H. Aoki, M. Nishihara, A. Furusho, S. Hirakata, N. Nishida, S. Ito, M. Hayashi, H. Tanaka, Y. Fukumoto : The role of macrophage STAT3 signaling in pathogenesis of aortic dissection.
6. S. Hirakata, H. Aoki, M. Nishihara, S. Ohno, A. Furusho, N. Nishida, S. Ito, M. Hayashi, H. Tanaka, Y. Fukumoto : STAT3 in vascular smooth muscle cells protects aorta from dissection.

7th HOPE Meeting with Nobel Laureates, The Prince Park Tower Tokyo (Tokyo, Japan), February 28 - March 5, 2015

7. Sohei Ito : Elucidating the molecular pathogenesis of aortic dissection : MRTF-A protects aorta from dissection
- 第44回日本心臓血管作動物質学会(2015年2月6日~7日:高松センタービル(高松))
8. 西田憲史、青木浩樹、大野聡子、西原通秀、古荘文、平方佐季、林真貴子、伊東壮平、安川秀雄、福本義弘 : 塩分過剰摂取はIL-17経路を介して大動脈解離を増悪させる

第79回日本循環器学会(2015年4月24日~26日:大阪国際会議場(大阪))

9. Aya Furusho, Hiroki Aoki, Michihide Nishihara, Satoko Ohno, Saki Hirakata, Norifumi Nishida, Sohei Ito, Makiko Hayashi, Yoshihiro Fukumoto : B cells and Immunoglobulin Promote the Development of Abdominal Aortic Aneurysm
10. Norifumi Nishida, Hiroki Aoki, Satoko Ohno, Michihide Nishihara, Aya Furusho, Saki Hirakata, Makiko Hayashi, Sohei Ito,

Hideo Yasukawa, Yoshihiro Fukumoto : Excessive Sodium Intake Exacerbates Aortic Dissection through IL-17 Pathway

11. Saki Hirakata, Hiroki Aoki, Michihide Nishihara, Satoko Ohno, Aya Furusho, Norifumi Nishida, Sohei Ito, Makiko Hayashi, Yoshihiro Fukumoto : Protective Role of STAT3 in Vascular Smooth Muscle Cells During the Development of Aortic Dissection
12. Satoko Ohno, Hiroki Aoki, Michihide Nishihara, Aya Furusho, Saki Hirakata, Norifumi Nishida, Sohei Ito, Makiko Hayashi, Yoshihiro Fukumoto : Molecular Pathogenesis of Aortic Dissection: Macrophage-mediated Changes in Smooth Muscle-specific Gene Expression

第15回日本抗加齢医学会総会(2015年5月29日~30日:福岡国際会議場(福岡))

13. シンポジウム「炎症を標的とした疾患発症メカニズムの解明」青木浩樹 : 大動脈解離における炎症応答

第47回日本動脈硬化学会総会・学術集会(2015年7月9日~10日:仙台国際センター(仙台))

14. Invited English Session「Homeostatic inflammation in atherosclerosis」Hiroki Aoki : Two faces of Janus (or STAT) in aortic dissection

ESC Congress 2014, Barcelona, Spain, Aug 30 - September 3, 2014

15. A Furusho, H. Aoki, M. Nishihara, S. Ohno, S. Hirakata, N. Nishida, S. Ito, Y. Fukumoto ; The role of B cells in pathogenesis of abdominal aortic aneurysm.
16. S. Ohno, H. Aoki, M. Nishihara, A. Furusho, S. Hirakata, N. Nishida, S. Ito, H. Yasukawa, Y. Fukumoto ; Molecular determinant of the development of acute aortic dissection.

American Heart Association Scientific Sessions 2014, Chicago, IL, USA, November 15 - 19, 2014

17. S. Hirakata, H. Aoki, M. Nishihara, S. Ohno, A. Furusho, N. Nishida, S. Ito, Y. Fukumoto ; Protective Role of Stat3 in Vascular Smooth Muscle Cells During the Development of Acute Aortic Dissection.
18. S. Ohno, H. Aoki, M. Nishihara, A. Furusho, S. Hirakata, N. Nishida, S. Ito, H. Yasukawa, Y. Fukumoto ; A Common Gene Network Governs The Cellular Phenotypes in Aortic Dissection.

The 18th International Vascular Biology Meeting, Miyakomess (Kyoto), Japan, April 14-17, 2014

19. S. Ohno, H. Aoki, M. Nishihara, A. Furusho, S. Hirakata, N. Nishida, S. Ito, H. Yasukawa, Y. Fukumoto ; Involvement of Macrophage Cytokine Signaling in Acute Aortic Dissection.
20. A Furusho, H. Aoki, M. Nishihara, S. Ohno, S. Hirakata, N. Nishida, S. Ito, Y. Fukumoto ; Involvement of B cells in Pathogenesis of Abdominal Aortic Aneurysm.

21. Aoki H, Kimura T, Yoshimura K, Shiraishi K, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Ikeda Y, Miyamoto T, Ueno T, Fukumoto Y ; Tenascin C protects aorta from acute dissection in mice
 22. Batmunkh B, Kokubo H, Kamata R, Fujii M, Aoki H, Ishida M, Ishita T, Yoshizumi M ; Induction of Timp1 in Smooth Muscle Cells during Development of Abdominal Aortic Aneurysms.
- 第 31 回国際心臓研究学会 (ISHR) 日本部会 (2014 年 11 月 28~29 日:ウインクあいち(名古屋))
23. Symposium 3 : Translational Research in Vascular Medicine
H Aoki : Molecular pathogenesis of aortic dissection:The failure of protective mechanism of aortic walls.
 24. A Furusho, H Aoki, M Nishihara, S Ohno, S Hirakata, N Nishida, S Itou, Y Fukumoto ;B cells Promote the Development of Abdominal Aortic Aneurysm through a proinflammatory response.
 25. S Ohno, H Aoki, M Nishihara, A Furusho, S Hirakata, N Nishida, S Itou, M Hayashi, Y Fukumoto ; Involvement of Macrophage IL-6 Signaling in Aortic Dissection.
 26. N Nishida, H Aoki, S Ohno, M Nishihara, A Furusho, S Hirakata, M Hayashi, S Itou, H Yasukawa, Y Fukumoto ; Excessive Sodium Intake Exacerbates Acute Aortic Dissection through Proinflammatory IL-17 Pathway.

[その他]

ホームページ等

<http://www.kurume-shinzo.com>

<http://kurume-junken.com>

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

金山 朱里(KANAYAMA, Shuri)

昭和大学・医学部・講師

研究者番号: 10338535

田中 啓之(TANAKA, Hiroyuki)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号: 70197466