

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業））
分担研究報告書

炎症性動脈瘤形成症候群の新規診断法の確立に関する研究
- 動脈瘤形成におけるテネイシン C の分子機能の解析 -

研究分担者：青木浩樹（久留米大学循環器病研究所分子生物学 教授）

研究要旨

炎症性動脈瘤形成症候群は全身性急性汎血管炎に続発し、大動脈や、冠動脈など血管壁の破壊、不可逆的な著しい拡張をおこす。ほとんどが小児期に発症し、川崎病に合併することが多い。特に冠動脈に瘤を形成すると生命予後に直結する重篤な疾患であるが、動脈瘤の形成を防止する根本的な治療法はもとより、形成を予知する指標すら確立していない。画期的な診断・治療法の開発には、動物実験モデルを用いた病態の正確な把握と分子機序の解明が必須である。本研究では、動脈の炎症・瘤形成の病態制御の鍵分子であり、診断マーカー候補分子の一つ、細胞外マトリックス、テネイシン C の血管壁における分子機能の解析を行った。

A . 研究目的

炎症性動脈瘤形成症候群は多くは小児に発症し、全身性急性汎血管炎に続発し、大動脈や、冠動脈など血管壁の不可逆的な著しい拡張をおこし、本態は、血管壁の組織破壊であると考えられる。最近、高齢者の大動脈拡張性病変、すなわち、大動脈瘤 / 大動脈解離の分子病態メカニズムの解析が精力的にすすめられている。急性炎症に続発する本症候群の病態とは一見異なるが、血管壁の不適切なストレス応答、組織破壊から血管の不可逆的拡張にいたる分子機構は共通すると思われる。我々は、最近、慢性炎症に起因し、より緩徐に破壊が進行する大動脈疾患である大動脈瘤のヒト組織を解析し、組織破壊活性が高い部位でテネイシン C (TN-C) の発現が高いこと、マウス腹部大動脈モデルでも炎症に伴って TN-C が発現が誘導することを見いだした。TN-C は細胞外マトリックスのうち、多彩な分子機能を持つ matricellular タンパクの一つに分類され、組織リモデリングを制御する鍵分子の一つと考えられている。本研究では、TN-C ノックアウトマウスを用いて大動脈瘤・大動脈瘤解離モデルを作成し血管壁における TN-C の炎症制御および組織保護作用に

ついて検討した。

B . 研究方法

本研究は、吉村耕一(山口大学)、今中恭子(三重大学)と共同で行った。

1 動物

C57BL6 をバックグラウンドとする TN-C レポーターマウス、および TNC 遺伝子欠損マウスを用いた。

2 大動脈瘤・解離モデル

腹部大動脈周囲に塩化カルシウム塗布すると、大動脈周囲に炎症が惹起され、血管壁組織が破壊されて血管が拡張、すなわち腹部大動脈瘤が形成される。また、AngiotensinII を負荷すると血圧が上昇する。この二つを組み合わせると、腹部大動脈瘤形成部の上流、胸部大動脈に非常に強い血行動態負荷をかけることができる。本研究ではこのモデルを使用した。

3 細胞培養および精製 TN-C

大動脈平滑筋細胞は、内因性 TN-C の影響を除外するため、TN-C ノックアウトマウスの胸部大動脈から elastase/collagenase を用いて分離した。培養系に添加する TNC はヒトグリオーマ U251 cell line の培養上清から精製した。

(倫理面への配慮)

遺伝子改変マウス実験を用いた実験は山口大学、三重大学の指定された管理区域内で行い、生命倫理・安全対策に対する取り組みが確保された。本実験計画は、指針に基づき各大学の動物実験委員会および組換え DNA 実験安全委員会で承認され、遺伝子改変実験動物についても指定された管理区域内で行なった。

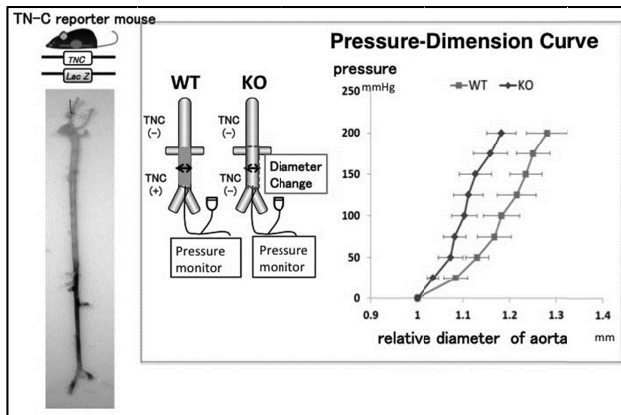
C. 結果

1 血管壁における TN-C の発現

マウス胎児の大動脈で、胎児循環がほぼ確立する胎生 14.5 日以降、大動脈全長の中膜平滑筋層で強い TN-C の発現がみられ、出生後、発現はさらに増強したが、成体マウスでは、腹部大動脈中膜にのみ弱い発現がみられた。

2 TN-C ノックアウトマウスの血管壁の物理特性

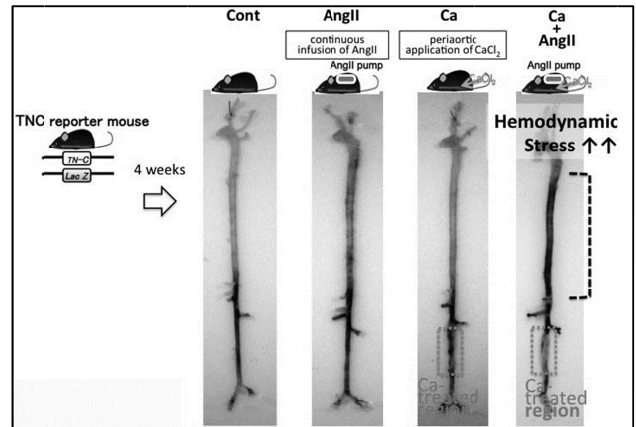
TN-C ノックアウトマウスには目立った表現型がみられないが、本来なら TN-C 発現のみられる腹部大動脈の受動的拡張能を野生型と対比すると、ノックアウトマウスでは血管壁の柔軟性が低下していた。



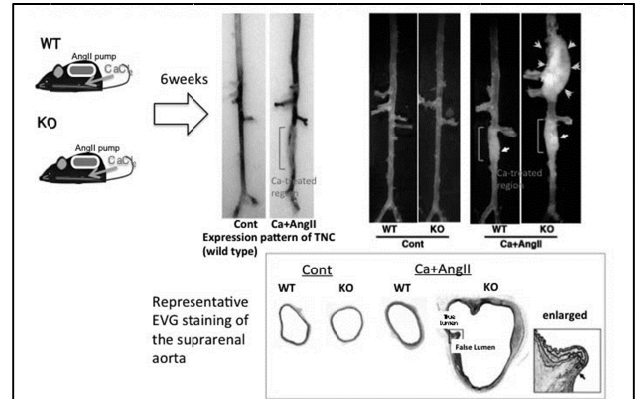
3 大動脈瘤・解離モデル

TN-C レポーターマウスに AngiotensinII 投与すると血圧は上昇し、胸部大動脈に TN-C の発現が誘導された。腎動脈下大動脈に塩化カルシウム塗布するとその部位に TN-C 発現を伴う炎症、組織破壊がおこり、瘤が形成された。またその周囲の線維化に伴い組織硬化がおこり、上流の胸部大動脈に負荷がかかり TN-C 発現が誘導された。さらに、塩化カルシウム塗布と AngiotensinII

投与を組み合わせると、上流の胸部大動脈に強い圧負荷を生じ、TN-C の極めて強い発現誘導がみられた。

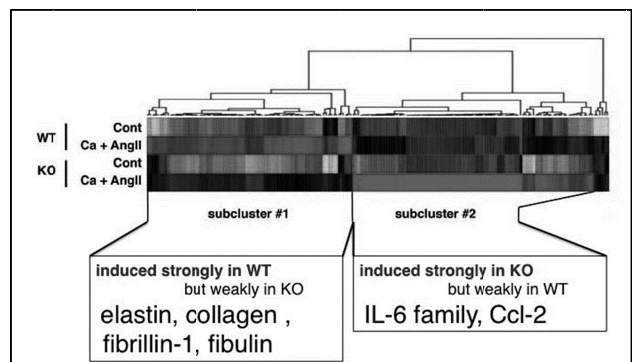


TN-C ノックアウトマウスにこの強い血行動態負荷をかけると、上部大動脈の拡張と血管壁の解離を発症した。



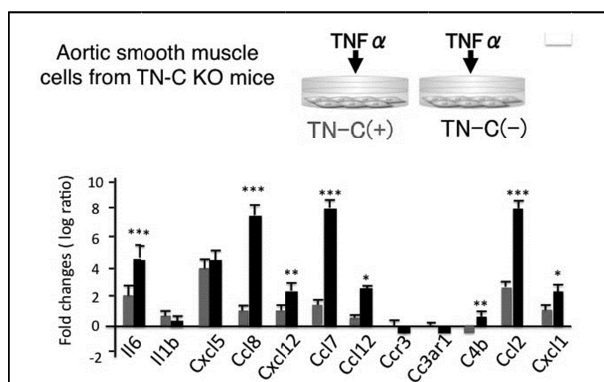
4 トランスクリプトーム解析

刺激後解離発症前に上部大動脈のトランスクリプトーム解析を行なったところ、野生型ではコラーゲンおよびエラスチンの発現が亢進していたが、ノックアウトマウスではその応答が弱い一方で、種々のマトリックス・メタプロテアーゼおよびケモカインの発現が亢進していた。



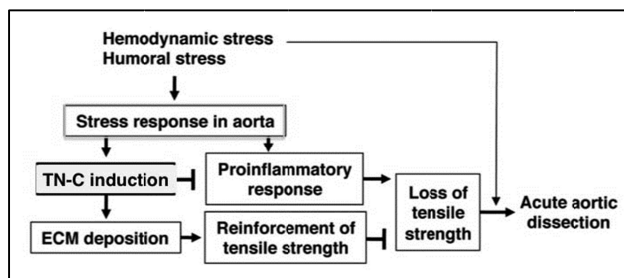
5 培養平滑筋に対する TN-C の作用

マウスから得られた大動脈平滑筋細胞を TN-C 存在下または非存在下で培養した後に TNF による炎症刺激を加えたところ、TN-C 非存在下ではより高いケモカイン発現応答を認めた。



D. 考察

種々のストレスに応答して発現する TN-C は、大動脈壁の柔軟性と強度を維持すると同時に破壊性炎症応答を減弱する分子的ショックアブソーバーであり、その機能不全は大動脈解離を引き起こすと考えられた (下図)。



本研究班の川崎病患者臨床前向き研究では、第2病日より第10-14病日に血中 TN-C の再上昇した群の方が動脈瘤形成の頻度が低かった。これは、急性期に炎症に伴って発現した TN-C は治療後、炎症の沈静化を反映して減少するが、修復期に再び発現して冠動脈拡大に対し保護的に働く可能性を示唆する。我々のノックアウトマウスを用いた結果は TN-C が炎症反応を抑制し、マトリックスの産生をあげて組織修復、補強を促進することにより血管保護的な作用を有するとの仮説を支持するものと思われる。

E. 結論

TN-C は炎症反応を抑制し、マトリックスの産生をあげて組織修復、補強を促進することにより血管保護

的な作用を有すると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

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 and Aoki H. *Tenascin C protects aorta from acute dissection in mice. Sci Rep.* 4: 4051, 2014

2. 学会発表

- 1) 青木浩樹. 大動脈壁のストレス応答: 適応と不全適応. 第 91 回に本生学会大会、シンポジウム「ストレスに対する血管応答制御の分子機構」、熊本、2014 年 3 月 16-18 日
- 2) 青木浩樹. *Inflammation and tissue remodeling in aortic diseases.* 第 78 回日本循環器学会学術集会、東京、2014 年 3 月 21-23 日

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし