

201412049A

厚生労働科学研究費補助金

循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業

(循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策実用化研究事業)

慢性炎症を基盤とする心血管病態モニタリングマーカーの
開発と臨床導入の実現

—慢性炎症の制御に着目した創薬のための新たなバイオマーカー開発—

平成26年度 総括研究報告書

研究代表者 鈴木 亨

平成27(2015)年 5月

厚生労働科学研究費補助金

循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業

慢性炎症を基盤とする心血管病態モニタリングマーカーの

開発と臨床導入の実現

—慢性炎症の制御に着目した創薬のための新たなバイオマーカー開発—

平成26年度 総括研究報告書

研究代表者 鈴木 亨

平成27（2015）年 5月

目 次

I. 総括研究年度終了報告

慢性炎症を基盤とする心血管病態モニタリングマーカーの開発と
臨床導入の実現

鈴木 亨、相澤健一、石田純一、澤城大悟、藤田大司、山本 晋

----- 1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 13

III. 研究成果の刊行物・別刷

----- 17

I . 総括研究終了報告

厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業）
総括研究年度終了報告書

慢性炎症を基盤とする心血管病態モニタリングマーカーの開発と臨床導入の実現
－慢性炎症の制御に着目した創薬のための新たなバイオマーカー開発－

研究代表者 鈴木 亨 東京大学医学部附属病院循環器内科 客員研究員

研究要旨

本研究は、心血管系の慢性炎症を基盤とする組織リモデリングを反映するバイオマーカーを開発し、臨床における病態モニタリングの実現を主な目的とする。具体的には、慢性炎症が基礎病態である動脈硬化性冠動脈疾患、心臓線維化・心不全、大動脈瘤・解離を主な対象疾患とする。慢性炎症・臓器リモデリングのモニタリング用バイオマーカーの開発において、最重要であるのは比較対象となる臨床情報（画像診断所見や臨床イベント）の集積・管理とその解析である。慢性病態のバイオマーカー（モニタリング、予後予測）開発の遅れは、臨床データ集積等の基盤インフラ整備不足の影響と考えられる。申請者らは、従来からこの点を重要視し、臨床症例情報データベースの構築を進め、バイオマーカー開発に活用してきた。心血管系の慢性炎症・臓器リモデリングを反映するバイオマーカーの確立を目的に、申請者が開発した心血管バイオマーカーの他に、既知または新規開発・導入マーカーや組み合わせの有用性を検討する。各疾患病態の最多症例数を有する施設と協力し、臨床検体や症例データの集積・管理の有機的な連携を通じた、コア施設を中心としたネットワーク体制を進める。技術面では、複数マーカーを同時に検討するためのプラットフォーム開発を課題とし、病態診断・検査の効率化も図る。さらにバイオマーカーを通して新規病態機序（鍵となる新規蛋白・酵素等）を明らかにし、新たな治療戦略も考案することを目的としている。

平成26年度は、大動脈瘤・解離に関しては、マウスモデルでの大動脈解離発症メカニズムの解析ならびに明らかとなったメカニズムに基づいたバイオマーカー探索また治療法開発を継続した。本研究により炎症性サイトカイン：顆粒球マクロファージ増殖刺激因子（GMSF）が大動脈解離の発症に重要であること、同因子が新規バイオマーカーとして有用である可能性及び大動脈解離の新規治療法の標的となることを証明し得た。一方、臨床症例を対象とした大動脈疾患の革新的バイオマーカー探索においては、東京大学医学部附属病院ならびに川崎幸病院での倫理申請を終了し、症例データや臨床サンプルの集積並びに解析を進める協力体制とスキームを確立した。また海外大規模レジストリーとの協力研究としてアメリカ国立衛生研究所（NIH）主導のGenTAC（遺伝素因を基とした胸部大動脈瘤及び心血管病態のレジストリー）研究での臨床サンプルの解析を進めており、新規炎症性因子のバイオマーカーとしての有用性を確認中である。心臓線維化・心不全に関しては、心臓線維化・リモデリングの病態における役割が注目されているインターロイキン33の受容体ST2を中心にヒトの血液検体を用いて測定を行い、心臓線維化・リモデリング反応との関連性を示した。冠動脈疾患・動脈硬化に関しては、我々が開発したバイオマーカー（BNP断片比）が、冠動脈病変全般の診断に有用であること、さらにそのメカニズムも明らかにした。

このように、心血管系の慢性炎症に対してのバイオマーカーを開発し、臨床現場において有効な診断・治療支援につなげ、さらには創薬をはじめ新しい治療戦略開発の糸口とすることを最終目標とする。慢性炎症制御に着目した診断・創薬のための新たなバイオマーカー開発を中心とした橋渡し研究と考えられる。

研究分担者

- 相澤健一 東京大学医学部附属病院循環器内科 特任助教
- 石田純一 東京大学医学部附属病院循環器内科 助教
- 澤城大悟 東京大学大学院医学系研究科ユビキタス予防医学講座 特任助教
- 藤田大司 東京大学保健センター 助教

研究協力者

- 山本 晋 川崎幸病院大動脈センター長

臨床経過（イベント等）の追跡研究が難しく、関連解析が不十分であった。慢性バイオマーカーの開発では、比較対象となる臨床情報の集積・管理と解析を可能にする基盤整備が不可欠である。本研究では、申請者らが開発してきた東大病院の臨床データベースを軸に、経時的にバイオマーカーと生体指標・臨床経過（非侵襲的な画像診断と臨床イベントの発生）を検討し、慢性的な組織リモデリングとバイオマーカーの関係を明らかにする。同時に、同マーカーを指標に、新しい病態機序を明らかにし、治療開発・創薬への糸口とする。具体的な検討項目は次ページ図に示す。

重要なのは、心血管バイオマーカーの開発実績、ならびに東大病院が有する医療統合データベースによる各施設からの情報集積・解析や臨床試験・治験での既存システム・ノウハウ、そしてネットワークの活用である。

また、臨床実用化での効率・低コスト化も勘案し、複数マーカーの同時測定を可能にするマルチ・マーカー用のプラットフォーム開発（抗体アレイや質量分析SRM/MRM法の検討等）も技術課題とする。申請者は内外の試薬メーカー（アリア・メディカル社・積水メディカル社等）と数多くの診断マーカー商品化に関り、また大型診断機器製作会社である島津製作所やNECとの連携実績もあり技術開発・商品化の実現性も非常に高い。

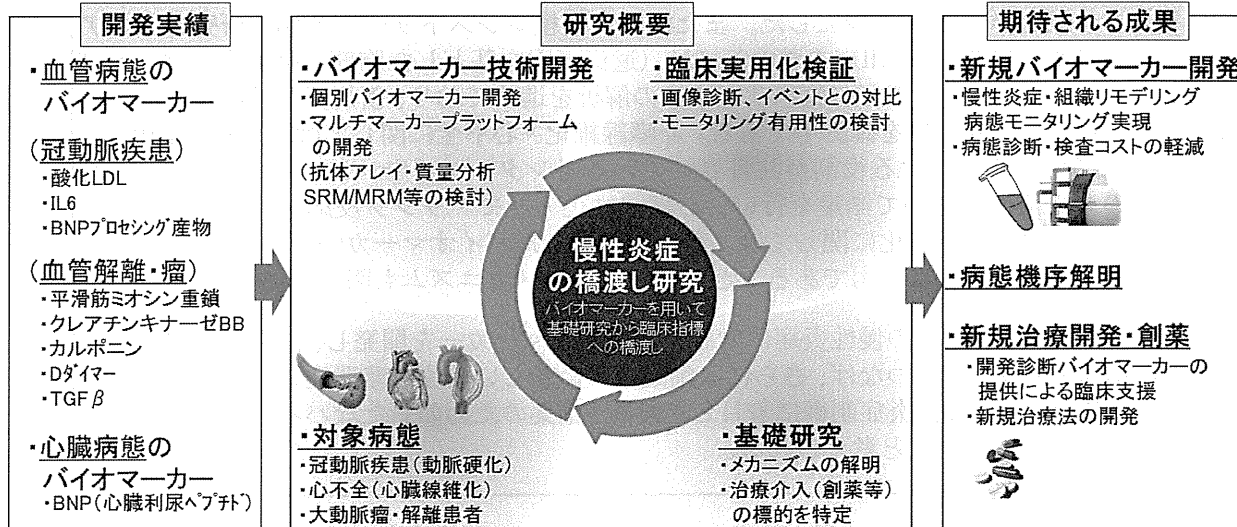
A. 研究目的

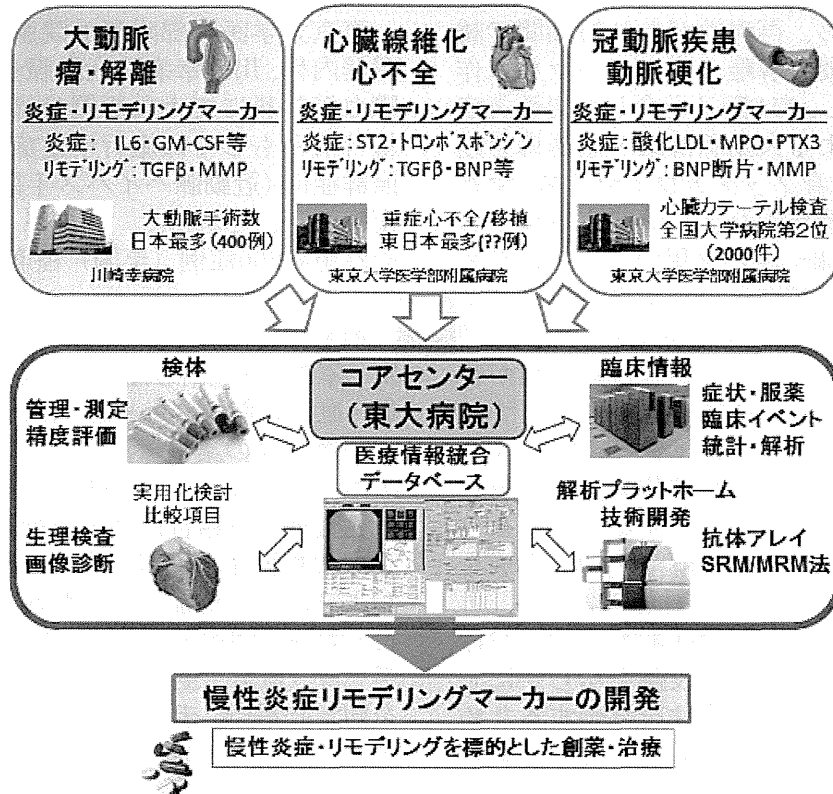
本研究では、慢性炎症性を基盤とする心血管系の組織リモデリングを反映するバイオマーカーを開発し、臨床における病態モニタリングの実現、さらに新しい治療戦略を開発する。

慢性炎症を病態基礎とする臓器リモデリングであり、早期介入・治療効果が期待される疾患としては、瘤や解離等の大動脈疾患、心筋線維化を元にした心不全、動脈硬化性冠動脈疾患がある。

これら疾患の急性診断バイオマーカーの開発は申請者らも主導してきたが、慢性炎症による疾病発症以前の経時的な変化（組織リモデリング）の検討は、長期間にわたる

慢性炎症を基盤とする心血管病態モニタリングマーカーの開発と臨床導入の実現
 -慢性炎症の制御に着目した創薬のための新たなバイオマーカー開発-





B 研究方法

本研究では、心血管系の慢性炎症性を基盤とする組織リモデリングを反映するバイオマーカー開発を現在までの成果および各施設から医療情報統合データベースに集積された情報を基に達成し、病態モニタリングの実現、新しい治療戦略につなげることを目的とする。またメカニズム検証のため動物等での解析を行う。

大動脈瘤・解離

大動脈瘤・解離については、申請者は世界に先駆けてバイオマーカーを開発してきた第一人者である。主に血管壁の炎症性リモデリングに伴う平滑筋由来構造蛋白質、マトロプロテアーゼ、凝固因子Dダイマーさらに血管増殖因子TGF β の有用性を報告した (Lancet 1995 & 1997, Circulation 1996, Ann Int Med 2000, J Cardiovasc Med 2006, Eur Heart J 2008, Circulation 2009, J Am Coll Cardiol 2011)。成人の慢性炎症性大動脈病態でのマーカー開発への業績は内外で知られており、既知また開発中のマーカー有用性について検討する。最近、発症機転での免疫細胞浸潤 (樹状細胞・マクロファージ) の重要性も指摘しており、活性化サイトカイン (GM-CSF、インターロイキン6) を世界に先

駆け検討する。日本国内最多の大動脈手術例を有する川崎幸病院大動脈センターにて、予後や画像診断との経時的比較も含め検討する。さらに、申請者が主要構成メンバーを務める大動脈疾患の国内及び国際レジストリーでの導入を行い、予定研究期間内に効率的に検証を行う。

急性大動脈解離発症メカニズムの基礎的検討

大動脈瘤は慢性炎症により進行する病態であり、IL-6等の炎症因子は炎症反応に最も多く関与しているメディエータである。しかしながら、詳細な炎症経路の役割や標的についてはほとんど検討されていないのが現状である。我々の予備検討ではアンジオテンシンIIによる大動脈瘤においてIL-6 およびIL-6受容体 α 、Gp130、STAT3の発現が増加していることを確認し、さらに大動脈の弾性線維の破綻がみられ、マクロファージが蓄積している局所にSTAT3が特に活性化していることが明らかになっていた。また、転写因子であるKrüppel-like factor (KLF) 群がアンジオテンシンIIの刺激によりその発現が増加し、大動脈解離・瘤形成に関与し、炎症シグナル経路を制御している可能性が示されていた。本研究ではまずメカニズ

ム解析のため、再現性があり短期間で誘導可能な大動脈解離・瘤モデルマウス作成を目標とし、KLF因子を介した慢性炎症シグナルによる大動脈解離・瘤誘導を期待し、KLF6全身ノックアウトマウス、マクロファージ特異的なノックアウトマウス (Flox /LysM-Cre) を用いて、アンジオテンシンII及び塩化カルシウム塗布による大動脈解離・瘤の発症誘導を行った。同モデルでは効率的に大動脈解離・瘤が作成しえたため次に標的遺伝子やシグナルを同定することを目標とした。また、GMC SF・IL-6受容体の中和抗体を介して特定の標的遺伝子をブロックすることにより慢性炎症および大動脈解離・瘤の形成を抑制する効果があるかを検証した。

慢性炎症および大動脈解離・瘤における炎症シグナル経路の役割を明らかにし、治療標的としての可能性を評価するため、アンジオテンシンII刺激による大動脈解離・瘤の病変形成および進行を抑制することが可能なかを、病理(免疫)組織学的、血清学的、生理的(血圧、血管エコー)に解析して評価を行った。さらに、炎症因子の全身ノックアウトマウスやマクロファージ特異的な炎症因子のノックアウトマウスを用いて大動脈瘤における炎症シグナルの役割を詳細に検討した。アンジオテンシンII及び塩化カルシウム刺激により誘導される炎症反応および大動脈解離・瘤の形成モデルについても同様の検討を行い、多方向から大動脈解離・瘤病態における炎症シグナル経路の検討を行った。具体的には、大動脈瘤病変において炎症シグナル経路の抑制により変動する遺伝子をDNA chip analysisを用いてスクリーニングし、標的遺伝子を特定した。さらにin vitro系でKLF6 gain of functionとloss of functionの条件下、標的遺伝子が炎症性サイトカインの分泌や細胞外マトリックス生成および分解のメカニズムに与える影響を検討した。また炎症因子等標的遺伝子の転写活性にKLFが直接的に関与しているについてクロマチン免疫沈降を行い検討した。

慢性炎症を基盤とする大動脈疾患における新規病態モニタリングマーカーの開発・評価を目的とした多施設共同研究

東京大学医学部附属病院胸部外科・循環器内科、川崎幸病院大動脈センター・心臓血管外科にて大動脈置換術・修復術を施行済みもしくは施行予定症例および対照群症例(冠動脈バイパス手術・弁膜症手術症例)、それぞれ患者200症例(年間)程度を対象とする。

通常の診療において得られる年齢・性別・家族歴・併存疾患・発症状況・症状経過・血行動態・診断・施行術式・急性期および慢性期の薬物療法ならびにCT・MRI・エコー所見による詳細な大動脈径変化(弁輪径・ST結合部径・上行/弓部/下行/腹部大動脈径、冠状断/矢状断/前額断)、および術後合併症の発症状況・予後(全死亡・大動脈関連死亡・再入院)、一般血液データ(血算・生化学・凝固・糖代謝等)を同意修得時、手術前、術後1か月、6ヵ月後、1年後、その後1年毎に記録・解析する。

インフォームド・コンセントを取得後、(術前、)術後1か月、6ヵ月後、1年後、その後1年毎に本研究用の血液10mlを採取する。試料採取責任者によって匿名化されたのち、血液は採取施設で遠心分離後、血漿成分を分離する。血液検体はその後直ちに東京大学医学部附属病院に搬送され、血漿は-80℃ディープフリーザーに保管し、症例数が貯まった段階でTGB β 、IL6、TNF α 、GM-CSF、MMP2・9、TIMP1・2をELISA法にて測定する。手術検体は病理検査後の残検体を使用する。検体は匿名化後、ディープフリーザーにて保管され、その後凍結切片・パラフィン包埋切片としヘマトキシリン・エオシン(HE)染色、弾性線維染色、マクロファージ・リンパ球特異的染色(等)にて大動脈壁の変化(リモデリング)や浸潤細胞の種類や程度を解析する。

大動脈リモデリング・予後指標としての各種バイオマーカー(フローサイトメトリーによる単球分画の変化、ELISA測定による新規バイオマーカー候補測定値)の有効性を、病理解析と経時的画像変化(CT上大動脈径・壁性情変化)並びに予後指標と比較・検討する。

心臓線維化・心不全

心不全は今まで心臓利尿ペプチドBNPが重症度指標として用いられ、申請者も研究し貢献してきた (Am Heart J 1998, Cardiovasc Res 2001, Int Heart J 2000 & 2001 & 2011 & 2012)。海外で最近インターロイキン33の関連物質であるST2と心臓線維化・リモデリングとの関連が注目されており (昨年FDA認可取得) 本研究にて本邦へはじめて導入し、検討を行う。東京大学医学部附属病院は心臓移植認定施設であり、種々の心不全症例が非常に多い。また以前より臨床検体の蓄積が非常に豊富であり、正常例から移植例までスペクトラムの広い経時的検討が可能である。この特徴を生かし、リモデリングマーカーの心不全症例を対象に、期間内に心不全発症や経過・予後に関する成果の確認が可能と考えられる。

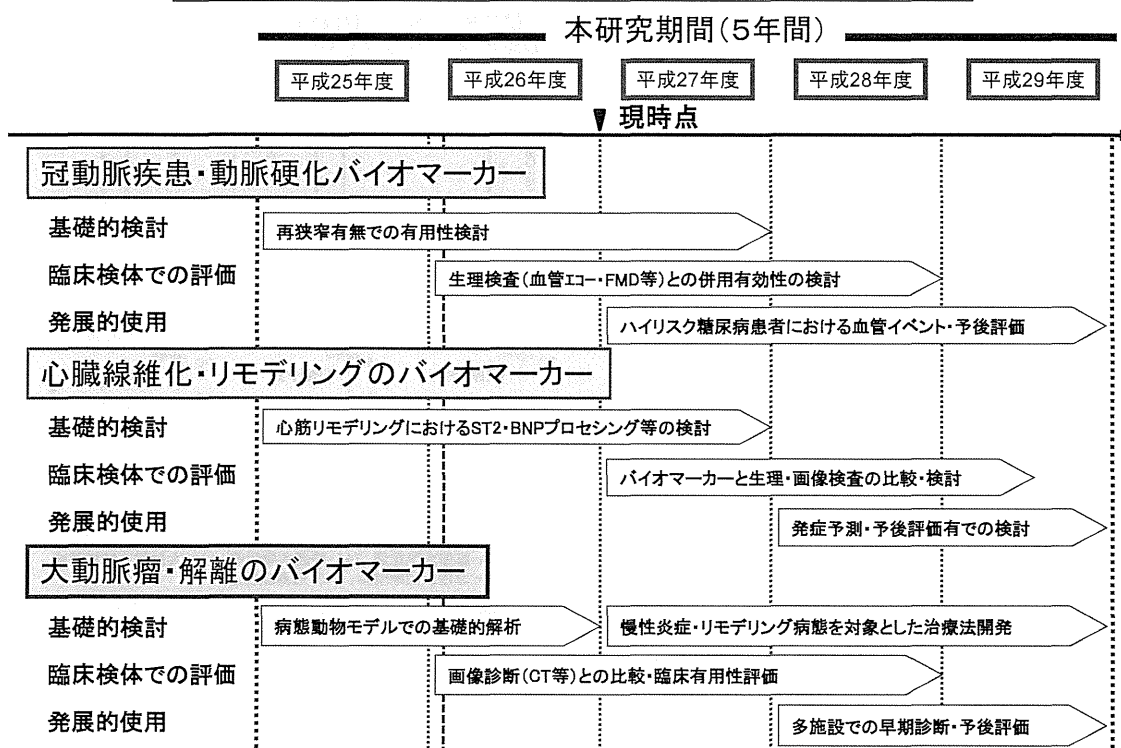
まず日本人健常者におけるST2の基準値を検討する。次に各種心疾患患者におけるST2値、また急性期・慢性期におけるST2値の変動を追求し、ST2が心疾患の予後予測や心筋リモデリングのバイオマーカーとして有用か否かを検討する。東京大学医学部附属病院の入院患者を対象とし、固相化96穴プレートを用いたELISA法にてST2値を測定、臨床状況や経過と比較検討を行う。

冠動脈疾患・動脈硬化

申請者は保険適用済みの複数の酸化LDL測定系 (ATVB 2000, Clin Biochem 2002, Heart 2004) 他、インターロイキン6も検討し (Heart 2000)、炎症マーカーによる冠動脈病態のバイオマーカー開発・臨床実用化を進めてきた。最近、生理活性物質 (心臓利尿ペプチドBNP) のプロセッシングを指標とする新しい手法による冠動脈疾患バイオマーカーを開発した。診断的有用性 (Clin Chem in press) の他、プロセッシングの病態に新規酵素に関わることも明らかにし、今後、新しい治療戦略につながる期待もある。このように、診断バイオマーカー開発や病態指標として新しい機序を明らかにし、創薬へと発展させた実績を有する。

今回、東大病院循環器内科にて年間1800例を越える入院者数を対象にバイオマーカーの有用性検討を進める。既存炎症マーカー (酸化LDL、ミエロペロキシダーゼMPO、IL6/PTX3/CRP等) また開発を進めている新規酸化ストレスマーカーについて病勢と画像診断所見 (心臓カテーテル、冠動脈CT) を比較検討する。健常者として東大病院心血管ドック症例 (年間500例) との比較検討を通して、慢性炎症性動脈硬化疾患の進行との経時的関連の検討も行う。

新規病態バイオマーカー開発予定 行程表



(倫理面での配慮)

・試験実施に係る生データ類および同意書等を取扱う際は、被験者の秘密保護に十分配慮する。病院外に提出する症例報告書等では、被験者識別コード等を用いて行う。試験の結果を公表する際は、被験者を特定できる情報を含めないようにする。試験の目的以外に、試験で得られた被験者のデータを使用しない。

・日本心臓血管外科手術データベースについて2009年4月1日付けで日本心臓血管外科学会医療倫理委員会より問題なしとの審査結果を得ている (<http://jcvsd.umin.jp/P-1.html#004>)。

・ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)、疫学研究に関する倫理指針(平成19年文部科学省・厚生労働省告示第1号)、遺伝子治療臨床研究に関する指針(平成16年文部科学省・厚生労働省告示第2号)、臨床研究に関する倫理指針(平成20年厚生労働省告示第415号)を尊重する。

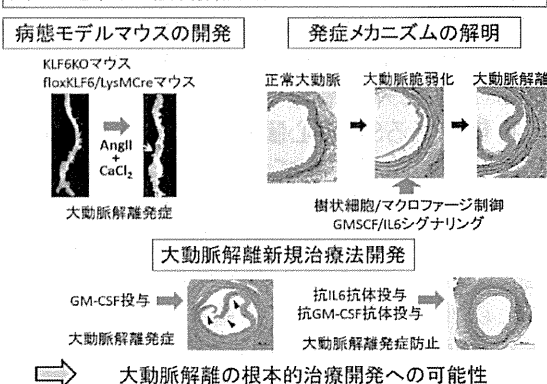
・患者個人情報・臨床情報は東京大学医学部附属病院において施錠可能な保管庫内・パスワード保護されたコンピューター内に厳重に保管され、第三者がアクセスすることは出来ない。個人名はコード番号に変換される。また学会等で個人情報は発表されないが研究成果含め外部に漏洩の無いよう最大限の注意を払う。

C.研究結果

大動脈瘤・解離

大動脈瘤・解離については、発症機転での免疫細胞浸潤(樹状細胞・マクロファージ)の重要性および炎症性サイトカイン(GM-CSF、IL-6)を標的とした治療法の開発に至る知見を得た(図1)。同研究結果をNature Communication誌に発表した(Nat Commun. in press)。我々はまず大動脈解離のモデル動物(マウス)を作製した。具体的には、KLF6ノックアウトマウスに大動脈の炎症(アンジオテンシンII持続投与とCaCl₂の局所投与)で大動脈解離が発症することを見出した。さらにKLF6がマクロファージを介して大動脈解離の発症を制御することを明らかにし、その作用機序とし

図1: 急性大動脈解離発症メカニズムの基礎的検討

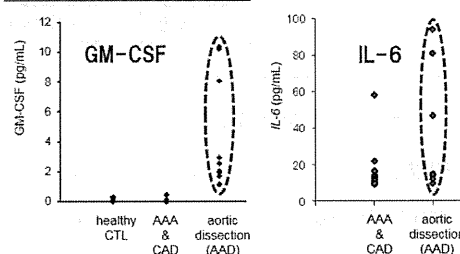


て、炎症性サイトカインGM-CSFとその下流に位置するIL-6の活性化がマクロファージの活性化を制御することを明らかにした。その結果に基づいたGM-CSFに対する中和抗体の投与によっても大動脈解離・瘤発症が抑えられた。逆に、GM-CSFの投与により解離が発症した。

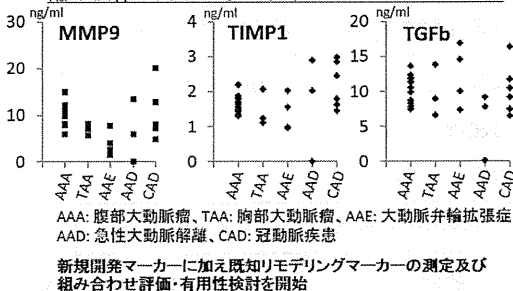
また実際に、モデル動物・患者症例においてもGM-CSFの血中濃度は高値でありGM-CSFは動脈瘤・解離の鍵分子であると考えられた(図2)。

図2: 臓器リモデリングを反映するバイオマーカーの確立

基礎的検討から有用性が示唆された新規炎症マーカーの測定・有用性検討を開始



臨床検体を用いたリモデリングマーカーの測定



このように本研究では大動脈解離のマウスモデルを新たに開発し、炎症性サイトカ

インによる発症メカニズムを解明し、それらへの介入（中和抗体）を通じた発症予防の可能性を示した。さらに、これら炎症性サイトカインがヒトにおける大動脈解離の病態にも関わり、新しい診断バイオマーカーとして有用であることも示した。これらの一連の解析を通して、大動脈解離の発症メカニズムの解明から新しい診断法、さらに治療法の開発の糸口までのトランスレーションを展開し得た。また東京大学医学部附属病院および川崎幸病院での倫理申請を終了し、各大動脈疾患（大動脈解離、腹部・胸部大動脈瘤、大動脈弁輪拡張症、コントロールとしての冠動脈疾患症例）臨床検体を使用した慢性炎症病態を標的とした各種大動脈リモデリングマーカー（GM-CSF、IL-6、トランスフォーミング増殖因子：TGFβ、マトリックスメタロプロテアーゼ：MMP9、MMP組織阻止因子：TIMP）について有用性の検討を開始し、ワークフローを確立した。さらに同ワークフローを基に海外大規模レジストリーとの協力研究としてアメリカ国立衛生研究所（NIH）主導のGenTAC（遺伝素因を基とした胸部大動脈瘤及び心血管病態のレジストリー）研究での臨床サンプルの解析を進めており、新規炎症性因子のバイオマーカーとしての有用性を確認中である（図3）。

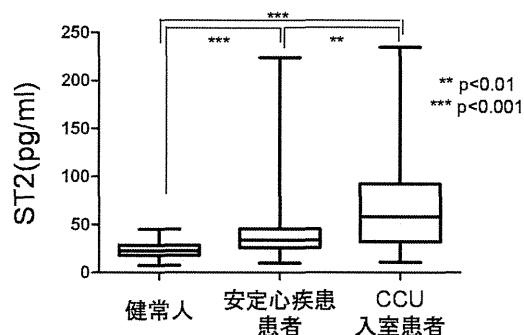
図3: 臨床検体や症例データの集積・管理の有機的な連携を目的としたネットワーク体制の確立



今回得られた大動脈瘤・解離の炎症性発症機転に関する知見をもとに、引き続き臨床検体を用いて各種病態や段階における役割を明らかにしていく予定である。

心臓線維化・心不全

心臓線維化・心不全については、心臓線維化・リモデリングの病態における役割が注目されているインターロイキン33の受容体ST2を中心にヒトの血液検体を用いて測定を行った。測定に際して、健常者と東京大学医学部附属病院冠動脈疾患集中治療室（以下CCU）入室患者から採取した検体を使用し、健常者の血清ST2値よりもCCU入室患者の入室時の血清ST2値は3倍高く、入院後7日目は半分程度まで低下することを明らかにした。疾患別評価において、急性心筋梗塞症例では、第7病日の方が入院時よりもST2値が高値となり（遷延）、心臓線維化・リモデリング反応との関連性が示唆された。



冠動脈疾患・動脈硬化

冠動脈疾患・動脈硬化について、我々はこれまでに保険収載されている酸化LDL測定系（マロンジアルデヒド化LDL）他、インターロイキン6も開発に携わり、炎症マーカーによる冠動脈病態のバイオマーカー開発・臨床実用化を進めてきた。最近では生理活性物質（心臓利尿ペプチドBNP）のプロセッシング（断片化）により、末梢血中でBNP 5-32およびBNP3-32を測定する系を開発し、この比BNP5-32/BNP3-32（BNP断片比）を指標とする新しい手法による冠動脈疾患バイオマーカーを開発した(Clin Chem 2013)。当初は再狭窄の病態との関連性を中心に開発を進めてきたが、本研究において冠動脈病変全般の診断に有用であること、さらにそ

のメカニズムも明らかにした。このように、診断バイオマーカー開発や診断的有用性、さらに、病態指標として新しい機序を明らかにした。

D. 考察

本研究は現在まで発症病態が不明であった大動脈解離について、病態モデルマウスの開発により世界に先駆け(慢性)炎症素因を基にした発症メカニズムを解明した。この開発・発見は病理学的な解明のみならず、発症各段階での病因因子を標的とした病態バイオマーカーや大動脈疾患治療法の開発(細胞等での基礎的検討・病態マウスモデルへの生物学的効果・薬理動態等)にとって、非常に大きな進歩と考えられる。また同マウスモデルでの検討から、臨床例を対象とした初期応用の可能性(抗GMCSF抗体・抗IL6抗体)が示されており、慢性炎症を標的とした病態治療開発につながる知見と捉えている。また東京大学医学部附属病院および川崎幸病院において確立された共同研究体制により、今後、年間500例を超える臨床例を対象とした病態バイオマーカーの検討・開発が促進可能であり、本年度の予備的検討また基礎的検討双方での知見を加味した効果的な戦略を進行できると予想される。

大動脈疾患の発症機転の基礎病態は大動脈壁の脆弱化(fragile aorta)であるが、この病態における慢性炎症の役割は意外にも今まで注目されていない。大動脈瘤は主に大動脈壁内の炎症とそれに対する修復(線維化)反応の遷延が基本病態を成すと考えられるようになりつつあるが、大動脈解離の場合は、むしろ高血圧等による機械的な刺激が主因であり、これが動脈硬化等で変性・脆弱化した大動脈に負荷をかけることが破綻原因と考えられてきた。今回の動物モデルはあくまでも炎症のモデルであり、ヒトでみられる大動脈解離の複雑な病像(圧負荷、動脈硬化変性)の中のコンポーネントのひとつに過ぎないが、この単純化した炎症モデルを用いたことにより、炎症成分の主因を成すサイトカインであるGM-CSF、IL-6等を分子標的とした治療介入という今までになかった新しい分子標的治療法の開発の具体的な可能性を示唆する結果を得たことである。大動脈解離の治療法は、外科治療を除けば基本的には降圧治療が中心

であることから、本研究を通して基本病態を標的とした新しい抜本的な治療法の開発につながる可能性も示唆されている。

このように、本研究は炎症基盤を有する大動脈瘤等他の血管病態への波及のみならず、心臓線維化等の心臓における慢性炎症病態、並びに冠動脈疾患・動脈硬化による虚血性心疾患の新しい病態解明さらに治療法の開発の糸口となる期待がある。すなわち、本研究は、慢性炎症を基礎とした普遍的な病態メカニズムの解明、さらにそれに基づいた治療法の開発という心血管病態学のみならず医学全般へと広く波及する可能性を有すると考えている。

研究成果の意義及び今後の発展

①学術的・国際的意義

本研究により、臨床における心血管系疾患の病態モニタリングの実現、さらに新しい治療戦略の開発が可能になることが期待される。

②社会的意義

日本では、循環器系医療費は年間5兆2980億円(全医療費の20.4%)であり、近年増加の一途である(平成20年度国民医療費の概況)。なかでも冠動脈疾患は年間46.0万人の患者がカテーテル検査を、26.2万人の患者がカテーテル治療を受けている(2008年循環器疾患診療実態調査報告書)。カテーテル検査費は1件約30万円、カテーテル治療費は1件約210万円であり、検査だけでも1380億円、治療に至っては5500億円の医療費を要す(2001年全日本病院協会調査)。バイオマーカーでモニタリング可能となれば、検査費に相当する1380億の医療費抑制につながると試算される。心不全についても、患者総数は25万人にのぼり、死因の5.7%を占める(平成23年度患者調査)。心不全診断の為に心エコー検査は1件8000円であり、診断・経過観察がバイオマーカーでモニタリング可能となれば200億円の抑制につながる。同様に、大動脈瘤・解離も最近患者数の増加が著しく、それぞれ3.4万、1.5万人に達する(平成23年度患者調査・人口動態調査)。現在、造影CT(1件35000円)が診断に用いられているが、初期診断がバイオマーカーでモニタリング可能となれば17.2億円の医療費抑制につながると試算される。このように、本研究で開発するバイオマーカーは、費用対効果の観点からも大きな成果が期待できる。

③今後の課題

今後、手術例摘出大動脈や血液サンプル等バイオリソースからの遺伝子、蛋白、組織等の取扱いについてはNIH主導のGenTAC研究と同様に行いつつ、新規の原因可能性遺伝子を含めた解析・資源整備を行う必要がある。

E. 結論

本研究は、慢性炎症を基とした大動脈疾患（大動脈解離・瘤）、心臓線維化・心不全、冠動脈疾患・動脈硬化についての新規メカニズムを解明した。今後、さらに治療方法の最適化や予後予測、また慢性炎症性を基盤とする組織モデリングを反映するバイオマーカーの開発や臨床における病態モニタリングの実現、新しい治療戦略の開発を可能にすると期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Son BK, Sawaki D, Tomida S, Fujita D, Aizawa K, Aoki H, Akishita M, Manabe I, Komuro I, Friedman SL, Nagai R, Suzuki T. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor is required for aortic dissection/intramural haematoma. *Nat Commun.* in press.
2. Suzuki T, Eagle KA, Bossone E, Ballotta A, Froehlich JB, Isselbacher EM. Medical management in type B aortic dissection. *Ann Cardiothorac Surg.* 2014;3:413-417
3. Dean JH, Woznicki EM, O'Gara P, Montgomery DG, Trimarchi S, Myrmet T, Pyeritz RE, Harris KM, Suzuki T, Braverman AC, Hughes GC, Kline-Rogers E, Nienaber CA, Isselbacher EM, Eagle KA, Bossone E. Cocaine-related Aortic Dissection: Lessons from the International Registry of Acute Aortic Dissection. *Am J Med.* 2014;127:878-885
4. Fujita D, Takeda N, Imai Y, Inuzuk

a R, Komuro I, Hirata Y. Pathophysiology and Japanese clinical characteristics in Marfan syndrome. *Pediatr Int.* 2014;56:484-91

5. Suzuki J, Imai Y, Aoki M, Fujita D, Aoyama N, Tada Y, Wakayama K, Akazawa H, Izumi Y, Isobe M, Komuro I, Nagai R, Hirata Y. Periodontitis in cardiovascular disease patients with or without Marfan syndrome—a possible role of Prevotella in termedia. *PLoS One.* 2014 Apr 18;9:e95521
6. 鈴木亨：国内外の大動脈レジストリー研究。改定第2版最新医学・別冊 新しい診断と治療のABC大動脈瘤・大動脈解離 2014；42，13-25
7. 相澤健一。カルシウム拮抗薬。診断と治療増刊号～心不全のすべて。医学書院。103巻増刊号172-174，2015。
8. 相澤健一。動脈硬化のバイオマーカー。循環器内科。科学評論社。75:234-240，2014。
9. 相澤健一。診断マーカーと測定しておくべき血液検査。虚血性心疾患update。medicina。医学書院。51:616-620，2014。
10. 相澤健一。内服薬のチェックポイント。「はじめましょう 有病者の口腔ケア」一歯科衛生士のための有病者チェックポイントー（103巻増刊号），2015。
11. 石田純一、相澤健一。BNP、NTproBNPを用いた心機能評価、他疾患と心疾患の鑑別。診断と治療増刊号～心不全のすべて。医学書院。103巻増刊号84-90，2015。
12. 澤城大悟、鈴木亨：真性大動脈瘤切迫破裂の診断と対策 急性大動脈症の診療の新展開。「ICUとCCU」2014；38(6)；379-386
13. 藤田大司：マルファン症候群研究の現状と展望 綜説シリーズ—現代医学の焦点(380)。日本臨牀 2014；72(6)；1163

2. 学会発表

1. The 79th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (JCS 2015, Osaka, Japan, 2015/4/24)

Suzuki T

Translational Research in Cardiovascular Medicine - U.K. Perspective

2. 相澤健一. 薬物性心筋傷害バイオマーカー探索—プロテオミクスによる新規バイオマーカーの開発—. 第35回日本臨床薬理学会学術集会. 愛媛県松山市. 平成27年12月4日
3. 第111回日本内科学会講演会 (東京、2014.04.11-13.)
藤田大司、今井靖、武田憲文、加藤昌義、西村敬史、平田恭信、小室一成
日本人マルファン症候群における2010年改訂Ghent基準とフィブリリン遺伝子変異
4. Marfan population. 9th International MFS Meeting (Paris, 2014.9.25-27)
Fujita D, Takeda N, Imai Y, Hirata Y
Comparison between the original and revised Ghent criteria in Japanese
5. 第17回日本成人先天性心疾患学会 (東京、2015.1.16-18.)
Fujita D, Takeda N, Kato M, Nishimura H, Inuzuka R, Imai Y, Hirata Y, Komuro I
Marfan syndrome-Fibrillin mutation and clinical phenotypes

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 特になし。
2. 実用新案登録 特になし。
3. その他 特になし。

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名・出版年・刊号・ページ
Son BK, Sawaki D, Tomida S, Fujita D, Aizawa K, Aoki H, Akishita M, Manabe I, Komuro I, Friedman SL, Nagai R, Suzuki T.	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor is required for aortic dissection/intramural hematoma.	Nat Commun. in press.
Suzuki T, Eagle KA, Bossone E, Ballotta A, Froehlich JB, Isselbacher EM.	Medical management in type B aortic dissection.	Ann Cardiothorac Surg. 2014, 3: 413-417.
Dean JH, Woznicki EM, O'Gara P, Montgomery DG, Trimarchi S, Myrmel T, Pyeritz RE, Harris KM, Suzuki T, Braverman AC, Hughes GC, Kline-Rogers E, Nienaber CA, Isselbacher EM, Eagle KA, Bossone E.	Cocaine-related Aortic Dissection: Lessons from the International Registry of Acute Aortic Dissection.	Am J Med. 2014, 127: 878-885.
Fujita D, Takeda N, Imai Y, Inuzuka R, Komuro I, Hirata Y.	Pathophysiology and Japanese clinical characteristics in Marfan syndrome.	Pediatr Int. 2014, 56: 484-491.

III. 研究成果の刊行物・別刷

ARTICLE

Received 16 Jun 2014 | Accepted 23 Mar 2015 | Published 29 Apr 2015

DOI: 10.1038/ncomms7994

Granulocyte macrophage colony-stimulating factor is required for aortic dissection/intramural haematoma

Bo-Kyung Son¹, Daigo Sawaki¹, Shota Tomida¹, Daishi Fujita¹, Kenichi Aizawa^{1,2}, Hiroki Aoki³, Masahiro Akishita⁴, Ichiro Manabe¹, Issei Komuro¹, Scott L. Friedman⁵, Ryozo Nagai² & Toru Suzuki^{1,2,6,7}

Aortic dissection and intramural haematoma comprise an aortopathy involving separation of the aortic wall. Underlying mechanisms of the condition remain unclear. Here we show that granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) is a triggering molecule for this condition. Transcription factor Krüppel-like factor 6 (KLF6)-myeloid-specific conditional deficient mice exhibit this aortic phenotype when subjected to aortic inflammation. Mechanistically, KLF6 downregulates expression and secretion of GM-CSF. Administration of neutralizing antibody against GM-CSF prevents the condition in these mice. Conversely, administration of GM-CSF in combination with aortic inflammation to wild-type mice is sufficient to induce the phenotype, suggesting the general nature of effects. Moreover, patients with this condition show highly increased circulating levels of GM-CSF, which is also locally expressed in the dissected aorta. GM-CSF is therefore a key regulatory molecule causative of this aortopathy, and modulation of this cytokine might be an exploitable treatment strategy for the condition.

¹Department of Cardiovascular Medicine, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan. ²Jichi Medical University, 3311-1 Yakushiji, Shimotsuke-shi, Tochigi-ken 329-0498, Japan. ³Cardiovascular Research Institute, Kurume University, 67 Asahi-machi Kurume-shi, Fukuoka-ken 830-0011, Japan. ⁴Department of Geriatric Medicine, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan. ⁵Division of Liver Disease, Department of Medicine, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, 1428 Madison Avenue, New York, New York 10029, USA. ⁶Department of Cardiovascular Sciences, University of Leicester, BHF Cardiovascular Research Centre, Glenfield Hospital, Groby Road, Leicester LE3 9QP, UK. ⁷National Institute for Health Research Leicester Cardiovascular Biomedical Research Unit, Glenfield Hospital, Groby Road, Glenfield, Leicester LE3 9QP, UK. Correspondence and requests for materials should be addressed to T.S. (email: ts263@le.ac.uk).

Aortic dissection and intramural haematoma comprise a potentially life-threatening aortopathy involving separation of the aortic wall^{1–6}. The two conditions are distinguished by a tear in the aortic intima as present in the former classical form of aortic dissection, which results in blood flow into the aortic wall and is absent in the latter form of intramural haematoma with bleeding confined within the aortic wall. This aortopathy is presently understood to be a continuum, with the latter a variant and precursory condition of the former^{7–9}. Advancements in the understanding of genetic underpinnings (for example, *ACTA2*)^{10,11}, clinical/epidemiological aspects (for example, The International Registry of Acute Aortic Dissections (IRAD))^{4,5} as well as biochemical approaches (for example, smooth muscle biomarkers)^{5,6} have been made in the last decade, but underlying mechanisms have remained obscure owing much to lack of a reliable animal model.

Recent advancements in understanding mechanisms of aortic disease have stemmed from hallmark studies in the genetically fragile Marfan aorta, which have shown that transforming growth factor β (TGF β) and its downstream intracellular kinase signalling pathways play a central role in the pathogenesis^{12–14}. In contrast, an inflammatory pathway is thought to be a major component of aortic conditions in the atherosclerotic/degenerative aorta seen in the typical elderly patient^{15,16}. Commonalities and differences in mechanisms as well as relative contributions of underlying processes in these different aortic conditions have only begun to be unravelled. In the present study, we sought to address the underlying mechanisms of aortic dissection/intramural haematoma, and to understand the triggering mechanism of the condition.

Krüppel-like factor 6 (KLF6) is a transcription factor that has been shown to be robustly expressed in macrophages¹⁷, and to regulate inflammatory fibrotic diseases of multiple organs including the liver¹⁸ and kidney¹⁹. In the present study, we hypothesized that this factor might regulate pathogenic mechanisms underlying aortic disease, and observed that mice deficient for KLF6 in macrophages when subjected to aortic inflammation manifest aortic dissection/intramural haematoma.

Intriguingly, we find that the inflammatory cytokine, granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)²⁰, plays a central role in onset of this condition. Administration of neutralizing antibody against GM-CSF prevents the condition in these mice. Conversely, administration of the cytokine in combination with aortic inflammation to wild-type mice is sufficient to induce the condition, suggesting general effects. Clinically, patients with aortic dissection show elevated circulating levels of the cytokine, which is also expressed in the dissected aorta. GM-CSF is therefore a key regulatory molecule causative of aortic dissection/intramural haematoma.

Results

Aortic aneurysm with inflammation in *Klf6* heterozygous mice. We initially found that mice heterozygously depleted for *Klf6* manifest a phenotype of exacerbated aortic aneurysm (defined as greater than 50% increase in the external aortic diameter with a conserved aortic wall)^{21,22}, when subjected to aortic inflammation (2 weeks infusion of angiotensin II (AngII) with local application of calcium chloride (CaCl₂)). Histological findings showed enlargement of the aortic lumen with a fragile aortic wall and further fibrotic tissue deposition compounded with marked infiltration of macrophages (Mac3-positive cells) (Fig. 1a–e). Mechanistically, increased expression of matrix metalloproteinase-9 (*MMP9*, as a marker of vascular remodelling)²³, *F4/80* (as a marker of macrophages)^{24,25} and *IL-6* (as a marker of inflammation)^{16,26–30} were seen in the aorta (Fig. 1f).

As marked infiltration of immune cells was seen in the diseased aorta of these mice, macrophages were depleted using clodronate, which abrogated the aortic phenotype with near absence of macrophage infiltration (Fig. 1g,h). Thus, immune cells including macrophages were important for aortic remodelling in this model.

***Klf6*^{fl/fl}; *LysM Cre* mice exhibit aortic dissection/haematoma.** As the aortic condition in *Klf6*-deficient mice appeared to involve a dysregulated inflammatory response by macrophages, myeloid-specific *Klf6*-deficient mice (*Klf6*^{fl/fl}; *LysM Cre* mice) were further generated, which showed specific reduction of *KLF6* expression in the myeloid lineage by 70% as compared with control mice.

Klf6^{fl/fl}; *LysM Cre* mice subjected to aortic inflammation showed a similar phenotype of exacerbated abdominal aortic aneurysm to that seen in heterozygous knockout mice (Fig. 2a,b), but intriguingly, further showed suprarenal aortic dissection/intramural haematoma defined as separation of the intra-aortic wall with haematoma formation accompanied by intimal tear for dissection³ (Fig. 2c–f). Mice that died were from aortic rupture most likely secondary to aortic dissection/intramural haematoma (Fig. 2g). This lesion also showed fibrotic tissue deposition with infiltration of Mac3-positive macrophages (Fig. 3a,b), thus confirming that the aortic phenotype in *KLF6* deficiency was associated with perturbation of the inflammatory response.

Mechanistically, *Klf6*^{fl/fl}; *LysM Cre* mice showed elevated expression of *IL-6* in the aortic lesion (Fig. 3d) and elevated circulating levels (Fig. 3c). Further, macrophages obtained from bone marrow of *Klf6*^{fl/fl}; *LysM Cre* mice exhibited increased *IL-6* expression (Fig. 3e). Differences in expression were not seen in other major pro-inflammatory cytokines such as *IL-1 β* , *MCP-1* or *TNF α* between macrophages from *Klf6*^{fl/fl} and *Klf6*^{fl/fl}; *LysM* mice (Fig. 3e). Immune cells in the diseased aorta of these mice were characterized by flow cytometry analysis, which showed a markedly increased population of CD11b⁺Ly6C^{hi} inflammatory monocytes and this increase was also seen in the peripheral blood (Fig. 3f). Granulocytes (for example, neutrophils; Ly6G⁺ cells) were not affected in number or (sub)population under basal conditions or in the setting of CaCl₂ and AngII infusion (Supplementary Table 1; Supplementary Fig. 1a,c), nor was the functional activity of neutrophils, as examined by inflammatory cytokine expression such as *IL-8* or *TNF α* ³¹ (Supplementary Fig. 1e), or that of the population of dendritic cells (Lineage⁻CD11c⁺ cells) (Supplementary Fig. 1b,d) affected under these conditions. Taken together, expansion of inflammatory monocytes in the aorta and circulation was selectively associated with the present experimental model and conditions.

TGF β , a central molecule in the pathogenesis of Marfan aortopathy^{12,14,32–34}, and its downstream signalling pathways (canonical pSmad2 (ref. 35) and non-canonical pERK1/2 (ref. 12)) were not affected in either *Klf6*^{fl/fl}; *LysM Cre* mice or heterozygous knockout mice, while pSTAT3, a downstream signalling pathway of *IL-6*, was activated in both mice (Fig. 4a–d), suggesting that the TGF β -mediated pathway was not critically involved in the underlying phenotype, and that the *IL-6*/STAT3 pathway is.

GM-CSF is a downstream target of KLF6. Delineation of target molecules and mechanisms of regulation of immune cells was next addressed using RNA profiling array analysis. Remarkably, GM-CSF levels showed the greatest increase in macrophages derived from bone marrow of *Klf6*^{fl/fl}; *LysM Cre* mice in response to AngII stimulation (3.89-fold) as compared with control

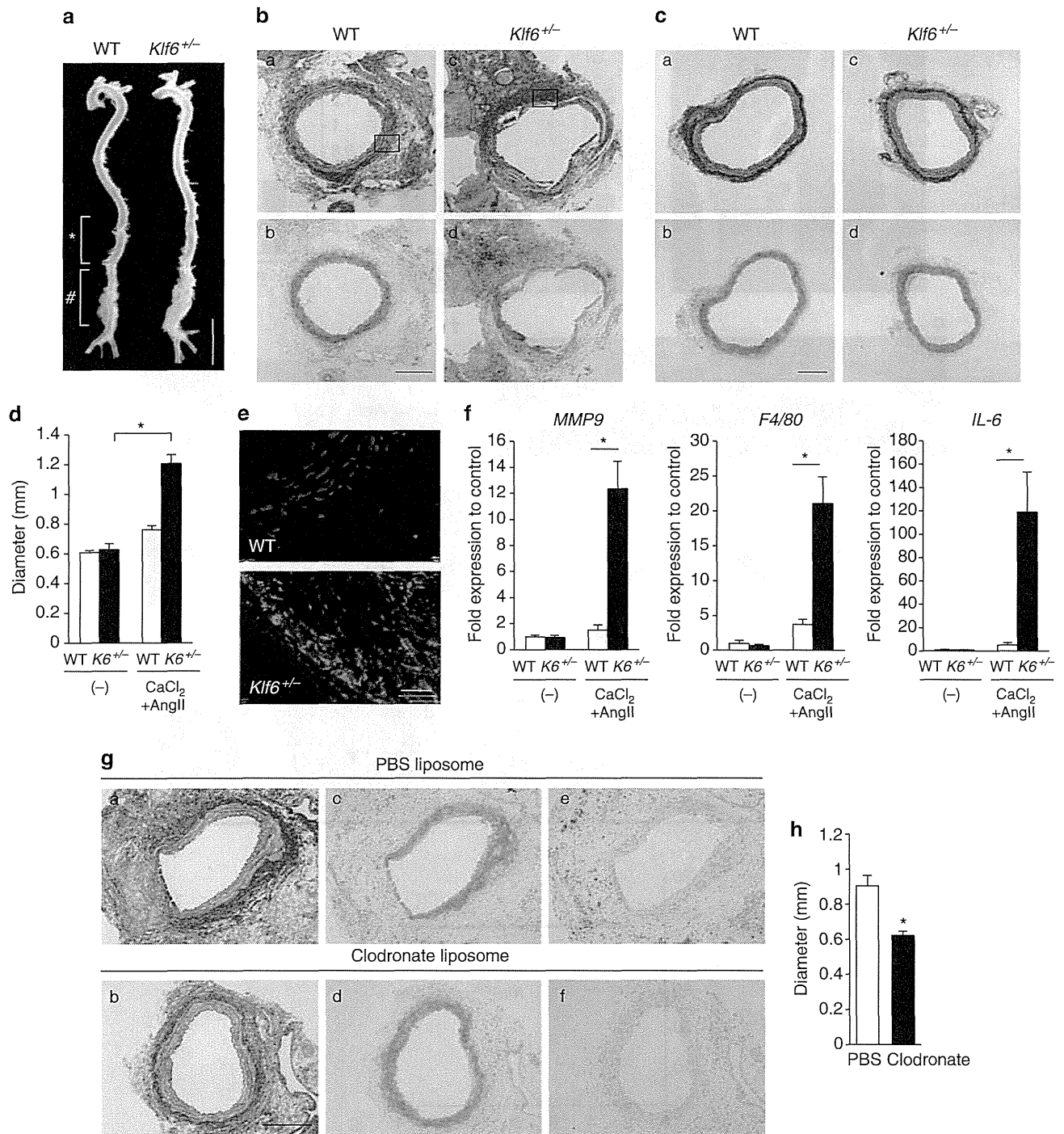


Figure 1 | Aortic aneurysm and inflammation in *Klf6* heterozygous knockout mice. (a) Representative aorta (infrarenal aorta: hash, suprarenal aorta: asterisk) induced by 2 weeks of AngII infusion with CaCl₂ application in wild-type (WT) littermates ($n = 11$) and *Klf6* heterozygous knockout ($Klf6^{+/-}$, $n = 10$) mice. Scale bar, 5 mm. Histopathological analysis of infrarenal (b) and suprarenal aorta (c) by EVG (upper panels, a and c) and haematoxylin/eosin (H&E) staining (lower panels, b and d). Scale bar, 200 μ m. (d) Quantification of infrarenal aortic diameters between WT littermates and *Klf6* heterozygous knockout ($K6^{+/-}$) mice before ((-), $n = 3$) and after 2 weeks of AngII infusion with CaCl₂ application (CaCl₂ + AngII, WT; $n = 10$, $K6^{+/-}$; $n = 8$). * $P < 0.05$, Student's *t*-test. (e) Immunofluorescent staining for macrophages (green: Mac3, blue: DAPI) in boxed area of EVG-stained aorta (b) of WT littermates and *Klf6* heterozygous knockout mice. Scale bar, 30 μ m. (f) Expression of RNA levels of *MMP9*, *F4/80* and *IL-6* in aorta from WT littermates and *Klf6* heterozygous knockout ($K6^{+/-}$) mice before ((-), $n = 3$) and after AngII infusion with CaCl₂ application (CaCl₂ + AngII, $n = 5$) as examined using real-time PCR and normalized by *GAPDH* messenger RNA. * $P < 0.05$, Mann-Whitney test. (g) Inhibitory effect of clodronate liposomes on aortic phenotype ($n = 4$) compared with PBS-liposome-administered mice ($n = 5$) by EVG (left panels, a and b); H&E (middle panels, c and d); and F4/80 staining (right panels, e and f, immunohistochemistry). Scale bar, 200 μ m. (h) Quantification of infrarenal aortic diameters from clodronate-liposome- or PBS-liposome-administered mice (* $P < 0.05$, Student's *t*-test, $n = 4$ or 5 mice per group). Results are from three independent experiments. All values are presented as means \pm s.e.m.