

動脈弾性板の形成・破壊の分子機構とその動脈疾患における役割

《研究の概要》

動脈がただ血液を通すための土管でないといえる重要なポイントは、弾性・伸縮性があることで脈圧を吸収できることである。弾性・伸縮性を担うのは弾性線維という細胞外線維であるが、動脈においては弾性線維が集まって弾性板という構造を作り、さらに弾性板と平滑筋細胞が多層に重なって中膜を形作っている。老化に伴う弾性板の劣化・分解は動脈中膜の硬化と脈圧の上昇を来すだけでなく、大動脈解離（弾性板が突然破断する）や大動脈瘤（弾性板の破壊が主な病理像）を引き起こす。本研究では、弾性線維の形成機構を明らかにしてその再生法を見出すこと、動脈管閉存症・大動脈解離・大動脈瘤といった弾性線維の形成・維持・破壊の異常に基づく疾患の新たな治療標的を見出すことを目的とした。

弾性線維は、ミクロフィブリルという Fibrillin-1、2 のホモポリマー線維にエラスチンタンパク質が沈着し、さらにリシルオキシダーゼという酵素によってエラスチンどうしが架橋されることによってできる。研究代表・中邨は、この一連のプロセスに必要な因子を同定しそれらの機能を明らかにしてきた。これまでに Fibulin-5 と LTBP-4 がエラスチンのミクロフィブリル上への沈着に必須であることを明らかにしたが、新たに LTBP-2 がミクロフィブリルの安定な構造（線維束）形成に必要であることを証明した。また、リシルオキシダーゼの活性に Fibulin-4 が必要であることを見出した。

大動脈や肺動脈には太さに応じて厚い弾性板の層構造があるが、同じく大血管である発生期の動脈管では弾性板がわずかしか形成されない。南沢と横山は、動脈管において弾性板形成を抑制している因子がプロスタグランジン E2 (PGE2) とその受容体 EP4 であること、その下流にはリシルオキシダーゼの取り込みと分解という機構があることを明らかにした。さらに南沢は酸素化刺激も動脈管の弾性線維形成を抑制することを見出した。PGE2 と酸素といった動脈管の機能的閉鎖に重要な因子が細胞外マトリックスの形成調節を通して血管リモデリングにも主要な役割を担っていることが明らかとなった。横山は PGE2-EP4 シグナルが大動脈瘤においてもマトリックスリモデリングに関与しているかどうかを調べた。ヒト大動脈瘤サンプルにおいて PGE2 刺激が MMP などタンパク質分解酵素を増加させること、大動脈瘤モデルマウスにおいて EP4 アンタゴニストが大動脈瘤発症を抑制できることを示した。また新たな大動脈瘤バイオマーカーも発見した。

大動脈解離の良い動物モデルはなかったが、青木はテネイシン C 遺伝子欠損マウスまたはマクロファージ特異的 SOCS3 遺伝子欠損マウスにアンジオテンシン II 負荷をかけると大動脈解離がおこることを発見した。その機序として、マクロファージが Stat3 の働きで細胞外マトリックスを破壊する炎症をおこすこと、テネイシン C は細胞外において炎症とマトリックス分解を抑制していることを明らかにした。

以上の研究で我々は、動脈弾性板を形成する分子機構、弾性線維形成を抑制する生体内のメカニズムという基礎的な研究と大動脈瘤や大動脈解離の発症機構を結びつけ、新たな治療標的分子を同定した。

中邨 智之	関西医科大学医学部 薬理学講座・教授	弾性繊維の形成と再生の分子機構
南沢 享	東京慈恵会医科大学医学部 細胞生理学講座・教授	動脈管における弾性線維形成抑制機構
青木 浩樹	久留米大学医学部 循環器病研究所・教授	大動脈解離の分子機構
横山 詩子	横浜市立大学大学院医学研究科 循環制御医学・准教授	大動脈瘤における血管リモデリング機構

研究報告

I 研究目的

動脈、特に中枢の弾性血管は脈圧を吸収するために伸縮性に富んでいる。その伸縮性は細胞でなく細胞外マトリックスである弾性線維によるものである。動脈において弾性線維は弾性板という厚い板状の構造をとり、弾性板と平滑筋細胞の層が何重にも重なって中膜を形成している。弾性線維のターンオーバーは極めて遅く、加齢に伴って弾性線維が劣化すると動脈は硬化する。さらに弾性板の分解は大動脈瘤の主要病理所見であり、また弾性板の破断は大動脈解離を引き起こすため、弾性板がいかんして作られ、維持され、分解され、再生されるかを知ることはこれら致死率の高い疾患の原因を理解し治療標的を見出すことにつながると期待される。

弾性線維の形成機構は十分理解されておらず、そのためこれまでに弾性繊維を再生する技術は存在しない。弾性繊維はマイクロフィブリル（分泌タンパク質 Fibrillin-1、2 のホモポリマー）にエラスチンタンパク質が沈着し、リシルオキシダーゼによってエラスチンどうしが架橋されてできる。このプロセスには Fibulin-5、LTBP-4 といったマイクロフィブリルに共局在するいくつかのタンパク質が必須のオーガナイザーとして働いていることを研究代表・中邨は明らかにしてきた。本研究では、それらの作用機序を明らかにするとともに、LTBP-4 のファミリー分子 LTBP-2、Fibulin-5 のファミリー分子 Fibulin-4 の役割を研究した。

弾性繊維形成の調節を行う機構は知られていない。大血管でありながら弾性板の形成があまりおこらない動脈管には弾性線維形成を抑制する機構があると考えられるため、共同研究者・南沢は動脈管における弾性線維形成抑制因子の同定を行った。また生体組織工学を用いて血管平滑筋細胞積層化による動脈中膜モデルを作成し、機械的刺激因子、酸素化因子やプロスタノイドなどの液性因子が、弾性線維形成に果たす役割を調べた。

弾性板の破断でおこる大動脈解離は、発症予測は困難で進行を阻止する治療法も確立していない。病態は未解明で適切な動物モデルも存在していなかったが、共同研究者・青木はテネイシン C 遺伝子欠損マウスまたはマクロファージ特異的 SOCS3 遺伝子欠損マウスへのアンジオテンシン II 負荷で大動脈解離が誘発されることを発見した。本研究ではテネイシン C と Jac/Stat 系が連携し細胞外マトリックスのホメオスタシスを抑制するとの仮説を

検証した。

大動脈瘤は致死性の進行性疾患であるにも関わらず、未だにその進行を抑制できる薬物がない。また、大動脈瘤の薬物治療開発を推進するためには、その進行を反映するバイオマーカーも必要とされている。共同研究者・横山らは先行研究で、プロスタグランジン E 受容体である EP4 への刺激が大動脈瘤の進行に関与している可能性をマウスモデルで示した。(Yokoyama U et al., PLoS ONE, 2012)。本研究では、これらの結果を発展させ、患者由来の組織を用いて EP4 シグナルにより分泌されるタンパク質を網羅的に検討することで、EP4 刺激の大動脈瘤進行への関与をヒト組織で検討することで、EP4 拮抗薬を用いた世界初の大動脈瘤の薬物療法の実現を目指す。

以上 4 名はこれまで独自の視点から弾性板の形成・破壊、それらに関わる疾患についての研究を行ってきた。本研究でははじめて 4 名が連携して統合した共同研究を行うことによりシナジー効果が得られることを目指した。

II 研究計画および材料と方法

代表研究者・中邨

1) LTBP-4 の作用機序

LTBP (Latent TGF β -binding protein) ファミリーは、LTBP-2 を除いて TGF β (TGF β のプロドメインである LAP) と結合し、TGF β の作用に必須の役割を果たしていると考えられる。LTBP-4 の遺伝子欠損マウスは弾性線維形成不全を来し、線維芽細胞培養にリコンビナント LTBP-4 を添加すると弾性線維形成が増加する。この作用が TGF β を介したものであるかを明らかにするため、TGF β を含まない LAP だけを LTBP-4 過剰発現細胞に共発現させ、TGF β を含まないリコンビナント LTBP-4 を作成する。

2) LTBP-2 の生体内での作用解明

ミクロフィブリルに共局在する LTBP-2 は、その遺伝子欠損マウスが胎生早期致死であると報告されていた。Ltbp2 遺伝子の exon1 を loxP 配列ではさんだ flox マウスを作成し、コンディショナルノックアウトマウスを解析することにより LTBP-2 の生体内での役割を解明する。

3) 細胞培養で作られる細胞外マトリックスの弾性測定系開発

ヒト線維芽細胞培養で作られた弾性線維の定量は、これまで①抗エラスチン抗体で蛍光免疫染色された線維のイメージング解析 (ArrayScan)、②放射性ラベルされた Valine 存在下で培養して作られた弾性線維 (アルカリ不溶画分) の定量、を行ってきたが、これらは弾性線維の機能を測定しているわけではない。本研究では、細胞培養で作られた弾性線維の力学的特性を測定する方法を開発する。温度によって接着性の変化するセルシード社のプレートを用いて細胞+ECM (細胞外マトリックス) のシートを作成し、シートに載せた磁気ビーズに磁界を加えて動かし、加えた力とレーザー計測したビーズの変位量のグラフから弾性、粘弾性を計算できる装置を作成する。

4) Fibulin-5、LTBP-4 過剰発現マウスの解析

細胞培養にリコンビナント Fibulin-5、LTBP-4 を加えると弾性線維形成が増加する。生体内でこれらを過剰発現したら弾性線維が増えるのかを検討する。Rosa26 locus に CAG promoter-loxP-stuffer-poly A-loxP-cDNA-poly A (cDNA は Fibulin-5 または LTBP-4) を

ノックインしたマウスを作成した。これに全身で CreERT2 (タモキシフェン誘導 Cre) が発現するマウスを掛け合わせ、タモキシフェン投与によって Fibulin-5 または LTBP-4 が過剰発現するマウスを作る。

5) エラスチンの架橋を調節する機構

エラスチンの架橋とコラーゲンの架橋を行う酵素リシルオキシダーゼ (LOX) の重要性はその遺伝子欠損マウスの表現型 (大動脈破裂・横隔膜破裂で周産期致死) から明らかであるが、興味深いことに Fibulin-4 遺伝子欠損マウスも同じ表現型を示す。Fibulin-4 と LOX は直接結合するが、LOX の酵素活性や発現に影響するのかどうかを検討する。

共同研究者・南沢

1) 動脈管が弾性繊維低形成をきたす分子機序の解明

- a. ラット動脈管平滑筋細胞長期培養系を用いたプロスタノイド刺激によるエラスチン架橋形成及び Matrix metalloproteinase 発現への影響を評価した。ラット動脈管平滑筋細胞長期培養系を用いて、プロスタグランジン E₂ (PGE₂) とその受容体 EP4 を介したシグナルによってエラスチン架橋酵素リシルオキシダーゼの分解が促進される分子機序を調べた。
- b. 弾性繊維の異形成・低形成と動脈管閉存症を高率に発症する BN ラットにおける弾性繊維低形成、動脈管閉存症原因遺伝子の同定を行った。
- c. 酵素化が弾性繊維形成に及ぼす影響を調べるため、ラット平滑筋培養細胞に対し、分泌されるタンパク質を LC/MS-MS 法によって網羅的に分析を定量的に評価した。
- d. 母胎感染が動脈管弾性繊維形成に及ぼす影響を調べるため、妊娠ラットにリポポリサッカライドを投与し母胎感染症を生じたときの動脈管の機能的及び解剖学的閉鎖に及ぼす影響を観察した。

2) 機械的刺激が弾性繊維形成に及ぼす影響

- a. ラット平滑筋培養細胞に対し、ストレックス社製伸展装置による伸展刺激を加え、弾性繊維形成への影響を定量的に評価した。
- b. 横山らの研究に参画し、ラット平滑筋細胞を積層化することにより三次元構造を構築し、弾性繊維形成を評価した。

共同研究者・青木

1) 遺伝子改変マウス: テネイン C (Tnc) の役割を検討するために Tnc ノックアウトマウス (Tnc-KO) を用いた。マクロファージおよび平滑筋細胞における JAK/STAT 系の役割を明らかにするために、それぞれの細胞種特異的な Socs3 ノックアウトマウス (mSocs3-KO および smSocs3-KO) を用いた。Socs3 は JAK/Stat 系の内因性ネガティブフィードバック因子であり、そのノックアウトにより細胞種特異的な JAK/Stat 系の活性亢進状態を作り出すことができる。

2) 大動脈ストレスモデル: マウス腹部大動脈周囲に 0.5M 塩化カルシウムを塗布することで炎症を惹起し線維性硬化を引き起こした。ここにアンジオテンシン II (Ang II, 1 μg/kg/min) を持続投与することで、血行動態および液性因子ストレスを加えた。

3) 大動脈解離モデル: コラーゲン/エラスチン架橋酵素阻害薬 β アミノプロピオニトリル (BAPN, 150mg/kg/day) とアンジオテンシン II を持続投与することで大動脈解離モデルを

作成した。(BAPN+Ang II モデル)

共同研究者・横山

1) ヒト大動脈瘤組織における PGE2-EP4 の役割の検討

患者由来の大動脈瘤組織（腹部大動脈瘤患者 11 名）を器官培養し、その上清中の蛋白について nanoLC/MS/MS で網羅的解析を行った。iTRAQ ラベル法で分泌蛋白量を比較検討した。

2) 腹部大動脈瘤のバイオマーカーの探索

腹部大動脈瘤患者、年齢を合わせた健常者各 30 名より血液サンプルを採取し、I. によって得られたバイオマーカー候補の検討を行った。また、青木らの協力を得て大動脈瘤に対してステント治療を行った患者約 40 名の時間経過を 1 年追った血清サンプルでもバイオマーカー候補の検討を行った。これらの研究は倫理委員会の承認（承認番号 B090312005）のもと行われた。

3) マウス大動脈瘤モデルにおける EP4 シグナルの大動脈瘤への作用の検討

ApoE 欠損マウスにアンジオテンシン II を 4 週間負荷して作製した大動脈瘤に EP4 アンタゴニスト 2 種類 (ONO-AE3-208, CJ042794) を 4 週間投与し、大動脈瘤の形成と弾性線維の断裂を組織学的、生化学的（ザイモグラフィ）に検討した。また、平滑筋特異的に EP4 を過大発現したマウス (Cre-SM22×LoxP-EP4) を作製し、アンジオテンシン II の負荷により大動脈瘤が発症するかを検討した。さらにこれらマウス大動脈瘤を FACS を用いて解析し、免疫担当細胞の活性化を検討した。

III 研究成果

代表研究者・中邨

1) LTBP-4 の作用機序

LTBP-4 を siRNA でノックダウンしたヒト皮膚線維芽細胞培養にリコンビナント LTBP-4、および TGF β を含まない LTBP-4 (LTBP-4-eLAP) を添加したところ、同程度の弾性線維形成促進作用があることを見出した。すなわち、LTBP-4 の弾性線維形成促進作用は、TGF β に非依存的であるといえる。Fibulin-5 はエラスチンをマイクロフィブリル上にリクルートする分子であることを以前に報告したが、その作用は LTBP-4 に依存することがわかった。LTBP-4 の非存在下では Fibulin-5 はマイクロフィブリル上に線維状に沈着できず、リコンビナント Fibulin-5 を加えても塊状の沈着にしかならなかった。逆に LTBP-4 の線維状沈着に Fibulin-5 は不要であった。

2) LTBP-2 の生体内での作用解明

Ltbp2flox マウスからまず全身で LTBP-2 を欠損するマウスと作成したところ、既報とは異なって正常に生まれ発育した。ヒトで LTBP2 遺伝子のホモ欠損患者が高眼圧緑内障と水晶体脱臼を来すという報告が相次いだため、Ltbp2 遺伝子欠損マウスの眼を調べたところ、毛様小帯が壊れていることがわかった。毛様小帯はエラスチンの沈着がないマイクロフィブリルの線維束であることが知られており、LTBP-2 はマイクロフィブリル線維束の安定的な構造を作るために必須であることが明らかとなった。

3) 細胞培養で作られる細胞外マトリックスの弾性測定系開発

関西医科大学物理学教室・影島教授との共同研究により、図 1 のような細胞外マトリック

スシートの力学的特性を測定する装置を開発した。ヒト皮膚線維芽細胞の作る細胞外マトリックスシートで実験をはじめたが、シートが薄くて穴が空くことが多く、より弾性線維を含む細胞外マトリックスを多く作る大動脈平滑筋細胞（マウス）を用いて実験を続けている。

4) Fibulin-5、LTBP-4 過剰発現マウスの解析

Fibulin-5 過剰発現マウスは、stuffer に用いた hrGFP II の毒性のためか弱く、メスが死んでしまうことがわかった。現在 stuffer を stop コドン×3 フレームだけにしたマウスを作成し直して実験中である。

LTBP-4 過剰発現マウスは stuffer を stop コドンだけにしたためそのようなトラブルはなく、全身で過剰発現させることができた。このマウスの弾性線維の過形成などはみられず、正常に成長した。

5) エラスチンの架橋を調節する機構

Fibulin-4 遺伝子欠損マウス、LOX 遺伝子欠損マウスの大動脈はいずれもエラスチン架橋アミノ酸（デスモシン）、コラーゲン架橋アミノ酸（ピリジノリン）が大幅に減少していた。Fibulin-4 遺伝子欠損マウスの作る LOX を詳しく調べたところ、SDS-PAGE での流れ方がやや遅いこと、酵素活性の大半を失っていることがわかった。すなわち、Fibulin-4 は LOX の酵素活性そのものに必要である。

共同研究者・南沢

1) 動脈管が弾性線維低形成をきたす分子機序の解明

a. 胎生期にのみ機能する動脈管は、大血管に属しながら弾性線維の低形成が認められるが、動脈管が弾性線維低形成を来す原理については、長らく不明であった。我々は、PGE₂ とその受容体 EP4 を介したシグナルによって、エラスチン架橋形成を司るリシルオキシダーゼが、細胞外から細胞内にクラスリン依存的なエンドサイトーシス促進によって取り込まれ、リソソームにおいて分解が促進されることを見出した。そのためにリシルオキシダーゼが減少し、弾性線維形成が阻害されることを明らかにした。このことは PGE₂-EP4 シグナルが、動脈管拡張という機能的役割以外に、血管組織構造の変化をもたらし、動脈管の解剖学的閉鎖に対して促進的な役割を担うことを示した点で極めて重要な発見であった。本研究は中邨、青木、横山との共同研究によってなされた（図 2）。

b. 弾性線維の異形成・低形成と動脈官開存症を高率に発症する BN ラットにおいて、BN ラット動脈管では、EP4 遺伝子の発現が低下していた。さらにテネイシン N の顕著な発現

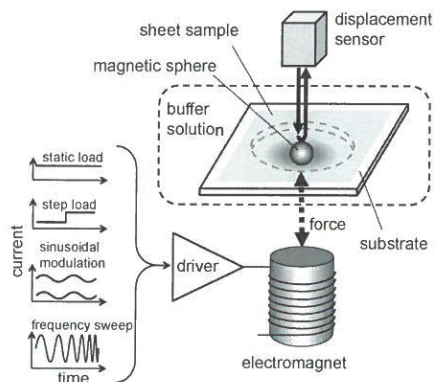


図 1. 細胞外マトリックスシートの力学的特性を測定する装置。

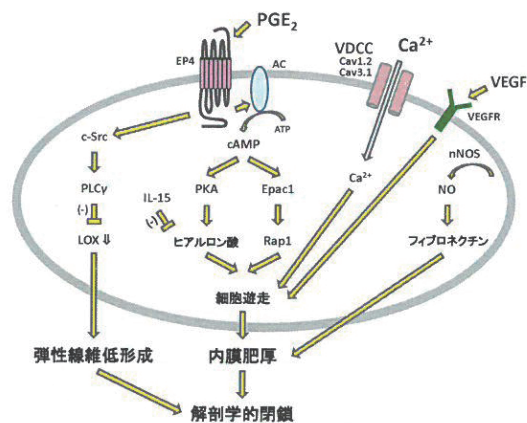


図 2. PGE₂ が動脈管の弾性線維形成を抑制する仕組み。

低など、これまで動脈管ではあまり働きが知られていなかった遺伝子の発現変化を捕まえることができた。

c. ラット動脈管平滑筋培養細胞において、低酸素から通常酸素濃度に戻したときにエラスチン分泌が低下することを見出した。

d. リポポリサッカライドを投与された妊娠ラットでは全例絨毛膜炎を発症し、新生仔の動脈管閉鎖が遅延した。しかし、弾性線維や内膜肥厚などの血管リモデリングには影響を及ぼさなかった。

2) 機械的的刺激・酸素化が弾性線維形成に及ぼす影響

a. ラット平滑筋培養細胞を使って、10%、15%の周期的伸展刺激を加えたときの弾性線維形成、及び弾性線維関連遺伝子の発現変化を定量的に評価した。10%伸展刺激においては、弾性線維形成が促進するが、15%伸展刺激では膠原線維の形成が促進することを見出した。

b. ラット平滑筋細胞を7層まで積層化した三次元構造を構築することによって、弾性線維の形成を評価することが可能になった。

共同研究者・青木

1) テネイシンCの役割

大動脈ストレスモデルを作成すると、腎動脈分岐部より近位の大動脈の脈派立ち上がり速度が増加しており、血行動態的負荷の亢進が示された。血行動態的負荷が亢進した部位に一致してTnc発現が亢進したことから、Tncがストレス応答分子であることが示された。Tnc-KOで大動脈ストレスモデルを作成すると、野生型では認められない腎動脈上の大動脈解離を発症した。Tnc-KOでは、解離発症前の腎動脈上大動脈でIL-6を始めとする炎症性サイトカインの発現とSTAT3活性が亢進し、細胞外マトリックス分子の発現が低下していた。過剰な炎症応答と細胞外マトリックス合成不全がTnc-KOにおける解離病態の重要な原因であることが示唆された。

2) マクロファージStat3の役割

マクロファージが特異的にStat3活性が亢進するマクロファージ特異的Socs3ノックアウト(mSocs3-KO)で大動脈ストレスモデルを作成したところ、6週間までに野生型では認めない腎動脈上の大動脈解離を発症した。大動脈ストレスモデル作成1週間後の大動脈を詳細に観察したところ、野生型、mSocs3-KOともに腹腔動脈あるいは上腸間膜動脈分岐部に顕微鏡的大動脈障害(約0.2ミリの中膜断裂)を認め、遺伝子型により頻度に差はなかった。しかし、この時点でマクロファージのStat3活性はmSocs3-KOで高く、機能的分化は炎症促進性のM1に傾いていた。同時にmSocs3-KOでは平滑筋細胞の分化マーカーおよび細胞外マトリックス分子の発現低下を認めた。

大動脈ストレスは顕微鏡的大動脈障害を起こしマクロファージ浸潤を引き起こす。このマクロファージにおけるStat3活性が適切に保たれれば大動脈障害は修復されるが、Stat3活性が過剰になると平滑筋機能異常と細胞外マトリックス代謝低下が起り、解離発症に至ると考えられた。

3) 平滑筋Stat3の役割

Tnc-KOにおけるStat3活性化は炎症細胞とともに血管平滑筋細胞でも観察された。その

意義を明らかにするために平滑筋特異的 Socs-KO (smSocs3-KO) を用いた。smSocs3-KO で BAPN+Ang II による解離モデルを作成したところ野生型と比較して解離が軽症であった。smSocs3-KO では大動脈外膜の細胞外マトリックス沈着が野生型より多く、それに応じて大動脈の引っ張り強度も smSocs3-KO の方が野生型より高かった。以上より、平滑筋細胞の Stat3 活性化は細胞外マトリックス増加を介して大動脈壁強度を増加させ、大動脈解離刺激に対して保護的に働くことが示された。

共同研究者・横山

1) ヒト大動脈瘤組織における PGE₂-EP4 の役割の検討

腹部大動脈瘤患者 11 名からの血管壁 (中膜組織) を器官培養し、分泌蛋白を質量分析にて解析したところ、PGE₂ または EP4 アゴニスト刺激により大動脈瘤血管壁で分泌が亢進し、かつ EP4 アンタゴニストにより産生が抑制される傾向のある蛋白として、血管弾性線維を分解する MMP-9 や Cathepsin B をはじめとする 7 種類の蛋白が同定された。

2) 大動脈瘤バイオマーカー候補の探索

1) の解析で腹部大動脈瘤に多く分泌される蛋白としてさらに 15 種類を選定し、これら大動脈瘤バイオマーカーの候補蛋白として検討した。腹部大動脈瘤患者と健常者の血液サンプルを用いて検討した結果、ミオシン重鎖 11 蛋白濃度が、腹部大動脈瘤患者の血漿で市販健常者血漿に比べて有意に高く、また、ステント治療で動脈瘤が縮小した患者ではその血中濃度が有意に低下することが明らかとなった。腹部大動脈瘤の疾患活動性を検出するマーカーとして特許申請を完了した。(非解離性大動脈瘤の疾患活動性の判定方法特願 2015-105191 出願日 2015 年 5 月 25 日)

3) EP4 アンタゴニストの大動脈瘤治療効果の検討

また、ApoE 欠損マウスにアンジオテンシン II を 4 週間投与して作製した大動脈瘤モデルに、EP4 アンタゴニストを 4 週間経口投与し大動脈瘤に対する治療効果を検討した。腹部大動脈のパラフィン切片をエラスチン染色によるエラスチングレードで判定したところ、EP4 アンタゴニスト投与群で有意に弾性線維の形成が有意に回復していた (図 3、n=6-12, p<0.01)。また弾性線維を架橋する酵素であるリシルオキシダーゼの発現も対照群に比べて 1.5 倍に回復していた。さらに MMP2、MMP9 ともに発現が対照群に比べて有意に低下していた。これらの結果より、進行した大動脈瘤に対しても EP4 アンタゴニストが一定の治療効果を挙げることが明らかとなった。EP4 の役割をさらに検討するために、平滑筋特異的 EP4 過剰発現マウスにアンジオテンシンを投与したところ、大動脈瘤に伴い全例が約 2 週間で死亡した (図 4)。動脈瘤形成以前に、著明な炎症性単球と好中球の浸潤を認めたことから、血管平滑筋細胞の EP4 は血管の炎症を増幅することが示唆された。また、この大動脈瘤は EP4 アンタゴニストで抑制された。

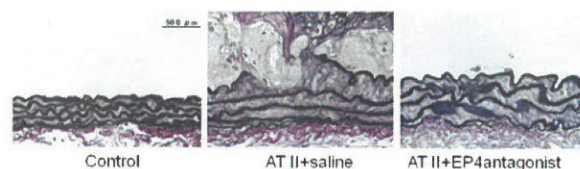


図 3. マウス大動脈瘤モデルにおける EP4 アンタゴニストの予防効果。

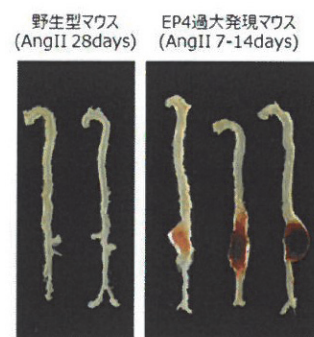
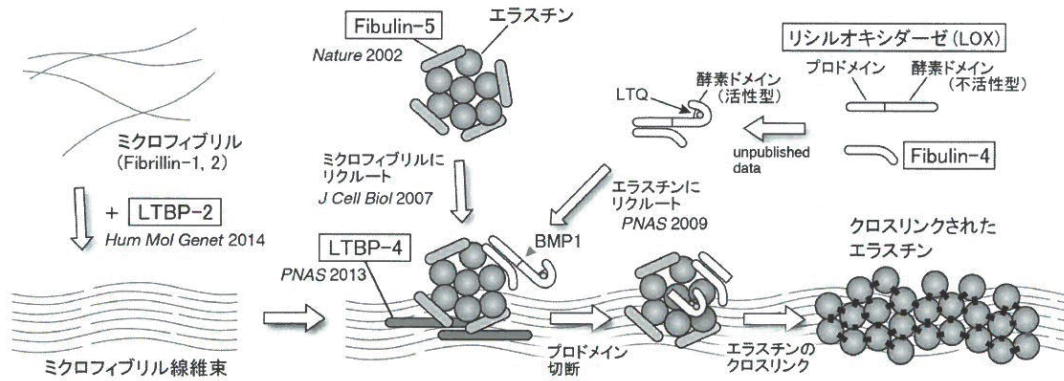


図 4. EP4 過剰発現は大動脈瘤を誘発する。

IV 考察

研究代表・中邨の研究からは、LTBP-4を増やすことが単純に弾性線維過形成をもたらすわけではなく、弾性線維の量を制限する機構があることが伺われた。また、マイクロフィブリル線維束を作るためにLTBP-2、エラスチンをマイクロフィブリルに沈着させるためにFibulin-5とLTBP-4、リシルオキシダーゼを活性化して基質であるエラスチンまでリクルートするためにFibulin-4がそれぞれ必要であることがわかってきた(図5)。



これら「弾性線維形成因子」のいずれかが不足することが弾性線維の再生を妨げているのであれば、そのタンパク質を補充することにより弾性線維の再生が可能となるかもしれない。

共同研究者・南沢の研究によって、PGE₂-EP4シグナル伝達経路は動脈管の弾性線維形成を抑制し、内弾性板断裂を促進することが明らかとなった。南沢からは同じシグナル伝達経路が内膜肥厚を促進させることを報告しているが、合わせて動脈管の解剖学的閉鎖を促す作用があると考えられる。さらに、PGE₂-EP4シグナル以外に弾性線維の形成に影響を及ぼす因子を検討したところ、酸素化によって動脈管平滑筋細胞から分泌されるエラスチンが減少することを見出した。この結果は、出生後の血中酸素濃度の上昇により、動脈管の弾性線維形成を抑制することを示唆する。PGE₂や酸素など、動脈管の機能的閉鎖に大きな影響を及ぼす因子が血管リモデリングにも重要な役割を担っているという点は極めて興味深く、重要である。動脈管を閉鎖させたり開存させたりするために非選択的COX阻害剤やPGE₁製剤が使われているが、今後動脈管リモデリングに作用する治療法が開発されることに期待したい。

共同研究者・青木の研究は、分泌タンパク質テネイシンCの細胞外マトリックス安定化効果をはじめ明らかにした。テネイシンCは過剰な炎症応答を抑制し細胞外マトリックス合成を維持することで大動脈壁を保護している。炎症応答によりマクロファージで活性化したStat3はマクロファージのM1分化を促進し、さらなる炎症応答の亢進と平滑筋細胞機能の抑制を介して解離を促進する。一方、平滑筋細胞で活性化したStat3は細胞外マトリックスの増加を介

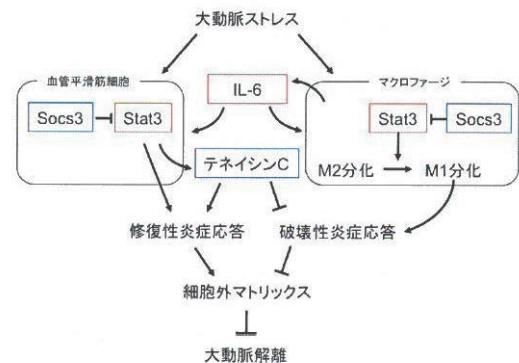


図6. 青木の研究から得られた大動脈解離の病態仮説

して大動脈壁を強化し解離発症から大動脈を保護する。本研究から、炎症細胞と平滑筋細胞が液性因子を介して炎症応答と細胞外マトリックス代謝のバランスを制御しており、その破綻が大動脈解離の発症を招くことが明らかとなった（図 6）。

共同研究者・横山のヒト腹部大動脈瘤サンプルを用いた解析により、PGE₂-EP4 シグナルが疾患の進行に関与している可能性が極めて高いことが確認できた。また、腹部大動脈瘤の患者組織から分泌される蛋白の質量分析により腹部大動脈瘤の活動性を判定するバイオマーカー同定した。また、マウスモデルにより EP4 アンタゴニストの大動脈瘤治療効果が期待できる結果を得られた。これらの成果により、EP4 の抑制が大動脈瘤の初の薬物治療となる可能性が示唆された。

V 研究成果の発表

代表研究者・中邨

1. Nakasaki M, Hwang Y, Xie Y, Kanaria S, Gund R, Hajam EY, Samuel R, George R, Danda D, MJP, **Nakamura T**, Shen Z, Briggs S, Varghese S, Jamora C: The matrix protein Fibulin-5 is at the interface of tissue stiffness and inflammation in fibrosis. *Nat Commun* 6:8574, 2015.
2. Noda K, **Nakamura T**, Komatsu Y: Fibulin-5 deficiency causes developmental defect of premaxillary bone in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 466:585-91, 2015.
3. Aya R, Ishiko T, Noda K, Yamawaki S, Sakamoto Y, Tomihata K, Katayama Y, Yoshikawa K, Kubota H, **Nakamura T**, Naitoh M, Suzuki S,: Regeneration of elastic fibers by three-dimensional culture on a collagen scaffold and the addition of latent TGF- β binding protein 4 to improve elastic matrix deposition. *Biomaterials* 72:29-37, 2015.
4. Fanhchaksai K, Okada F, Nagai N, Pothacharoen P, Kongtawelert P, Hatano S, Makino S, **Nakamura T**, Watanabe H: Host stromal versican is essential for cancer-associated fibroblast function to inhibit cancer growth, *Int J Cancer* 138:630-41, 2016.
5. Bultman-Mellin I, Conradi A, Maul AC, Dinger K, Wempe F, Wohl AP, Imhof T, Wunderlich FT, Bunck AC, **Nakamura T**, Koli K, Bloch W, Ghanem A, Heinz A, von Melchner H, Sengle G, Sterner-Kock A: Modeling autosomal recessive cutis laxa type IC (ARCLIC) in mice reveals distinct functions of Ltbp-4 isoforms. *Dis Model Mech* 8:403-415, 2015.
6. Endo T, Nakamura J, Sato Y, Asada M, Yamada R, Takase M, Takaori K, Oguchi A, Iguchi T, Higashi AY, Ohbayashi T, **Nakamura T**, Muso E, Kimura T, Yanagita M. Exploring the origin and limitations of kidney regeneration. *J Pathol* 236:251-263, 2015.
7. Inoue T, Ohbayashi T, Fujikawa Y, Yoshida H, Akama TO, Noda K, Horiguchi M, Kameyama K, Hata Y, Takahashi K, Kusumoto K, **Nakamura T***: Latent TGF β binding protein-2 is essential for the development of ciliary zonule microfibrils.

- Hum Mol Genet* 23:5672-82, 2014.
8. Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y, Nakao T, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Nakazeki F, Ide Y, Koyama S, Sowa N, Yahagi N, Shimano H, **Nakamura T**, Hasegawa K, Kume N, Yokode M, Kita T, Kimura T, Ono K: MicroRNA-33b Knock-in mice for an intron of sterol regulatory element-binding factor 1 (Srebf1) exhibit reduced HDL-C in vivo, *Sci Rep* 4:5312, 2014.
 9. Yokoyama U, Minamisawa S, Shioda A, Ishiwata R, Jin MH, Masuda M, Asou T, Sugimoto Y, Aoki H, **Nakamura T**, Ishikawa Y: Prostaglandin E2 Inhibits elastogenesis in the ductus arteriosus via EP4 signaling. *Circulation* 129:487-96, 2014.
 10. Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y, Nakao T, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Sowa N, Yahagi N, Shimano H, Matsumura S, Inoue K, Marusawa H, **Nakamura T**, Hasegawa K, Kume N, Yokode M, Kita t, KImura T, Ono K: MicroRNA-33 regulates sterol regulatory element-binding protein 1 expression in mice. *Nat Commun* 4:2883, 2013.
 11. Noda K, Dabovic B, Takagi K, Inoue T, Horiguchi M, Hirai M, Fujikawa Y, Akama TO, Kusumoto K, Zilberberg L, Sakai LY, Koli K, Naitoh M, von Melchner H, Suzuki S, Rifkin DB, **Nakamura T*** :Latent TGF β binding protein 4 promotes elastic fiber assembly by interacting with fiblin-5, *Proc Natl Acad Sci USA* 110:2852-7, 2013.

共同研究者・南沢

1. Kajimura I, Akaie T, **Minamisawa S***. Lipopolysaccharide delays closure of the rat ductus arteriosus by induction of inducible nitric oxide synthase but not prostaglandin E₂. *Circ j.* 80(3):703-11, 2016.
2. **南沢享** : 動脈管閉鎖の分子機序解明にむけて、日本小児循環器学会雑誌 32(1) : 2-8, 2016.
3. Kawakami S, **Minamisawa S**, Oxygenation decreases elastin secretion from rat ductus arteriosus smooth muscle cells. *Ped Int* 57(4):541-5. 2015.
4. Yokoyama U, **Minamisawa S**, Shioda A, Ishiwata R, Jin MH, Masuda M, Asou T, Sugimoto Y, Aoki H, Namamura T, Ishikawa Y, Prostaglandin E2 inhibits elastogenesis in the ductus arteriosus via EP4 signaling. *Circulation* 129(4):487-96, 2014.
5. Akaike T, **Minamisawa S**, Rote of ion channels in ductus arteriosus closure. *Human Genet Embryo* 13:116, 2014.
6. Ishiwata R, Yokoyama U, Matsusaki M, Asano Y, Kadowaki K, Ichikawa Y, Umemura M, Fujita T, **Minamisawa S**, Shimoda H, Akashi M, Ishikawa Y, Three-dimensional Multilayers of smooth muscle cells as a new experimental model for vascular elastic fiber formation studies atherosclerosis. *Atherosclerosis* 223(2):590-600. 2014.

7. Hsieh YT, Liu NM, Ohmori E, Yokota T, Kajimura I, Akaike T, Ohshima T, Goda N, **Minamisawa S**, Transcription profiles of the ductus arteriosus in Brown-Norway rat with irregular elastic fiber formation, *Circ J* 78(5):1224-33, 2014.
8. Yokota T, Shiraishi R, Aida T, Iwaki K, Liu NM, Yokoyama U, **Minamisawa S**, Thromboxane A₂ receptor stimulation promotes closure of the rat ductus arteriosus through enhancing neointima formation. *PLoS One* 9(4): e94895, 2014.
9. Aoki R, Yokoyama U, Ichikawa Y, Taguri M, Kumagaya S, Ishiwata R, Yanai C, Fujita S, Umemura M, Fujita T, Okumura S, Sato M, **Minamisawa S**, Asou T, Masuda M, Iwasaki S, arteriosus constriction. *Cardiovasc Res* 104(2):326-36, 2014.
10. Liu NM, Yokota T, Maekawa S, Lu P, Tei I, Taniguchi H, Yokoyama U, Kato T, **Minamisawa S**, Transcription Profiles of Endothelial Cells in the Rat Ductus Arteriosus during a Perinatal Period. *PLoS One*. 8(9): e73685, 2013.

共同研究者・青木

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. *Int J Mol Sci* 2015 May 18;16(5):11213-28.
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* 2015 Jan;35(1):127-36.
3. 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* 2015 Apr 29; 6: 6994.
4. Yokoyama U, Minamisawa S, Shioda A, Ishiwata R, Jin MH, Masuda M, Asou T, Sugimoto Y, **Aoki H**, Nakamura T, Ishikawa Y: Prostaglandin E2 inhibits elastogenesis in the ductus arteriosus via EP4 signaling. *Circulation* 129:487-96, 2014.
5. Kimura T, Shiraisi K, Furusyo A, Ito S, Hirakata S, Nishida N, Yoshimura K, Imanaka-Yoshida K, Yosida 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. *Sci Rep* 2014 Feb 11; 4: 4051.
6. 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 Int* 2015 Jan;87(1):128-36.

共同研究者・横山

1. Kato Y, **Yokoyama U***, Yanai C, Ishige R, Kurotaki D, Umemura M, Fujita T, Kubota T, Okumura S, Sata M, Tamura T, Ishikawa Y, Epacl deficiency attenuated vascular smooth muscle cell migration and neointimal formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35(12):2617-25, 2015.
2. **Yokoyama U**, Prostaglandin E-mediated molecular mechanisms driving remodeling of the ductus arteriosus. *Pediatr Int.* 57(5):820-7, 2015.
3. **Yokoyama U**, Minamisawa S, Shioda A, Ishiwata R, Jin MH, 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(4):487-96, 2014.
4. Ishiwata R, **Yokoyama U***, Matsusaki M, Asano Y, Kadowaki K, Ichikawa Y, Umemura M, Fujita T, Minamisawa S, Shimoda H, Akashi M, and Ishikawa Y. Three-Dimensional Multilayers of Smooth Muscle Cells as a New Experimental Model for Vascular Elastic Fiber Formation Studies. *Atherosclerosis* 233(2):590-600, 2014.
5. **Yokoyama U**, Iwatsubo K, Umemura M, Fujita T, Ishikawa Y, The prostanoid EP4 receptor and its signaling pathway. *Pharmacol Rev* 65(3):1010-52, 2013.

[Book chapter]

1. **Yokoyama U**, Ishikawa Y., Reconstruction of elastic fibers in three-dimensional smooth muscle cells. *corresponding author *Engineered Cell manipulation for Biomedical Application*. Editors: Akashi M, Akagi T, Matsuzaki M, ISBN 978-4-431-55139-3, p159-174, 2014, Springer
2. **Yokoyama U**, Ishiwata R, Ishikawa Y, Eicosanoids and Aortic Aneurysm. Bioactive Lipid Mediators. *Current Reviews and Protocols*. Editors: Yokomizo T, Murakami M. ISBN 978-4-431-55669-5, p267-278, 2015, Springer

[和文総説]

1. **横山詩子**「動脈硬化・動脈瘤病態形成におけるプロスタグランジン E2 の役割 (The role of prostaglandin E2 in atherosclerosis and aortic aneurysm)」*血栓と循環メディカルレビュー*社 21(3), p29-33, 2013
2. **横山詩子**、金美花、石川義弘「動脈瘤と PGE₂」*遺伝子医学 MOOK* メディカルドゥ社 2013 年 24 号 p. 296-300
3. **横山詩子**「動脈管閉鎖の分子メカニズムと新たな薬物療法の可能性」*小児科* 55(1), 11-20, 2014 金原出版