

Title	血管細胞老化による急性大動脈解離の発症機構の解明
Sub Title	The role of cellular senescence on the pathogenesis of acute aortic dissection
Author	清水, 良子(Shimizu, Ryōko) 槇野, 香奈子(Makino, Kanako) 下田, 将之(Shimoda, Masayuki) 廣田, 泰(Hirota, Yasushi) 安井, 正人(Yasui, Masato)
Publisher	
Publication year	2020
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2019.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>急性大動脈解離 (AAD) は致死率の高い循環器救急疾患であり、加齢が危険因子として知られるが、詳細な発症機序の研究は進んでいない。我々はこれまでの研究で100%の確率でAADを発症する新たなマウスモデルを確立した。この病理学的解析では解離血管で細胞老化の代表的マーカーの発現亢進及び細胞老化に溶く直的な向炎症性表現型とJAK2リン酸化亢進が見られた。遺伝学的細胞老化阻害モデル、細胞老化阻害剤投与モデル、JAK阻害剤投与モデルにAADを作成するといずれもAAD発症率は低下し特にp21欠損マウスで顕著だった。以上からp21を中心として細胞老化とそのシグナルが大動脈解離発症に関与する可能性が示唆された。</p> <p>Acute aortic dissection (AAD) is a critical acute vascular disease with high mortality rate, but its pathogenesis remains unknown. We established a novel mouse model and we found the upregulation of representative senescence markers and the secretion of pro-inflammatory cytokines together with JAK2 phosphorylation coinciding senescence-associated secretory phenotype. We tested AAD incidence using senescence key molecule deleted mice, senolytics treated mice, and JAK inhibitor treated mice. All the mice showed significant decrease in AAD incidence, especially p21 knockout mice. P21-mediated senescence and the following JAK signaling might be involved in the pathogenesis of AAD.</p>
Notes	研究種目：基盤研究 (C) (一般) 研究期間：2016～2019 課題番号：16K10668 研究分野：内科学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16K10668seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10668

研究課題名(和文)血管細胞老化による急性大動脈解離の発症機構の解明

研究課題名(英文) the role of cellular senescence on the pathogenesis of acute aortic dissection

研究代表者

清水 良子 (SHIMIZU-HIROTA, Ryoko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：30348643

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：急性大動脈解離(AAD)は致死率の高い循環器救急疾患であり、加齢が危険因子として知られるが、詳細な発症機序の研究は進んでいない。我々はこれまでの研究で100%の確率でAADを発症する新たなマウスモデルを確立した。この病理学的解析では解離血管で細胞老化の代表的マーカーの発現亢進及び細胞老化に溶く直的な向炎症性表現型とJAK2リン酸化亢進が見られた。遺伝学的細胞老化阻害モデル、細胞老化阻害剤投与モデル、JAK阻害剤投与モデルにAADを作成するといずれもAAD発症率は低下し特にp21欠損マウスで顕著だった。以上からp21を中心として細胞老化とそのシグナルが大動脈解離発症に関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性大動脈解離(AAD)は致死率の高い循環器救急疾患であるが、発症機序の研究が進んでおらず、治療も外科的治療が主体である。我々の研究により発症に係る鍵因子とシグナル経路が明らかになり、マウスモデルでは既に別用途で臨床使用されている薬剤も解離発症抑制に効果的であることが示された。将来的にこは、p21をターゲットとした遺伝子治療やJAK阻害剤、細胞老化阻害剤を用いた大動脈解離の薬物治療に臨床応用するところまで発展させられる可能性があり、本研究の社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Acute aortic dissection(AAD) is a critical acute vascular disease with high mortality rate, but its pathogenesis remains unknown. We established a novel mouse model and we found the upregulation of representative senescence markers and the secretion of pro-inflammatory cytokines together with JAK2 phosphorylation coinciding senescence-associated secretory phenotype. We tested AAD incidence using senescence key molecule deleted mice, senolytics treated mice, and JAK inhibitor treated mice. All the mice showed significant decrease in AAD incidence, especially p21 knockout mice. P21-mediated senescence and the following JAK signaling might be involved in the pathogenesis of AAD.

研究分野：内科学

キーワード：細胞老化 大動脈解離

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

急性大動脈解離 (AAD) は生活習慣病に伴う血管障害の進行した形であり致死率の高い疾患である。大動脈解離はこれまで適切な実験モデルがなかったことから、発症機序の研究が進んでおらず、したがって治療も外科的治療が主体で薬物治療が困難な疾患といえる。本研究者は、最近の研究によって、大動脈壁を構築するコラーゲンの架橋を行うリシルオキシダーゼの阻害剤である BAPN を投与して慢性大動脈瘤を作成したのち、ヒト AAD 患者血中で上昇していたアンジオテンシン II を投与することで投与後 12 時間以内に 100% の確率で解離を発症させることができる AAD マウスモデルを新規に確立した (Kurihara, Shimizu-Hirota, et al. *Circulation* 2012)。このモデルを使って、本研究者は AAD の発症進展には血管壁の炎症により白血球が遊走接着し、MMP9 を放出することが重要であることを見出した。しかしながら、どのような状況でこの血管壁の炎症からくる白血球の接着と MMP 上昇が起こるのかは不明である。

現在知られている大動脈解離のリスクファクターの一つに年齢が挙げられるが、細胞レベルでの老化 (cellular senescence) により白血球接着因子や MMP の発現上昇、IL-6 などの炎症性サイトカイン分泌といった炎症性表現型の誘導 (senescence-associated secretory phenotype; SASP) が起こることが報告されている (Coppe, JP, et al. *PLoS Biol* 2008, *PLoS One* 2010)。生活習慣病における慢性血管病変では血管内膜に細胞老化を起こした血管平滑筋細胞や血管内皮細胞が存在することは知られているが、この血管細胞老化と大動脈瘤形成後の急性変化である大動脈解離発症との関連は未だ不明である。また細胞老化のシグナリングには p53 - p21 経路や、p16 - Rb 経路が関与することが知られているが (Miyachi H, et al. *EMBO J* 2004; Minamoto T, et al. *Nat Med* 2009; Hirota et al. *J Clin Invest* 2010; Hirota Y, et al. *PNAS* 2011)、血管病変における細胞老化シグナルについては詳細ははまだ不明である。

これらから考えあわせると、大動脈解離血管中膜での細胞老化が解離発症機序として関与するかどうか、さらに細胞老化による炎症性表現型の誘導にいたるシグナリング経路が何か、という点を明らかにすることができれば、大動脈解離に対する新規薬物療法の確立につながる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、我々が確立したマウス AAD モデルを用いた動物実験およびマウスから採取した初代血管平滑筋細胞を用いた細胞実験の両方を行い、大動脈解離の発症に細胞老化が関与するかどうか、さらには細胞老化による炎症性表現型の誘導に至るシグナリング経路としての候補を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 大動脈解離マウスモデル

3 週齢のマウスに 1mg/kg/day の容量でリシルオキシダーゼ阻害剤である アミノプロピロオニトリル (BAPN) を 3 週間飲水投与した後にアンジオテンシン II (AngII) を浸透圧ポンプを使って皮下にうめこみ投与する。AngII 投与後 12 時間でマウスを屠殺し、大動脈組織を採取する。用いるマウスとしては、野生型 C57/BL6J マウスおよび p21 ノックアウトマウス、p16 ノックアウトマウス、p21/p16 ダブルノックアウトマウスを用いる。一部のマウスには、senolytic drug としてダサチニブ (mg/g/W) + ケルセチン (mg/g/W) を経管投与した。また一部のマウスには JAK2 阻害剤であるルキシソリチニブ (mg/g/day) を経口投与した。

(2) 組織染色

マウスから採取した大動脈組織は凍結処理または 4 %PFA 固定を行い、凍結切片またはパラフィン切片を作成する。パラフィン切片は HE 染色を行って大動脈解離の有無を確認するとともに、抗 p53, 21, 16, H2X 抗体を用いて免疫染色を行う。凍結切片は pH5 の条件下で α -ガラクトシダーゼ活性を染色する (senescence-associated galactosidase staining, SA-gal 染色)。

(3) 組織実験

各種マウスから採取した大動脈組織から RNA および蛋白を採取する。RNA を用いて q-PCR を行い、蛋白についてはリン酸化 JAK2 および全 JAK2 の抗体を用いてウェスタンブロッティングを行う。また採取した RNA を用いて RNA-seq を行う。

(4) 細胞培養

6 週齢の各種マウスの大動脈組織を採取し、外膜組織、線維組織、脂肪組織を取り除いたのちに細かく切断し、コラーゲナーゼ処理を 5 時間 37 °C で行ったのち培養する。

(5) 細胞実験

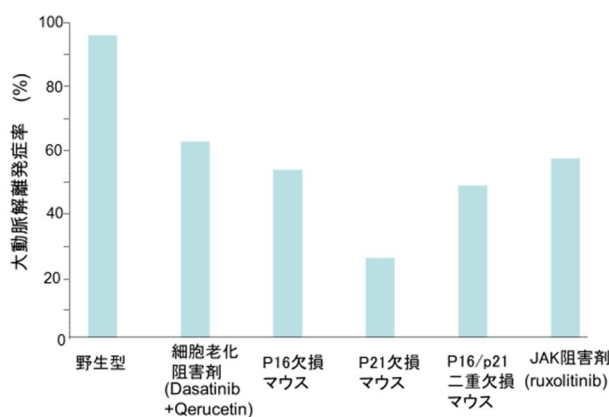
上記の如くマウス大動脈組織から採取した初代マウス血管平滑筋細胞を用いて、SA-gal 染色およびリン酸化 JAK2 および全 JAK2 の抗体を用いたウェスタンブロッティングを行う。

4. 研究成果

リシルオキシダーゼ阻害剤 BAPN を 3 週間投与したのちアンジオテンシン II (AngII) を 12 時間投与することで惹起されるマウス大動脈解離病変の HE 染色の検討から、大動脈解離がまだ起きていない解離直前の血管に既に白血球の遊走・接着が起こっていることが確認された。このことから、大動脈解離発症の結果として炎症がおこっているだけではなく、解離発症の誘因として先に炎症がおこっていることが考えられた。この炎症の特徴を把握するためにマウス大動脈モデル血管組織の qPCR を行ってみると、解離血管では IL-6、IL-1、TNF、CXCL1 といった向炎症性サイトカインが著明に亢進しているのみならず、MMP9、TGF、serpin といった細胞老化により誘導される炎症性表現型(SASP)の代表的因子も有意に亢進していることが示された。

そこで実際に解離病変で細胞老化が起こっているかどうかの確認のためにマウス解離血管組織の免疫染色を施行したところ、解離血管中膜の血管平滑筋細胞において、細胞老化に係る鍵因子である p21 の発現、および細胞老化の surrogate marker である H2X の発現が著明に亢進していることが示された。また老化細胞から SASP 誘導に至るシグナリングとして報告されている JAK-STAT シグナルについて、マウス解離血管を用いたウェスタンブロッティングで検討したところ、マウス解離血管では有意に JAK2 のリン酸化が亢進していることが示された。

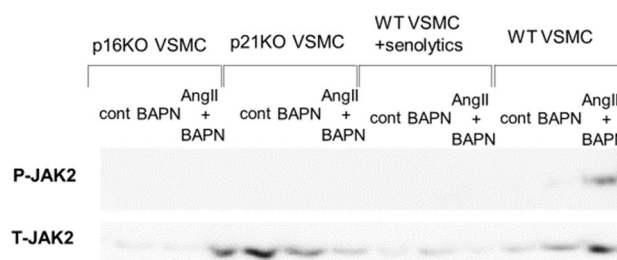
図1 細胞老化が大動脈解離発症に与える影響



次に、血管における細胞老化が大動脈解離の発症に寄与しているかどうかを検討するために、1. 遺伝学的細胞老化阻害モデル (p16 ノックアウトマウス、p21 ノックアウトマウス、p16/p21 ダブルノックアウトマウス)、2. 細胞老化阻害剤 (senolytics) 投与モデル (Dasatinib と Quercetin を野生型マウスに投与)、3. SASP シグナリング阻害剤投与モデル (JAK 阻害剤 ruxolitinib を野生型マウスに投与) に AAD を作成し発症率の解析を行った。その結果、AAD 発症率は p16 ノックアウトマウスでは 62.5%、senolytics 投与群では 58.3%、ruxolitinib 投与群では 53.3% といずれもコントロール群に比べて低下しており、特に p21 ノックアウトマウスでは AAD 発症率は 23.7% まで抑制された (図 1)。以上のことから大動脈解離発症に p21 を中心とする細胞老化が関与する可能性が示唆された。

この細胞老化と JAK2 リン酸化シグナルについて更に詳細に検討するために細胞実験を行った。野生型マウス大動脈から単離培養した初代血管平滑筋細胞にリシルオキシダーゼ阻害剤 BAPN を投与すると時間依存性に弱く JAK2 リン酸化が惹起されるが、そこに AngII を投与すると JAK2 リン酸化が強く誘導されることが示された。この初代血管平滑筋細胞を p16 ノックアウトマウスおよび p21 ノックアウトマウスから単離して同様の検討を行うと、BAPN 投与に AngII 投与を加えても p16, p21 ノックアウトマウス由来血管平滑筋細胞では JAK2 のリン酸化誘導は見られなかった。また野生型血管平滑筋細胞に細胞老化阻害剤として確立されている Dasatinib と Quercetin の共投与を行った場合も JAK2 のリン酸化誘導は見られなかった (図 2)。これらの細胞で細胞老化が実際に確認されるかどうかの検討のために、初代血管平滑筋細胞を用いて SA-gal 染色を行った。細胞老化を起こした細胞の特徴として、酸性条件下でガラクトシダーゼ染色を行うと青く染まるという特徴を持つ (SA-gal 染色)。野生型初代血管平滑筋細胞に BAPN を 5 日間投与すると SA-gal 染色が陽性に染まることを確認された。一方、p16, p21 ノックアウトマウス由来血管平滑筋細胞では BAPN を投与しても SA-gal 染色を行っても染まることはなく、また野生型血管平滑筋細胞に細胞老化阻害剤の Dasatinib と Quercetin の共投与を行った場合も BAPN 投与下で SA-gal 染色では染まることなかった。以上のことから、血管平滑筋細胞にリシルオキシダーゼ阻害剤 BAPN を投与すると細胞老化および JAK2 リン酸化が誘導され AngII 投与で亢進することが示され、その機序に p16, P21 が関与することが示された。

図2 BAPN投与 + AngII投与による血管平滑筋細胞のJAK2リン酸化は細胞老化阻害モデルにおいては抑制される



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kashiwagi Kazuhiro, Seino Takashi, Makino Kanako, Shimizu Hirota Ryoko, Takayama Michiyo, Yoshida Toshifumi, Iwasaki Eisuke, Sugino Yoshinori, Inoue Nagamu, Iwao Yasushi, Kanai Takanori	4. 巻 26
2. 論文標題 Negative effect of fatty liver on visualization of pancreatic cystic lesions at screening transabdominal ultrasonography	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Evaluation in Clinical Practice	6. 最初と最後の頁 256-261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jep.13138	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Haraguchi Hirofumi, Hirota Yasushi, Saito-Fujita Tomoko, Tanaka Tomoki, Shimizu-Hirota Ryoko, Harada Miyuki, Akaeda Shun, Hiraoka Takehiro, Matsuo Mitsunori, Matsumoto Leona, Hirata Tetsuya, Koga Kaori, Wada-Hiraike Osamu, Fujii Tomoyuki, Osuga Yutaka	4. 巻 33
2. 論文標題 Mdm2-p53-SF1 pathway in ovarian granulosa cells directs ovulation and fertilization by conditioning oocyte quality	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 2610 ~ 2620
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201801401R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsumoto Leona, Hirota Yasushi, Saito-Fujita Tomoko, Takeda Norihiko, Tanaka Tomoki, Hiraoka Takehiro, Akaeda Shun, Fujita Hidetoshi, Shimizu-Hirota Ryoko, Igawa Shota, Matsuo Mitsunori, Haraguchi Hirofumi, Saito-Kanatani Mayuko, Fujii Tomoyuki, Osuga Yutaka	4. 巻 128
2. 論文標題 HIF2 in the uterine stroma permits embryo invasion and luminal epithelium detachment	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 3186 ~ 3197
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI98931	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Mahiro Egashira, Yasushi Hirota, Ryoko Shimizu-Hirota, Tomoko Saito-Fujita, Hirofumi Haraguchi, Leona Matsumoto, Mitsunori Matsuo, Takehiro Hiraoka, Tomoki Tanaka, Shun Akaeda, Chiaki Takehisa, Mayuko Saito-Kanatani, Kei-ichiro Maeda, Tomoyuki Fujii, Yutaka Osuga	4. 巻 158
2. 論文標題 F4/80+ Macrophages Contribute to Clearance of Senescent Cells in the Mouse Postpartum Uterus	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 2344-2353
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/en.2016-1886	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hayashi K, Takayama M, Abe T, Kanda T, Hirose H, Shimizu-Hirota R, Shiomi E, Iwao Y, Itoh H.	4. 巻 24
2. 論文標題 Investigation of Metabolic Factors Associated with eGFR Decline Over 1 Year in a Japanese Population without CKD.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Atheroscler Thromb	6. 最初と最後の頁 863-875
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5551/jat.38612	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 清水良子
2. 発表標題 F4/80陽性マクロファージによるマウス分娩後子宮の老化細胞除去と次回妊娠に及ぼす影響
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 清水良子
2. 発表標題 細胞老化が急性大動脈解離発症に与える影響の検討
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 清水良子、廣田泰	4. 発行年 2018年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 730
3. 書名 実践臨床生殖免疫学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	榎野 香奈子 (MAKINO Kanako) (10772402)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教 (32612)	
研究協力者	下田 将之 (SHIMODA masayuki)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授	
研究協力者	廣田 泰 (HIROTA yasushi)	東京大学・東京大学産婦人科・准教授	
研究協力者	安井 正人 (YASUI masato)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授	