

大動脈瘤の新たな治療標的の探索

筑波大学生命領域学際研究センター

柳沢裕美

1. はじめに

諸言

大動脈壁の局所的拡張を起こす大動脈瘤は突然の解離や破裂により生命を脅かす。大動脈瘤形成の分子メカニズムの理解に基づき、有効な内科的予防・治療法は未だ確立していないのが現状である。

目的

我々は、細胞外基質fibulin-4を血管平滑筋細胞特異的に欠損させ、生後1ヶ月で全例に発症する上行大動脈瘤のマウスモデル (SMKO) を確立した (Huang et al. *Circ Res* 2010)。大動脈壁の局所的なアンギオテンシン変換酵素の発現増加とアンギオテンシンII (AngII) の産生が大動脈瘤の形成に関与していることを報告し、アンギオテンシン受容体拮抗薬の早期投与が大動脈瘤の発生を抑えるのに有効であることを報告した (Huang et al. *Sci Transl Med* 2013)。しかしアンギオテンシンII 1型受容体拮抗薬ロサルタンを生後1ヶ月以降に投与開始しても大動脈瘤に対する治療効果は認められなかった。したがって本研究では、1) 大動脈瘤初期病変を形成する血管平滑筋細胞内におけるシグナル伝達系の解明と、2) 創薬ターゲットとしてのあらたな分子の同定、を目的として研究を行なう。

背景

近年家族性胸部大動脈瘤の原因遺伝子探索が進む中、細胞外基質 (ECM) や血管平滑筋収縮タンパクをコードする遺伝子の変異が報告されてきた (Gillis et al, *Circ Res* 2013)。マルファン症候群では原因遺伝子であるECMのfibrillin-1の構造蛋白としての機能異常に加え、TGFβの細胞外制御機構の破綻が大動脈瘤形成に関与しているとして注目された。またTGFβ2遺伝子やTGFβ受容体の変異が大動脈瘤を起こす事が報告された。さらにTGFβ遮断目的で投与されたロサルタンが、TGFβシグナル過剰を伴う大動脈瘤モデル、すなわちマルファンマウスやTGFβ受容体遺伝子異常のロイス・ディーツ症候群マウスの大動脈瘤に有効であることが報告された。その結果、大動脈壁でのTGFβシグナル過剰説を胸部大動脈瘤の共通要因として提案する流れがおこった。一方、血管平滑筋細胞特異的TGFβI・型受容体の欠損が逆に大動脈瘤を悪化させることがマウスで報告された。さらに血管平滑筋細胞のアクトミオシン構造タンパクや収縮能力に影響を及ぼす分子の異常も大動脈瘤の原因として報告され (Milewicz, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2016)、血管壁への機械的ストレスが大動脈瘤の原因として示唆された (Humphrey, *Science* 2014)。昨年にはマルファン症候群の罹患者603人を対象として大動脈起始部瘤の成長を指標としたβ遮断薬アテレンロールとロサルタンの効果を比較する臨床試験の結果が米国から発表されたが、予想に反して両者には大きな違いが認められなかった (Lacro et al. *NEJM* 2015)。これらのことから、各大動脈瘤における 病理的特徴および分子変化を明らかにし、血管壁でのシグナル伝達機構を解明し、あらたな大動脈瘤の治療標的を見出すことが重要であると考えられる。

序論

我々は、SMKOマウス大動脈の経時的変化を野生型マウスと比較してプロテオミクスにより解析を行い、SMKOマウスで大動脈の局所的組織変化が見られる生後7日から、Cofilin脱リン酸化酵素Slingshot-1 (Ssh1) の発現が上昇していることを報告した (Yamashiro et al, *Sci. Signal* 2015)。Ssh1の増加によりCofilinの活性化 (=脱リン酸化) が誘導され、アクチン脱重合化促進によりアクチンフィラメントが断裂していることを見いだした。また、PI3キナーゼ阻害薬によりSsh1の発現を低下させると、大動脈瘤の発症が抑制されることも報告した。我々は、Ssh1の発現増加が大動脈壁の構造異常で生ずる機械的ストレスによって引き起こされると考え、「Ssh1-cofilin経路を制御することによって、大動脈瘤の発症を防ぐことができる」という仮説のもと、SMKOマウスを用いてin vivo で検証することを提案した。

2. 方法

Aim 1) 生体内の大動脈壁における Ssh1 活性測定系の確立。

大動脈瘤の病態と Ssh1 活性の相関を調べるために、Ssh1 のカルボキシル末端に FLAG タグを付加した Ssh1-FLAG ノックインマウスの作製に着手した。これはどの年齢のマウスにおいても、同じ抗体で同じ効率で Ssh1 を調整することを意図した。CRISPR/Cas9 ゲノム編集法を用いて、はじめに C2C12 細胞を用いてターゲティングイベントを確認した。筑波大学生命科学動物資源センターとの共同研究により、ノックインマウスの作製を行った。

Aim 2) ゲノム編集法を用いた Ssh1 および Ssh2 ノックアウトマウスの作製。

SMKOにおける大動脈瘤形成にSsh1が関与していることを遺伝的に検証するために、Ssh1ノックアウトマウスをCRISPR/Cas9を用いて作成した。当初はホスファターゼ不活性型 (Ssh1C393S-FLAG) を発現するマウスをゲノム編集法によるノックインにより作製することを計画していたが、ノックイン効率がやや低く、スクリーニングに時間を要することから、ノックアウトマウス作製に変更した。Ssh1と同じSshファミリーであるSsh2に対するガイドRNA (gRNA) もデザインし、同時に2遺伝子をノックアウトできるようにゲノム編集を行った。

3. 結果・研究成果

Aim 1) Ssh1-FLAGノックインマウスはHindIIIによる切断を示した2匹のputative foundersを得られたが、その後のシーケンスの解析で、挿入されたドナーDNAがgRNAに認識されて再び切断されたため、FLAGを発現しているfounderを得ることができなかった。ドナーDNAの中のgRNA配列を変えて、現在新しいマウスを作製中である。

Aim 2) Ssh1変異マウスから1種類のfounderが得られ、F2世代にも変異アレルが遺伝することを確認できた。Ssh2変異マウスからは2種類のfounderが得られ、F3世代になってそれぞれの系統のマウスラインを確立することができた。しかし2 founderともに変異はインフレームをきたす部分的欠損であることがわかった。Ssh1とSsh2のダブル変異マウスは致死であることがわかり、現在解析中である。

4. 考察・まとめ

Ssh1-FLAGマウスは生体内のSsh1活性、Cofilinの脱リン酸化、アクチン線維の形状を結びつける上で非常に有用だと考えている。今後ドナーDNAを改良したゲノム編集法により、マウスラインを樹立する予定である。Ssh1ノックアウトマウスに関しては、ホモ接合体の発生障害、生後の発育、各臓器の病理等を綿密に観察することが大切である。また、Ssh1のRNAやタンパクレベルでの発現消失を確認し、Fbln4SMKOとの交配を開始する。リードアウトとして、大動脈瘤の形成が抑制されるかどうかを判定し、同時に、大動脈の血管平滑筋のアクチン線維の形状、G/F アクチンの測定等を行う予定である。

発表論文

なし

参考論文

Huang J, Davis EC, Chapman SL, Budatha M, Marmorstein LY, Word RA and Yanagisawa H: Fibulin-4 deficiency results in ascending aortic aneurysms: a potential link between abnormal smooth muscle cell phenotype and aneurysm progression. *Circ Res.* 106(3):583-592 (2010).

Huang J, Yamashiro Y*, Papke CL*, Ikeda Y*, Lin Y, Patel M, Inagami T, Le VP, Wagenseil JE and Yanagisawa H: Angiotensin-converting enzyme-induced activation of local angiotensin signaling is required for ascending aortic aneurysms in fibulin-4-deficient mice. *Science Transl Med.* 5(183):183ra58 (2013).

Gillis E, Van Laer L, Loeys BL: Genetics of thoracic aortic aneurysm: at the crossroad of transforming growth factor- β signaling and vascular smooth muscle cell contractility. *Circ Res.* 113 (3) 327-340 (2013).

Milewicz DM, Trybus KM, Guo D, Sweeney HL, Regalado E, Kamm K, Stull JT: Altered Smooth Muscle Cell Force Generation as a Driver of Thoracic Aortic Aneurysms and Dissections. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* pii: ATVBAHA.116.303229. [Epub ahead of print]

Humphrey JD, Milewicz DM, Tellides G, Schwartz MA: Cell biology. Dysfunctional mechanosensing in aneurysms. *Science* 344 (6183):477-479 (2014).

Lacro RV, Dietz HC, Mahony L: Atenolol versus Losartan in Marfan's Syndrome. *N Engl J Med* 372 (10):980-981(2015).

Yamashiro Y, Papke CL, Kim J, Ringuette L-J, Zhang Q-J, Liu ZP, Mirzaei H, Wagenseil JE, Davis EC and Yanagisawa H: Abnormal mechanosensing and cofilin activation promote the progression of ascending aortic aneurysms in mice. *Science Signaling.* 8(399):ra105 (2015).