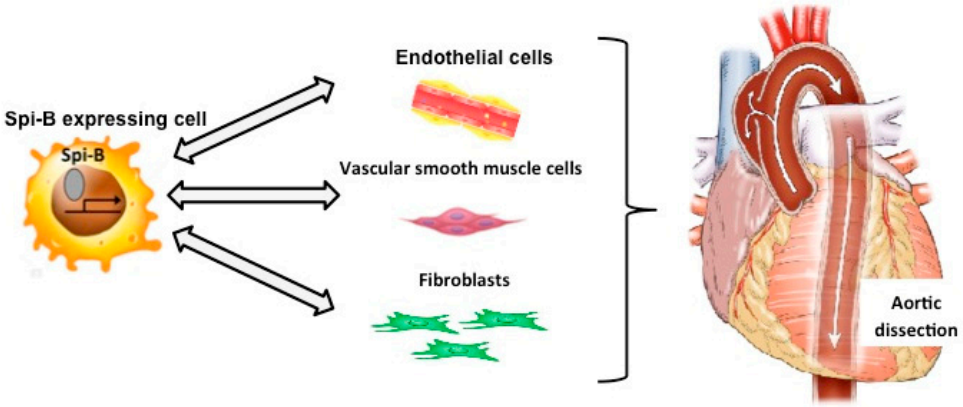
197　大動脈解離形成におけるSpi-Bの分子病態機構の解明	樽谷　玲

【目的】大動脈解離は「突然死」の原因として最重要疾患である。大動脈解離の機序は、大動脈中膜の変性により、剪断応力に対し大動脈が脆弱な状態となるため、一過性の血圧上昇により大動脈中膜の解離が生じ発症すると考えられている。しかし、大動脈解離の前段階である中膜変性の機序は、未だ十分に解明されていない。すなわち、大動脈解離の分子病態機構が未解明であるため、予防法は確立しておらず、大動脈解離を発症して初めて治療が行われているのが現状である。この状況を打開するには、大動脈解離の分子病態機構を解明し、新規分子標的治療法の確立が必要である。本研究の目的は、大動脈解離における中膜変性の分子病態機構を明らかにすることである。そして、解明した大動脈解離の分子病態機構を基に、最終目標である大動脈解離に対する原因治療となる新規分子標的治療法の開発への礎とする。
【方法】8 週齢オスの *Spi-B* 遺伝子欠損（*Spi-B* KO）マウスと野生型（WT）マウス（Balb/c）を用いて、アンギオテンシン 2 による高血圧負荷実験を行い、大動脈解離の発症率の比較や組織学的な検討を行った。さらに大動脈組織から抽出した mRNA や蛋白質を用いて、大動脈の構成要素である弾性繊維の関連遺伝子や蛋白の発現について検討を行った。
【結果】高血圧負荷を行うと、WT マウスと比較し、*Spi-B* KO マウス大動脈の構成組織である弾性繊維が減少・断裂することが分かった。この結果より、Spi-B が大動脈解離発症に対し、保護的分子病態機構を有することが示唆された。さらに弾性繊維が脆弱化する原因は、弾性繊維維持に寄与している lysyl oxidase の遺伝子・蛋白発現に Spi-B が関与していることが確認された。

大動脈解離発症に対する Spi-B の保護的分子病態機構



197. 大動脈解離形成における Spi-B の分子病態機構の解明

樽谷　玲

*和歌山県立医科大学 医学部 循環器内科教室

Key words：大動脈解離，Spi-B，高血圧，アンギオテンシン 2，弾性繊維

緒　言

大動脈解離は循環器救急疾患の 1 つである。画像検査の進歩に伴い大動脈解離の診断は比較的容易となってきてはいるものの、未だに救命困難事例が多く致死率の高い、いわゆる「突然死」の原因として最重要疾患の一つである。高血圧状態が持続することは大動脈中膜の弾性線維の減少・途絶などの中膜変性を生じさせると考えられており［1］、この慢性的な高血圧状態による中膜変性に加え、一過性の血圧上昇による剪断応力の急激な上昇が高血圧患者における大動脈解離発症の原因とされている［2］。しかしながら、大動脈解離の前段階である中膜変性の原因・機序については十分に解明されていないのが現状である。

さらに、大動脈解離症例の約 20%で家族歴が認められることから、遺伝的素因も大動脈解離の危険因子の一つである［3］。マルファン症候群はその代表であり、遺伝性大動脈解離の約 60%を占めると報告されているが、約 30%においてはその原因遺伝子さえ解明されていないのが現状である［4］。臨床的な観点においても、大動脈解離発症の分子病態機構が解明されていないことから遺伝性大動脈解離発症が危惧される症例に対しての一次予防法は確立されておらず、大動脈解離発症後に治療しているのが現状である。この状況を打開する一次予防法を確立するためには、大動脈解離発症の分子病態機構を解明し、新規の分子標的治療法の確立が必要である。

そこで我々はマウスにおける大動脈解離モデルを樹立し、マウスモデル実験によって大動脈解離に関与する可能性のある候補遺伝子を探索している。今回、その候補遺伝子の一つである *Spi-B* に注目した。Spi-B は、Ets ファミリーの転写因子で、リンパ球や樹状細胞等の免疫細胞との関連が報告されている［5］が、先行研究で *Spi-B* 欠損樹状細胞において ApoE 等の大動脈解離を含めた動脈硬化疾患と関連の深い遺伝子に変異があることを見出し、Spi-B が ApoE と同様に大動脈解離発症に影響を及ぼしている可能性があると考えた。

今回、大動脈解離における中膜変性の分子病態機構を明らかにすることを目的とし、その候補遺伝子の一つである *Spi-B* 遺伝子欠損マウスを用いて、本研究を行った。

方　法

1. アンギオテンシン 2 による高血圧負荷実験

8 週齢オスの *Spi-B* 遺伝子欠損（*Spi-B*KO）マウス（Balb/c）及び野生型（WT）マウスの背部皮下に深麻酔下にてミニポンプを埋め込み、アンギオテンシン 2（AT2）（1.4 mg/kg/day）を 14 日間持続投与し、その大動脈解離発症率を比較した。

2. 病理組織学的・免疫組織化学的解析

AT2 投与 5 日目に採取した大動脈を Masson Trichrome 染色、Elastica van Gieson 染色を行い、大動脈構成組織の状態を評価した。

3. 遺伝子発現動態の解析

AT2 投与 5 日目に採取した大動脈から total RNA を抽出し、中膜の主要構成組織である弾性線維関連遺伝子や炎症性サイトカイン遺伝子の発現を real time RT-PCR 法を用い検討した。

*現在の所属：新宮市立医療センター 循環器内科

4. 蛋白発現動態の解析

AT2 投与 5 日目に採取した大動脈から蛋白質を抽出し Western blotting を用い、大動脈構造蛋白（lysyl oxidase など）の発現量を検討した。

結　果

1.　高血圧負荷後の大動脈発症率

生後 8 週齢オスの WT マウス（n＝12）及び *Spi-B* KO マウス（n＝17）に対し AT2 投与 14 日間での大動脈解離の発症率を比較したところ、WT マウスにおいて大動脈解離は約 20%程度しか発症しなかったが、約 80%の *Spi-B* KO マウスが大動脈解離を発症した。この結果より、Spi-B が大動脈解離発症に対し保護的な作用をしていることが考えられた。

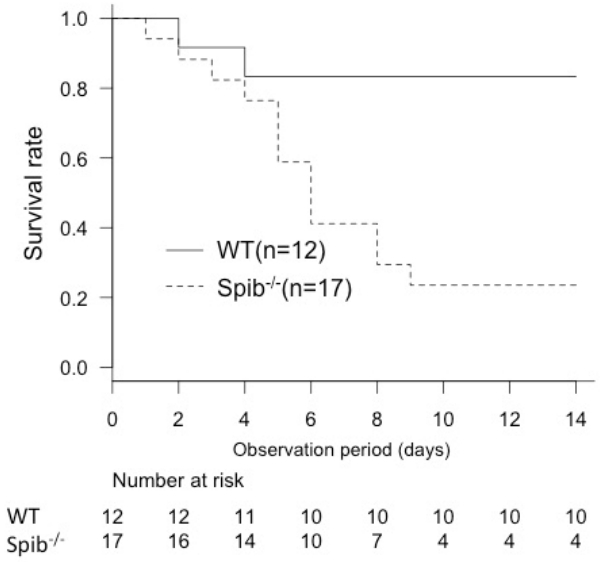


図 1.　高血圧負荷後の大動脈発症率

アンギオテンシン 2 による高血圧負荷を 14 日間行ったところ、WT に比べ *Spi-B* KO マウスにおいて有意に大動脈解離の発症率が多かった（$p < 0.01$: Log-rank test）

2.　高血圧負荷後による大動脈構成組織への影響

AT2 投与 5 日後で大動脈解離未発症の WT マウス及び *Spi-B* KO マウスそれぞれの大動脈に Masson Trichrome 染色・Elastica van Gieson 染色を行った。その結果、WT マウスに比べ、*Spi-B*KO マウスの大動脈において、その構成組織である弾性繊維の顕著な減少及び断裂を認めた（図 2）。この結果より、Spi-B が弾性繊維の構造維持に関与していることが示唆された。

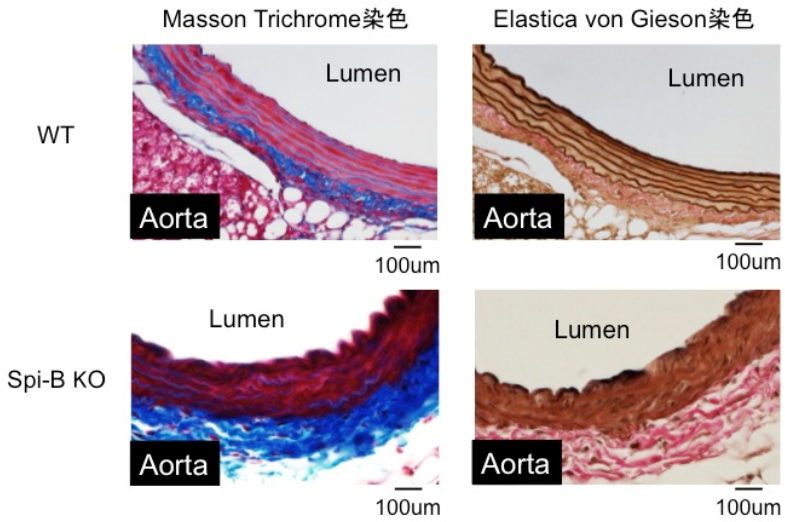


図 2. 高血圧負荷 5 日後の大動脈の組織像

上段の WT マウスに比べ、下段の *Spi-B* KO マウス大動脈において弾性繊維の顕著な減少、断裂を認めた。

3. 弾性線維関連遺伝子の発現についての検討

AT2 投与 5 日後で大動脈解離未発症の WT マウス及び *Spi-B* KO マウスそれぞれの大動脈から抽出した mRNA を用いて、弾性線維構成因子である *lysyl oxidase* の遺伝子発現を評価した。その結果、高血圧負荷を行うと、WT マウス・*Spi-B* KO マウス共に有意に増加した。その一方で、高血圧負荷後で両群を比較すると、*Spi-B* KO マウスの大動脈において *lysyl oxidase* 遺伝子発現は有意に低かった（図 3）。これより *Spi-B* が *lysyl oxidase* 遺伝子発現に関連していることが示唆された。

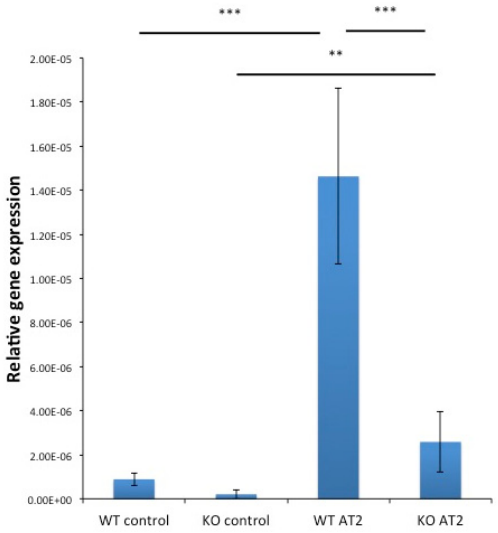


図 3. マウス大動脈における *lysyl oxidase* の遺伝子発現

WT control：未負荷の WT マウス大動脈、KO control：未負荷の *Spi-B* KO マウス大動脈、WT AT2：高血圧負荷 5 日後の WT マウス大動脈、KO AT2：高血圧負荷 5 日後の *Spi-B* KO マウス大動脈。**P < 0.01、***P < 0.001（t test）。

lysyl oxidase 遺伝子発現は高血圧負荷を行うと、WT マウス・*Spi-B* KO マウス共に有意に増加する。その一方で、高血圧負荷後で両群を比較すると、*Spi-B* KO マウスの大動脈において *lysyl oxidase* 遺伝子発現は有意に低い。

4. 弾性線維関連蛋白の発現についての検討

AT2 投与 5 日後で大動脈解離未発症の WT マウス及び *Spi-B* KO マウスそれぞれの大動脈から抽出した蛋白質を用いて、lysyl oxidase 蛋白の発現を評価した。その結果、WT マウスでは高血圧に応答する形で、LOX 蛋白の発現増加を認めた（図 4）。これより *Spi-B* が lysyl oxidase 蛋白発現に関連していることが示唆された。

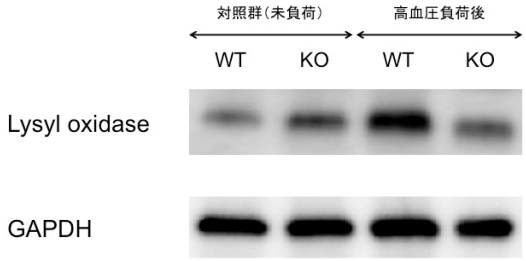


図 4. マウス大動脈における lysyl oxidase の蛋白発現
高血圧負荷を行うと、WT マウスの大動脈では高血圧に応答する形で、LOX 蛋白の発現増加を認めた。

考　察

本研究の結果から、*Spi-B* が大動脈解離発症に対し、保護的分子病態機構を有することがわかった。さらにその原因は、大動脈の構成組織である弾性繊維の維持に寄与している lysyl oxidase の遺伝子・蛋白発現に Spi-B が関与していることが確認された。しかしながら、Spi-B 発現細胞の種類や、Spi-B 発現細胞自身が直接大動脈に作用しているのか、血管上皮細胞や血管平滑筋細胞などの常在細胞あるいは繊維芽細胞などの遊走細胞を介し大動脈に影響を及ぼしているについては今後も引き続き検証を重ねていく予定である。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、和歌山県立医科大学法医学教室の近藤稔和教授、石田裕子講師、野坂みずほ助教、木村章彦博士である。この場をお借りして、ご指導・ご助言を頂きました諸先生方に深謝いたします。

文　献

1） Nakashima Y, Sueishi K. Alteration of elastic architecture in the lathyritic rat aorta implies the pathogenesis of aortic dissecting aneurysm. The American journal of pathology. 1992;140(4):959-69. PubMed PMID: 1562054; PubMed Central PMCID: PMC1886377.

2） Maleszewski JJ, Miller DV, Lu J, Dietz HC, Halushka MK. Histopathologic findings in ascending aortas from individuals with Loeys-Dietz syndrome (LDS). The American journal of surgical pathology. 2009;33(2):194-201. doi: 10.1097/PAS.0b013e31817f3661. PubMed PMID: 18852674.

3） Nienaber CA, Clough RE. Management of acute aortic dissection. Lancet. 2015;385(9970):800-11. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61005-9. PubMed PMID: 25662791.

4） Akutsu K, Morisaki H, Okajima T, Yoshimuta T, Tsutsumi Y, Takeshita S, et al. Genetic analysis of young adult patients with aortic disease not fulfilling the diagnostic criteria for Marfan syndrome. Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society. 2010;74(5):990-7. PubMed PMID: 20354336.

5） Sasaki I, Hoshino K, Sugiyama T, Yamazaki C, Yano T, Iizuka A, et al. Spi-B is critical for plasmacytoid dendritic cell function and development. Blood. 2012;120(24):4733-43. doi: 10.1182/blood-2012-06-436527. PubMed PMID: 23065153.